



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

DOCTORADO EN QUÍMICA

TESIS

**DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS
EMPLEANDO ELECTROFORESIS CAPILAR O
NANOPARTÍCULAS DE AgInS_2 PARA LA
CUANTIFICACIÓN DE DIGOXINA**

Para obtener el grado de

Doctor en Química

PRESENTA

Raybel Muñoz Ramírez

Director

Dr. José Antonio Rodríguez Ávila

Comité tutorial

Dr. Alfredo Guevara Lara

Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Dr. Alejandro Álvarez Hernández

Pachuca de Soto, Hidalgo. Febrero de 2024.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería

School of Engineering and Basic Sciences

Área Académica de Química

Department of Chemistry

Número de control: ICBI-AAQ/111/2024

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar de la UAEH

El Comité Tutorial del trabajo de tesis titulado "Desarrollo de metodologías analíticas empleando electroforesis capilar o nanopartículas de AgInS_2 para la cuantificación de digoxina", realizado por el sustentante **RAYBEL MUÑOZ RAMÍREZ** con número de cuenta **202434** perteneciente al programa del **DOCTORADO EN QUÍMICA**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo con lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

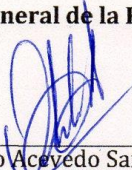
AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que el sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente


"Amor, Orden y Progreso"

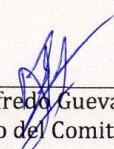
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 30 de enero de 2024


Dr. Otilio Arturo Acevedo Sandoval
Director del ICBI

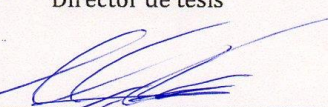
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

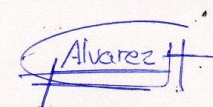



Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
Director de tesis


Dr. Alfredo Guevara Lara
Miembro del Comité Tutorial

Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química


Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
Miembro del Comité Tutorial


Dr. Alejandro Álvarez Hernández
Miembro del Comité Tutorial

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca-Tulancingo km 4.5 Colonia
Carboneras, Mineral de la Reforma, Hidalgo,
México. C.P. 42184
Teléfono: +52 (771) 71 720 00 ext. 2200, 2201
Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx



www.uaeh.edu.mx



Este trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 1 del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Parte de esta investigación ha sido presentada en:

- Congreso Internacional de la Sociedad Química de México (2022) con el trabajo: “Aplicación de nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ en la determinación de acrilamida en frituras mediante espectroscopia de fluorescencia.”.
- The 28th Latin American Symposium on Biotechnology, Biomedical, Biopharmaceutical and Industrial Applications of Capillary Electrophoresis, Microchip, and Mass Spectrometry Technologies (2023) con el trabajo: Evaluation of In-Capillary Derivatization- Large Volume Sample Stacking-Capillary Zone Electrophoresis Systems for Boronate Ester formation. Application to determination of Digoxin in Pharmaceutical and Biological Samples.

Parte de este trabajo ha sido publicado en:

- Muñoz, R., Santos, E. M., Galan-Vidal, C. A., Miranda, J. M., Lopez-Santamarina, A., Rodriguez, J. A. (2021). Ternary quantum dots in chemical analysis. Synthesis and detection mechanisms. *Molecules*, 26(9), 2764.
- Muñoz, R., Santos, E. M., Guevara-Lara, A., Vazquez-Garcia, R. A., Islas-Rodriguez, N., Rodriguez, J. A. (2022). Fluorescence assay for acrylamide determination in fried products based on $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ quantum dots. *Analytical Methods*, 14(18), 1797-1802.

Agradecimientos

A Dios por permitirme concluir un objetivo más en mi vida.

A mi familia por apoyarme en las decisiones que he tomado y por estar siempre presente cuando lo he necesitado. A Jessy mi futura esposa, por compartir tantos momentos conmigo por su motivación, comprensión y cariño. A mi papá por su apoyo incondicional, a mis hermanos Nancy, Nor, Carmen, Lili, Juan y Pao por sus consejos, regaños, confianza y fe en mí. A mi tía, a mis sobrinos por ser una inspiración y darle alegría a mi vida.

A mis amigos y compañeros de laboratorio Enoch, Sandy, Angie, Jorge y Bego por tantos momentos compartidos.

Al Dr. José Antonio Rodríguez Ávila por permitirme realizar este proyecto, por su amistad, por los regaños y consejos en estos años.

A los Doctores Alfredo Guevara, Carlos Galán y Alejandro Álvarez por su participación en el desarrollo de este proyecto.

Contenido

| | |
|---|-----|
| Resumen | i |
| Índice de abreviaturas | iii |
| 1. Glucósidos cardiacos | 2 |
| 1.1 Digoxina | 3 |
| 1.2 Métodos de determinación de digoxina | 4 |
| 1.2.1 Inmunoensayos | 4 |
| 1.2.2 Métodos espectroscópicos..... | 6 |
| 1.2.3 Métodos cromatográficos | 7 |
| 1.2.3.1 Derivatización | 8 |
| 1.2.4 Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas | 8 |
| 1.2.5 Electroforesis capilar | 9 |
| 1.2.6 Técnicas de preconcentración en electroforesis capilar | 11 |
| 1.2.7 Nanopartículas de materiales semiconductores | 12 |
| 2. Objetivos | 17 |
| 2.1 Objetivo general | 17 |
| 2.2 Objetivos específicos | 17 |
| 3. Desarrollo de metodologías electroforéticas en el análisis de digoxina. | 19 |
| 3.1 Antecedentes..... | 19 |
| 3.2 Parte experimental | 20 |
| 3.2.1 Reactivos y equipos. | 20 |
| 3.2.2 RMN ¹¹ B de sistemas boronato-digoxina..... | 20 |
| 3.2.3 Preparación de muestras farmacéuticas y biológicas..... | 21 |
| 3.2.4 Análisis de boronatos en sistemas de electroforesis capilar | 21 |
| 3.3 Resultados y discusión..... | 23 |
| 3.1.1 Espectros de ¹¹ B RMN de sistemas boronato-digoxina | 23 |
| 3.3.2 Evaluación de condiciones de separación del sistema boronato-digoxina pre-capilar | 23 |
| 3.3.3 Evaluación de condiciones de separación del sistema InCapD-LVSS-CZE-UV..... | 29 |
| 3.3.4 Validación analítica de metodologías propuestas | 34 |
| 3.3.5 Exactitud y análisis de muestras..... | 35 |
| 3.3.6 Análisis de interferentes..... | 39 |
| 3.3.7 Conclusiones..... | 40 |

| | |
|--|----|
| 4. Análisis de digoxina empleando nanopartículas ternarias de materiales semiconductores | 42 |
| 4.1 Introducción | 42 |
| 4.2 Parte experimental | 42 |
| 4.2.1 Reactivos y equipos. | 42 |
| 4.2.2 Síntesis de AgInS ₂ /ZnS | 43 |
| 4.2.3 Caracterización de nanopartículas de AgInS ₂ /ZnS (Espectros UV-Vis y de fluorescencia) | 43 |
| 4.2.4 Análisis TEM, EDS y tamaño de partícula | 43 |
| 4.2.5 Evaluación espectroscópica de sistemas- AgInS ₂ /ZnS -Ácido ascórbico..... | 44 |
| 4.2.6 Evaluación espectroscópica de sistemas acrilamida- AgInS ₂ /ZnS QDs..... | 44 |
| 4.2.7 Evaluación espectroscópica de sistemas digoxina- AgInS ₂ /ZnS QDs | 45 |
| 4.2.8 Evaluación espectroscópica de sistemas nanopartículas funcionalizadas y digoxina. | 45 |
| 4.2.9 Preparación de muestras farmacéuticas | 47 |
| 4.3 Resultados y discusión..... | 47 |
| 4.3.1 Espectros UV-Vis y emisión de nanopartículas de AgInS ₂ y AgInS ₂ /ZnS | 47 |
| 4.3.2 Evaluación espectroscópica de sistemas- AgInS ₂ /ZnS -Ácido ascórbico..... | 49 |
| 4.3.3 Evaluación espectroscópica de sistemas AgInS ₂ /ZnS-digoxina..... | 50 |
| 4.3.5 Evaluación espectroscópica de sistemas nanopartículas funcionalizadas y digoxina. | 56 |
| 5. Bibliografía | 63 |

Resumen

La digoxina es un glucósido cardíaco extraído de plantas del género *Digitalis* que se ha empleado para el tratamiento médico de diversas afecciones cardíacas, este compuesto es de gran relevancia debido a que es el cardiotónico mayormente recetado a nivel mundial y la organización mundial de la salud lo considera como un medicamento vital en los sistemas de salud. Su detección y monitoreo es de gran relevancia debido a que su dosis terapéutica y las concentraciones de importancia toxicológica son muy cercanas. Adicionalmente, en años recientes la digoxina ha sido empleada en pruebas *in-vitro* para el tratamiento de otras enfermedades como artritis reumatoide, infecciones virales e incluso cáncer de mama y ovario; debido a lo anterior, es necesario el desarrollo de metodologías analíticas que permitan su cuantificación diferentes matrices analíticas.

De forma general se ha descrito el uso de metodologías cromatográficas con detección UV y masas además de inmunoensayos para la detección de digoxina, sin embargo, existen desventajas como el bajo coeficiente de extinción molar que presenta la molécula lo cual no permite obtener parámetros analíticos adecuados en las metodologías. En lo que respecta a HPLC-MS e inmunoensayos los análisis tienden a ser costosos además de requerir de personal altamente entrenado.

Una alternativa a las metodologías mencionadas es la derivatización, la cual se basa en la adición de un grupo cromóforo al analito de interés que permita su detección, para ello se propone en el presente trabajo el uso de ácidos borónicos. Se ha descrito que este tipo de compuestos permiten la formación de complejos boronato-diol a pH básico, lo cual permite obtener un compuesto con carga y propiedades espectroscópicas que permita su análisis por electroforesis capilar de zona.

Adicionalmente, se propone la detección indirecta que se basa en el aumento o disminución de la señal analítica de un compuesto cromóforo por el analito de interés, para ello se emplean nanopartículas ternarias de AgInS₂/ZnS. En la bibliografía se ha descrito que las nanopartículas fluorescentes pueden interactuar con diferentes moléculas induciendo un cambio en sus propiedades espectroscópicas.

El presente trabajo se divide en dos partes, en la primera parte se propone el desarrollo de metodologías electroforéticas empleando ácidos borónicos (ácido 2-naftilborónico y ácido *o*-tolilborónico) como agentes de derivatización, basado en la formación de complejos boronato-diol. Para ello se plantean diferentes estrategias de análisis, 1) derivatización precapilar y 2) derivatización en capilar empleando una técnica de preconcentración. En este capítulo se evalúan parámetros relacionados a la separación electroforética como pH, estrategia de separación, estándar interno, voltaje de preconcentración, tiempo de preconcentración, volumen de inyección de muestra y volumen de inyección de derivatizante. La incorporación de ácidos borónicos en sistemas de derivatización en capilar no ha sido descrita previamente en la literatura. Las metodologías desarrolladas son aplicadas al análisis de muestras farmacéuticas (tabletas) encontrándose parámetros analíticos adecuados para este tipo de matrices. La metodología que obtuvo los mejores parámetros analíticos (InCapD-LVSS-CZE-2-NBA) fue empleada para el análisis de muestras biológicas obteniendo porcentajes de recuperación en el intervalo de 96.2 a 103.0 %.

La segunda parte comprende el desarrollo de una estrategia espectrofluorimétrica empleando nanopartículas ternarias para la determinación de digoxina. Las etapas para el desarrollo comprenden la síntesis y caracterización de nanopartículas de AgInS₂/ZnS, posteriormente se lleva a cabo la evaluación espectroscópica de las nanopartículas en sistemas con diferentes moléculas modelo lo cual permite

evaluar los tipos de interacciones nanopartícula-analito. Posteriormente se lleva a cabo la funcionalización de nanopartículas de AgInS₂/ZnS empleando el ácido 4-aminofenilborónico, lo cual permite la interacción nanopartícula con digoxina modificando la señal de fluorescencia en los espectros de emisión. La metodología espectrofluorimétrica es validada mediante las reglas de la IUPAC y es aplicada en el análisis de muestras farmacéuticas.

Índice de abreviaturas

| | |
|---------------|--|
| 2N | 2-Tionaftol |
| 2-NBA | Ácido 2-naftilborónico |
| 3-MPA | Ácido 3-mercaptopropiónico |
| 4-AFBA | Ácido 4-aminofenilborónico |
| AA | Acrilamida |
| CZE | Electroforesis capilar de zona |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida |
| FRET | Transferencia de electrón por resonancia Förster |
| HPLC | Cromatografía de líquidos de alta resolución |
| InCapD | Derivatización en capilar |
| IUPAC | Unión Internacional de Química Pura y Aplicada |
| LOD | Límite de detección |
| LOQ | Límite de cuantificación |
| LVSS | Preconcentración por volumen de muestra |
| MECK | Cromatografía electrocinética micelar |
| NHS | N-hidroxisuccinimida de sodio |
| nm | Nanómetro |
| <i>o</i> -TBA | Ácido <i>o</i> -tolilborónico |
| PET | Transferencia de electrón fotoinducida |
| QDs | Quantum dots, nanopartículas de materiales semiconductores |
| QY | Rendimiento cuántico |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| RSD | Desviación estándar relativa |
| TEM | Microscopía electrónica de transmisión |

Antecedentes

DESARROLLO DE METODOLOGÍAS ANALÍTICAS EMPLEANDO ELECTROFORESIS CAPILAR O NANOPARTÍCULAS DE AgInS2 PARA LA CUANTIFICACIÓN DE DIGOXINA

1. Glucósidos cardíacos

Los glucósidos cardíacos son un grupo de metabolitos secundarios producidos por algunas plantas, en las que se encuentran *Convalliamajalis* (convalatoxina), *Digitalis purpurea* (digitoxina), *Digitalislanata* (digoxina), *Neriumoleander* (oleandrina), *Thevetiapuruviana* (oleandrina) y *Acokantheraschimperii* (ouabaína) [1,2]. Los glucósidos cardíacos han sido empleados en la medicina para el tratamiento de múltiples afecciones cardíacas como insuficiencia cardíaca y fibrilación auricular, entre otras. La estructura química de los glucósidos cardíacos consiste en un núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno o grupo esteroideo, un carbohidrato en la posición C-3 y un anillo de lactona insaturada de 5 (furanona) o 6 átomos (piranona) en la posición C-17 y por la cual se clasifican como cardenólidos o bufadienólidos respectivamente (Fig. 1) [3].

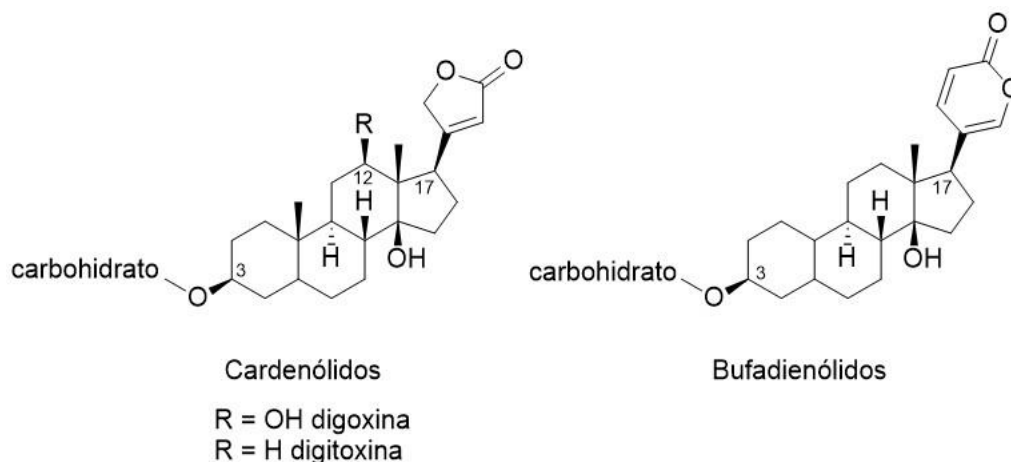


Figura 1. Estructura química de los glucósidos cardíacos.

Entre los glucósidos cardíacos empleados en medicina destacan la convalatoxina, bufalina, digitoxina, oleandrina, ouabaina, lanatósido C y la digoxina, que es la prescrita mayoritariamente a nivel mundial y se diferencia de la digitoxina, al presentar un grupo hidroxilo en la posición C-12 (Tabla 1) [4].

Tabla 1. Glucósidos cardiacos más populares empleados en medicina

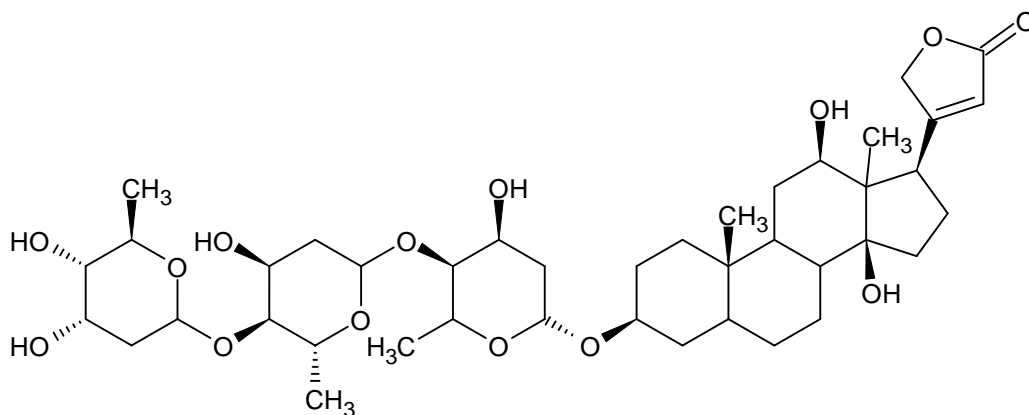
| Glucósido cardiaco | Carbohidrato | Lactona | Referencia |
|--------------------|-------------------------------------|----------------|------------|
| Convalatoxina | L-Ramnosa | 2(5H)-furanona | [5] |
| Bufalina | No presenta | Piranona | [6] |
| Digitoxina | Tridigitoxosa | 2(5H)-furanona | [7] |
| Oleandrina | α - L- Oleandropiranososa | 2(5H)-furanona | [8] |
| Ouabaína | L-Ramnosa | 2(5H)-furanona | [9] |
| Lanatóside C | - | 2(5H)-furanona | [10] |
| Digoxina | Tridigitoxosa | 2(5H)-furanona | [11] |

El mecanismo de acción de estos compuestos orgánicos se basa en la inhibición de la enzima Na^+/K^+ -ATPasa miocárdial, la cual es una bomba electrogénica que transporta iones potasio al interior e iones sodio al exterior de la membrana celular [12]. Los glucósidos cardiacos se unen a los receptores de la enzima de forma reversible, lo cual inhibe el intercambio de iones, esto permite que la concentración de $[\text{Na}^+]$ y subsecuentemente la concentración de $[\text{Ca}^{2+}]$ incremente al interior de las células. Este incremento de calcio intracelular produce un efecto inotrópico positivo es decir se incrementa la contractilidad muscular del corazón [13].

En años recientes se han evaluado otros efectos terapéuticos de estos compuestos diferentes a los relacionados a las afecciones cardiacas. Principalmente se ha descrito que estos compuestos son excelentes senolíticos (fármacos que inducen la muerte celular de forma selectiva), y podrían tener cierta capacidad anticarcinogénica, en la que se destaca el amplio estudio de la digoxina [14].

1.1 Digoxina

La digoxina (Fig. 2) es un glucósido cardiaco derivado de *Digitalis lanata*, que en la posición C-17 del núcleo esteroide contiene la lactona 2(5H)-furanona y en la posición C-3 presenta el carbohidrato tridigitoxosa, el cual presenta un sistema 1,2-cis-diol [15].

**Figura 2.** Digoxina

La molécula presenta un valor de log P de 1.26, tiene una baja solubilidad en agua, es poco soluble en metanol y soluble en DMSO. En la Tabla 2 se describen otras propiedades fisicoquímicas de este compuesto [16].

Tabla 2. Resumen de propiedades físicas de la digoxina

| Propiedad | Descripción |
|---------------------|---|
| Fórmula molecular | C ₄₁ H ₆₄ O ₁₄ |
| Peso molecular | 780.9 g mol ⁻¹ |
| Descripción física | Polvo blanco cristalino |
| Punto de fusión | 249.0 °C |
| Solubilidad en agua | 64.8 mg L ⁻¹ |
| Densidad | 1.36 g cm ⁻³ |

La Organización Mundial de la Salud la ha catalogado a la digoxina como un medicamento esencial dentro del sistema de salud [17]. Recientemente, esta molécula ha sido empleada en tratamientos experimentales para el tratamiento de diferentes enfermedades como artritis reumatoide, infecciones virales e incluso cáncer de mama y ovario [18].

En términos de farmacocinética de la digoxina, presenta una biodisponibilidad oral del 70% la cual es absorbida por el tracto intestinal, adicionalmente se estima que el 25% de la digoxina se compleja con la seroalbúmina. La fase de distribución del medicamento se completa de 6 a 8 horas de administración, y la concentración de digoxina en plasma terapéutica es de 0.5 a 2 ng mL⁻¹. La digoxina se excreta principalmente por los riñones (30 – 50%) y presenta una semi-vida de eliminación de 1.5 a 2 días [11]. La farmacodinámica de la digoxina es la descrita previamente para los glucósidos cardíacos los cuales se unen de forma reversible al receptor de la Na⁺, K⁺-ATPasa inhibiendo el intercambio de iones Na⁺ y Ca²⁺ al exterior de la membrana celular promoviendo un efecto inotrópico [19].

La digoxina presenta un intervalo de concentración terapéutico muy reducido, por lo que las presentaciones farmacéuticas contienen este compuesto en un intervalo de 0.125 a 0.250 mg por tableta o dosis [20]. Debido a lo anterior, es esencial que se presenten estrategias de detección de esta molécula con óptimos límites de detección y excelente sensibilidad en las diferentes matrices analíticas debido a que pequeñas variaciones en la concentración pueden causar toxicidad.

1.2 Métodos de determinación de digoxina

Debido a la importancia biomédica y toxicológica de la digoxina, a lo largo de los años se han desarrollado diversas metodologías analíticas que permiten su detección y cuantificación en matrices farmacéuticas y biológicas. Las principales metodologías utilizadas son los inmunoensayos, espectroscopía UV-Vis, y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) [20].

1.2.1 Inmunoensayos

Los inmunoensayos son métodos bioanalíticos altamente selectivos que permiten detectar la presencia y en algunos casos determinar la concentración de analitos, los cuales pueden ser desde

moléculas pequeñas hasta macromoléculas empleando un anticuerpo como agente de reconocimiento. La base teórica de los inmunoensayos es la inmunoreacción entre un antígeno y su anticuerpo, la cual debe ser acoplada a transductores apropiados (generalmente enzimas) que permitan producir una señal analítica. Este tipo de ensayos permite una gran selectividad como resultado de las reacciones específicas entre anticuerpos y antígenos (Figura 3) [21].

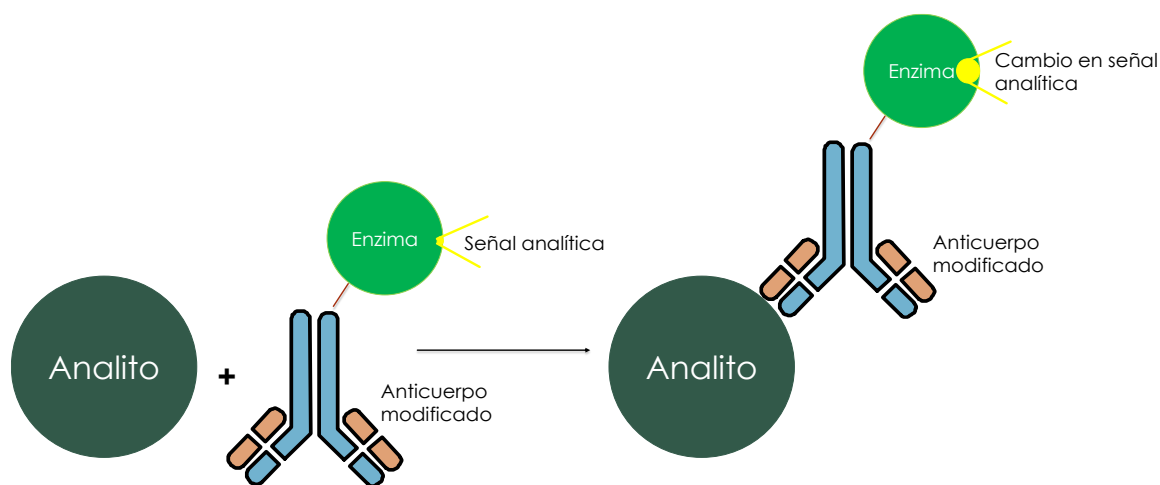


Figura 3. Mecanismo general de inmunoensayo.

Los ensayos de inmunoadsorción ligado a enzima (ELISA por sus siglas en inglés) son un grupo de pruebas que se han empleado en el análisis de anticuerpos, antígenos, proteínas y glicoproteínas principalmente en muestras biológicas. Diferentes estrategias de ELISA han sido descritas en la bibliografía las cuales se han agrupado dependiendo a su mecanismo: directa, sándwich, competitiva e indirecto, estos métodos han sido aplicados en la detección de diferentes fármacos como la digoxina [22].

De forma comercial, Beckman Coulter desarrolló un inmunoensayo para la determinación de digoxina, dicho análisis se basa en la competencia entre el analito en la muestra y la enzima glucosa-6-fosfato deshidrogenada inmovilizada sobre el anticuerpo selectivo a digoxina. La enzima al estar ligada al anticuerpo no presenta actividad, cuando la concentración de digoxina en el sistema incrementa se presenta la reacción antígeno-anticuerpo lo cual desplaza a la enzima al medio. La enzima activa convierte NAD^+ a NADH , lo cual resulta en el cambio en la absorbancia lo cual se puede medir espectrofotométricamente. Esta estrategia permite obtener límites de detección de hasta el orden de 1.0 ng mL^{-1} . Sin embargo, como la mayoría de los inmunoensayos presenta desventajas como la reactividad cruzada, es decir, que el anticuerpo empleado en el ensayo reacciona con metabolitos similares o interferentes lo cual conlleva a errores en la exactitud. En este análisis se observa que la señal de digoxina a 1.0 ng mL^{-1} se sobreestima en un 50% en presencia de deslanósido (0.8 ng mL^{-1}), digitoxina (29.0 ng mL^{-1}), digoxigenina (0.4 ng mL^{-1}), dihidrodigoxina (12.0 ng mL^{-1}) y digitoxigenina (10.0 ng mL^{-1}), entre otros [23].

Li *et al.*, describen un inmunoensayo basado en anticuerpos fluorescentes selectivos a digoxina. Para el análisis, la muestra que contiene digoxina es preincubada con el anticuerpo modificado selectivo a digoxina induciendo la interacción analito-anticuerpo, esto se lleva a cabo en presencia de estreptavidina modificada, la cual se emplea como señal de referencia de fluorescencia. En el desarrollo de la metodología son empleadas esferas de poliestireno funcionalizadas con seroalbúmina bovina la cual está unida covalentemente con digoxigenina un compuesto con afinidad similar a la digoxina. Tras la incubación, las esferas modificadas (poliestireno-seroalbúmina - digoxigenina) son añadidas a la solución para reaccionar completamente con el antígeno fluorescente, posteriormente las partículas de poliestireno son eliminadas mediante centrifugación quedando en la solución solo el anticuerpo fluorescente ligado a digoxina. Por lo que la relación de la señal de fluorescencia del anticuerpo modificado (488 nm) con la señal de fluorescencia de la referencia (680 nm) es proporcional a la concentración de digoxina de la muestra original. La metodología es empleada en el análisis de muestras biológicas obteniendo un intervalo lineal de 0.6–2.6 nM [24].

1.2.2 Métodos espectroscópicos

Las metodologías espectroscópicas de detección de digoxina se basan en la interacción del analito con la radiación en el intervalo de los 200 a los 1000 nm. En espectroscopía UV-Vis, el haz de luz atraviesa una celda de cuarzo que contiene una disolución en presencia del analito, la interacción entre la luz con la molécula produce una excitación de los electrones de valencia propiciado transiciones electrónicas. De la radiación incidida solo una parte llega al detector, lo que se conoce como energía transmitida o transmitancia (T). De manera convencional, la absorbancia (A) que es el resultado de el $-\log$ de la transmitancia ($A = -\log T$) se relaciona con la concentración mediante la ley de Lambert-Beer [25].

Las determinaciones espectroscópicas de digoxina son realizadas principalmente mediante UV-Vis y son cualitativas. Las detecciones se pueden llevar a cabo de forma directa tomando la lectura a 217 nm. Sin embargo, existen inconvenientes debido a que la digoxina presenta un bajo coeficiente de extinción molar [26]. Una alternativa a la detección a 217 nm, es la derivatización del compuesto, por lo que se han planteado diferentes reactivos para la derivatización de digoxina, los cuales pueden reaccionar con el carbohidrato, la lactona o el núcleo esteroideo.

Se han descrito agentes derivatizantes que reaccionen con la trigitoxosa como el propuesto por Mesnard y Devant, en el que tras la adición de ácido periódico los azúcares son oxidados a dialdehídos, la adición de ácido 2-tiobarbitúrico da lugar a un compuesto cromóforo que presenta coloración roja con un máximo de absorción en 520 nm [27].

Los derivados polinitroaromáticos en soluciones alcalinas como el ácido pícrico, el 1,3-dinitrobenzoceno, ácido 3,5-dinitrobenzoico y tetranitrobifenilo han sido descritos para la derivatización de cardenólidos. La reacción con estos compuestos se basa en el enlace carbono-carbono de la lactona insaturada con los agentes derivatizantes. Se han propuesto diferentes mecanismos de reacción, de acuerdo con lo descrito por Kovar *et al.*, el tratamiento con de la lactona con base produce un anión el cual se une a la molécula polinitroaromática. El compuesto resultante es un complejo de Meisenheimer y presenta una longitud máxima de absorción a los 485 nm (Fig. 4) [28].

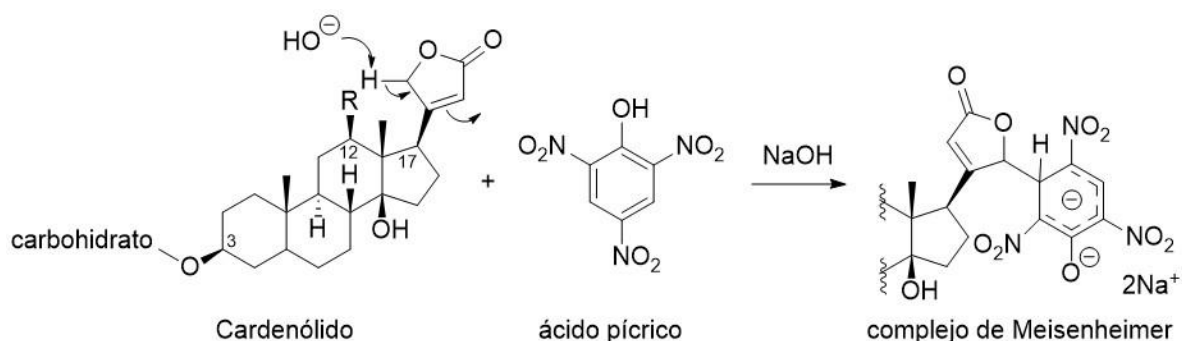


Figura 4. Formación del complejo de Meisenheimer .

Britten *et al.*, proponen una estrategia fluorimétrica para de análisis de digoxina, la cual se basa en la adición de ácido tricloroacético a la muestra, la mezcla se calienta a 130°C por 45 minutos. Tras la reacción se obtiene un compuesto fluorescente, cuya estructura no se ha dilucidado y que tiene un máximo de absorción a 340 nm y máximo de emisión a 420 nm. El ensayo espectroscópico fue empleado para el análisis de formulaciones farmacéuticas obteniendo un intervalo lineal de 0.02 a $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ [29].

El uso de estrategias espectroscópicas en el análisis de digoxina presenta desventajas como la baja selectividad de los métodos al presentar una gran cantidad de interferentes, asimismo presentan baja sensibilidad analítica y no son recomendados para la estimación de glucósidos en muestras biológicas. Pocos métodos son específicos para la digoxina, por lo que el uso de estas técnicas requiere análisis fisicoquímicos complementarios.

1.2.3 Métodos cromatográficos

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés) es una técnica analítica que permite la separación de moléculas en una mezcla. En esta modalidad, la fase móvil acarrea a los componentes de una mezcla a través de una columna (fase estacionaria). La fase estacionaria convencional comprende una columna empacada con partículas de tamaños de 3 a $5 \mu\text{m}$. La muestra para analizar se inyecta en la fase móvil que es transportada a través de la fase estacionaria, la cual de acuerdo con su naturaleza química interactúa con las especies presentes en la solución y posteriormente se eluyen a diferentes tiempos. Los sistemas de detección convencionales en HPLC son el UV-Vis, índice de refracción, fluorescencia y espectrometría de masa [30].

Debido a la gran cantidad de analitos que pueden ser determinados por HPLC se han desarrollado diversas estrategias dependiendo de las propiedades fisicoquímicas de la molécula a analizar. Las diferentes modalidades de la técnica se diferencian en la composición de la fase estacionaria de las cuales destacan 4: cromatografía en fase normal, cromatografía en fase reversa, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de exclusión molecular. De forma general, el análisis de digoxina se lleva a cabo mediante cromatografía en fase reversa, esta se caracteriza por emplear fases estacionarias no polares como octadecilsilano (columna C_{18}) y emplea disolventes polares como agua en mezcla con disolventes orgánicos (acetonitrilo, isopropanol, etanol) [30].

Jedlicka *et al.*, plantean una estrategia cromatográfica para la determinación de digoxina en muestras farmacéuticas empleando como fase móvil una columna C_{18} , como fase móvil una mezcla

de agua:acetonitrilo (72:28), registrando la absorbancia a los 218 nm. La preparación de la muestra consiste en diluirla en HCl 0.01 M seguido de una pre-concentración en un cartucho C_{18} empleando metanol como eluyente. Bajo estas condiciones es posible obtener un intervalo lineal de 60 - 3600 ng mL^{-1} con adecuada exactitud en tabletas [31].

1.2.3.1 Derivatización

La derivatización es un procedimiento común en cromatografía de líquidos, la cual tiene por objetivo proveer o incrementar la señal analítica de un analito, esto adicionando un grupo cromóforo o fluoróforo al analito de interés lo cual le confiere (de forma ideal) altos coeficientes de extinción molar. Las reacciones de derivatización deben de ser rápidas, con excelentes rendimientos y deben darse en condiciones sencillas y en cromatografía de líquidos pueden llevarse a cabo en sistemas pre- y post-columna, aunque en su mayoría se dan en sistemas pre-columna [32].

Los glucósidos cardiacos poseen bajos coeficiente de extinción molar por lo que para obtener metodologías con mejores parámetros analíticos se recomienda sean derivatizados. Estos compuestos tienen uno o más grupos hidroxilo (secundarios) en su estructura lo cual puede ser aprovechado para el diseño de estrategias de derivatización [33].

Los cloruros de acilo han sido empleados para añadir grupos fluoróforos o cromóforos a una gran variedad de alcoholes alifáticos, secundarios o fenoles. El cloruro de naftoilo ha sido empleados en la derivatización de digoxina y su determinación en HPLC-UV obteniendo límites de detección de hasta 0.25 nmol mL^{-1} (Figura 5) [34]. También ha sido empleado el 9-fluorenilmetil cloroformiato para la detección de analitos por fluorescencia registrando la señal de emisión a los 305 nm alcanzando límites de detección de 50 mg kg^{-1} [35].

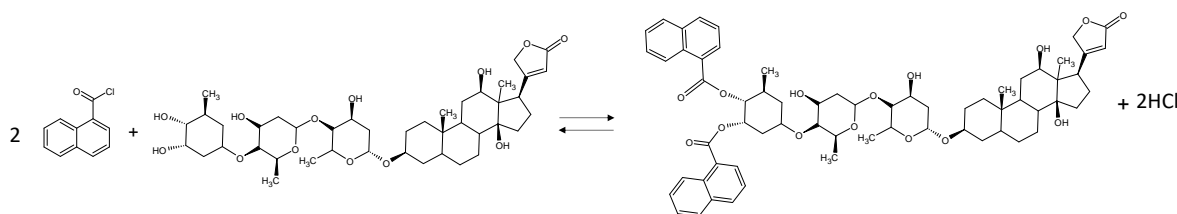


Figura 5. Reacción de derivatización de digoxina empleando cloruro de naftoilo.

1.2.4 Cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas

La espectrometría de masas es una técnica analítica que ha sido acoplada a HPLC para el análisis de muestras complejas. La técnica se basa en la ionización de moléculas y separación de iones de acuerdo con su relación masa/carga. El instrumento consta de tres módulos los cuales son la fuente de ionización, el analizador de masas y el detector. Esta técnica presenta gran sensibilidad, requiere una muestra pequeña en comparación a otras técnicas de detección [36].

Yao et al., describe el desarrollo de una metodología HPLC-MS, la separación se lleva a cabo empleando una columna en fase reversa (C_{18}) y acetonitrilo/formiato de amonio 5 mM pH=3.4 como fase móvil. Tras la separación, las especies se ionizan empleado una fuente de ionización a presión atmosférica, y registrando el ión con $m/z=798.6$ relacionando a la formación de un aducto digoxina-

amonio. La estrategia fue empleada en la determinación de digoxina en suero de ratas encontrando límite de detección de 0.1 ng mL^{-1} y recobros en el intervalo de 82.7 a 105.9% [37].

La espectrometría de masas ha sido acoplada a sistemas de cromatografía de líquidos de ultra alta presión (UHPLC), en este sentido Ballotari *et al.*, desarrolló una estrategia basada en la separación de la muestra mediante fase inversa empleando una columna C_{18} (2.1 x 50 mm, 1.7 mm d.i.) como fase estacionaria y la separación en gradiente empleando formiato de amonio 5 mM y ácido fórmico 0.01% y ácido fórmico al 0.1 % en acetonitrilo. Tras la separación las especies fueron ionizadas mediante la técnica de electrospray obteniendo señales a diferentes relaciones m/z (798.6, 651.6, 391.1 y 243.3). La estrategia desarrollada es usada para el análisis de digoxina en muestras sanguíneas, obteniendo un intervalo lineal de 0.25 a 50 ng mL^{-1} . Los valores obtenidos por la metodología fueron comparados con inmunoensayos de laboratorios clínicos, sin embargo, se observa una discordancia entre valores a lo cual atribuida a un error sistemático [38].

Aunque la cromatografía de líquidos ha tenido una gran relevancia en los últimos años debido principalmente a los límites de detección, la mayoría de los laboratorios no cuenta con este equipo debido a la infraestructura y costo que representa, aunado a que es necesaria una fuente de electricidad estable y fiable, gases de alta pureza, así como personal altamente calificado para la operación.

1.2.5 Electroforesis capilar

La electroforesis capilar comprende un grupo amplio de técnicas analíticas de separación que se basa en la separación de especies químicas debido a su relación masa/carga bajo la influencia de un potencial eléctrico. De forma general, las separaciones se llevan a cabo dentro de un tubo capilar con dimensiones de diámetro interno en el orden de 10 a $200 \mu\text{m}$, el cual se llena con solución de un electrolito soporte (solución amortiguadora) o una mezcla de agentes que favorezcan la separación de los analitos. Tras la inyección de la muestra a analizar se aplica un potencial eléctrico a través del capilar lo cual induce 2 fenómenos electrocinéticos, la electroforesis y el flujo electroosmótico [39]. La electroforesis comprende el transporte de analitos con carga o iones y el flujo electroosmótico hace referencia al flujo del disolvente que permite la movilidad de las especies neutras en el capilar [40]. El uso de electroforesis capilar en análisis químicos cuantitativos se ha incrementado debido a su gran eficiencia y bajos volúmenes de muestra requerido, sin embargo, el estrecho paso óptico (debido al diámetro interno del capilar) conlleva a obtener bajas sensibilidades analítica [41].

Debido a que la digoxina carece de carga se han propuesto el uso de surfactantes con el objetivo de obtener micelas que permitan la migración del analito en estrategias electroforéticas como la cromatografía electrocinética micelar para su cuantificación (MECK, por sus siglas en inglés). Guijarro-Díez *et al.*, describen una estrategia de análisis de digoxina y digoxigenina en muestras de orina basada en el uso de una extracción de fase sólida empleando polímeros molecularmente impresos y MECK. En el proceso de separación se emplea dodecilsulfato de sodio 100 mM como surfactante en el electrolito soporte (solución amortiguadora de fosfatos 50 mM pH 2.5 y 5% (v/v) de acetonitrilo). Tras la inyección de la muestra se realiza la separación en potencial normal a 30 kV, registrando la señal analítica a 223 nm. La metodología presenta LOD de 0.30 mg L^{-1} , con una

recuperación en el intervalo de 95.4 a 96.5% en muestras dopadas a 8 y 40 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente [42].

1.2.5.1 Derivatización en electroforesis capilar

Al igual que la cromatografía de líquidos, la derivatización se basa en el uso de reactivos químicos para proporcionar al analito de interés un grupo cromóforo que permita su detección mediante una técnica espectroscópica como UV-Vis o fluorescencia, en electroforesis capilar también puede conferírle carga al analito para favorecer su separación. La derivatización se puede llevar a cabo antes, durante o posterior a la separación y su uso depende de los instrumentos disponibles, la estabilidad del producto obtenido, el volumen y número de muestras, los límites de detección, etc. [43].

Cuando la reacción de derivatización se lleva a cabo previo a la separación electroforética se denomina derivatización pre-capilar, esta estrategia es la más empleada en electroforesis y los componentes de la reacción se mezclan previo al análisis, en este método diferentes variables como tiempo y temperatura pueden ser evaluados [44].

La derivatización post-capilar se lleva a cabo en una etapa posterior a la separación electroforética. Esta modalidad es empleada principalmente cuando el compuesto derivatizado no es estable. La mayor desventaja de esta modalidad es el equipo adicional que se requiere como un reactor. En cuanto a esta modalidad no existen trabajos relacionados a digoxina o glucósidos puesto que su uso se enfoca mayoritariamente en proteínas o aminoglucósidos, en las que se emplea naftaleno-2,3-dicarboxaldehído el cual reacciona con aminas primarias lo cual produce un compuesto fluorescente [45].

La derivatización en capilar (InCapD) es un procedimiento en el cual el analito y el agente derivatizante son inyectados al sistema electroforético por presión hidrodinámica. Dentro del capilar la derivatización se lleva a cabo durante la separación debido a la difusión o a diferencias en la movilidad electroforética de las especies. En comparación a una derivatización convencional la derivatización en capilar permite un menor gasto de reactivos. La derivatización se puede llevar a cabo en la modalidad tandem (muestra/derivatizante o derivatizante/muestra) o modalidad sándwich (derivatizante/muestra/derivatizante) (Figura 6) [46,47].

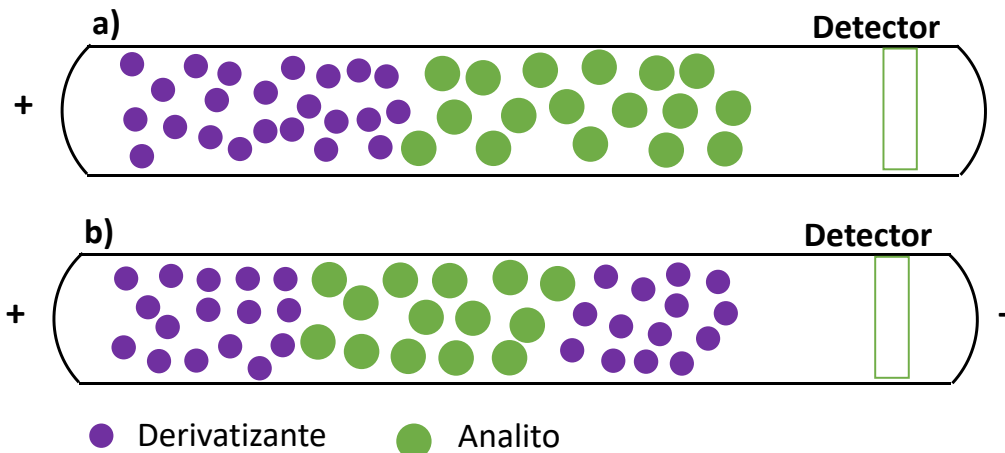


Figura 6. Modalidades de inyección para derivatización en capilar a) tándem y b) sándwich

Akamatsu *et al.*, describen el uso de o-ftalaldehído como agente derivatizante y ácido 3-mercaptopropiónico para la determinación de glucosamina en productos comerciales. En la metodología la muestra es inyectada y posteriormente la disolución que contiene el agente derivatizante. Durante la separación se forma un aducto entre la glucosamina y agente derivatizante el cual se detecta a los 340 nm obteniendo límites de detección de 1.3 mg g^{-1} [48].

En la bibliografía no existen procesos de derivatización para digoxina, sin embargo, se han descrito diferentes agentes derivatizantes entre los que destacan los ácidos borónicos para moléculas que contienen sistemas 1,2-diol como carbohidratos. Kubo *et al.*, desarrollaron una estrategia para determinar diferentes carbohidratos como el meso-eritritol, L-(-) arabitol, xilitol, manitol, galactitol, sorbitol, glucosa, ácido N-acetilneuramínico, manosa y fructosa empleando ácido isoquinolina-5-borónico como agente derivatizante. Los productos obtenidos pueden ser detectados tras la separación (15 kV) por fluorescencia empleando una longitud de onda de excitación 273 nm y registrando la señal de emisión a 347 nm. La metodología permite obtener límites de detección de hasta $15 \text{ }\mu\text{M}$ y el autor describe un potencial uso en muestras biológicas [49].

1.2.6 Técnicas de preconcentración en electroforesis capilar

Con el objetivo de incrementar la sensibilidad analítica y la resolución se han desarrollado diversas técnicas de preconcentración de muestra como preconcentración por volumen de muestra, preconcentración por barrido, inyección de muestra por campo amplificado (FASS), etc. Las técnicas de concentración permiten concentrar la muestra de interés en un espacio estrecho del capilar en una etapa previa a la separación y detección, al manipular el potencial eléctrico del medio [50].

1.2.6.1 Preconcentración por volumen de muestra

La preconcentración por volumen de muestra (LVSS por sus siglas en inglés) es una estrategia de varias etapas que se emplea en electroforesis capilar de zona con el objetivo de mejorar los parámetros analíticos de las metodologías. La técnica consiste en inyectar al capilar un electrolito soporte mediante presión hidrodinámica, posteriormente se llena el capilar hasta un 90% de su capacidad con la muestra a analizar (Fig. 7.a), para aplicar voltaje en polaridad inversa (Fig. 7.b),

validación en las áreas antes mencionadas. Desarrollos recientes en el diseño y síntesis de nanomateriales han permitido diversas aplicaciones en ciencias bioanalíticas [52].

Las nanopartículas de materiales semiconductores son una clase de materiales obtenidos a partir de materiales átomos del grupo II y IV (ej. CdSe) o III y V (ej. InP) con tamaños promedio entre 2 y 10 nm. Estas nanopartículas exhiben propiedades fluorescentes con características ópticas únicas que no se observan en los compuestos cuando se encuentran de forma macroscópica. Estos nanomateriales exhiben propiedades como gran área superficial, fluorescencia, gran estabilidad química y es posible la modificación de la superficie. La longitud de onda de emisión de las nanopartículas es dependiente de su tamaño, por lo que al incrementar el tamaño se puede ajustar la longitud de onda de emisión desde la luz ultravioleta (UV) hasta el infrarrojo cercano (NIR). A diferencia de las moléculas orgánicas fluorescentes y proteínas fluorescentes, las nanopartículas presentan excelentes rendimientos cuánticos (QY, por sus siglas en inglés) que es la relación entre los fotones absorbidos y los fotones emitidos, grandes coeficientes de extinción molar, son altamente luminiscentes y fotoestables, lo que los hace ideales para ser incorporados en sistemas de detección bioanalíticos [53].

Debido a lo anterior, la incorporación de nanopartículas en aplicaciones analíticas se ha incrementado en la última década. En el desarrollo de la metodología analítica es importante considerar diferentes variables como las propiedades fisicoquímicas de las nanopartículas, así como la interacción que puede existir con el analito. En los últimos años, numerosos métodos espectroscópicos han sido desarrollados para el análisis de analitos inorgánicos y orgánicos de interés biológicos, ambiental, farmacéutico y alimenticio, en el que diferentes interacciones analito-nanopartícula pueden presentarse, los ejemplos más claros son transferencia de energía de resonancia Förster, transferencia de electrón foto-inducida, inmunoensayos, abatimiento por agregación e incremento de la señal de fluorescencia por pasivación, entre otros [54].

1.2.7.1 Partículas binarias

Se han sintetizado una gran variedad de nanopartículas de materiales semiconductores, en los que destacan los compuestos binarios de CdSe, CdTe, ZnSe, CdS así como InP. Al recubrir el núcleo sintetizado con capas o una "coraza" de CdS o ZnS se le confiere a la nanopartícula una mayor fotoluminiscencia, resultado de un mayor confinamiento de los electrones al núcleo [55]. A estas estructuras se les conoce como núcleo/coraza. A las nanopartículas sintetizadas generalmente se les adiciona un agente ligante con la finalidad de estabilizar la dispersión en medio acuoso. Entre los ligantes más utilizados se encuentran el ácido tioglicólico, ácido mercaptopropiónico, la glutatióna, la cisteína, entre otros. Además, la funcionalización de los ligantes con grupos amino o carboxílicos les confieren especificidad a analitos de interés (Figura 8) [56].

En el análisis químico las nanopartículas binarias son los mayoritariamente empleados, sin embargo la presencia de metales pesados en su estructura como Cd(II) o Pb (II) en nanopartículas de CdTe, CdS o PbS, los hacen tóxicos para los humanos y causan contaminación en el ambiente, por lo que es necesaria una alternativa con las mismas propiedades espectroscópicas [57].

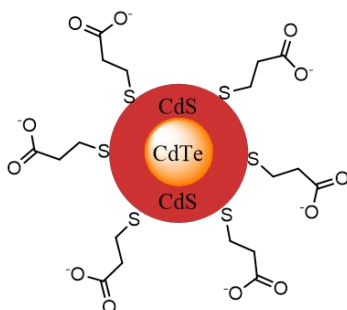


Figura 8. Nanopartículas binarias de CdTe/CdS estabilizadas con ácido mercaptopropiónico

1.2.7.2 Partículas ternarias

Una alternativa a las nanopartículas binarias son las nanopartículas ternarias, las cuales son nanomateriales novedosos que han sido empleados en el análisis químico y fueron introducidas en la última década debido a sus propiedades fisicoquímicas y espectroscópicas similares a las nanopartículas de Cd (II) y Pb(II). Las nanopartículas de materiales semiconductores (AgInS_2 , CuInS_2 o AgInSe) estabilizadas con un agente ligante (ácido 3-mercaptopropiónico, cisteína, glutatión) exhiben fluorescencia cuando se encuentran en dimensiones nanométricas (1-100 nm), estas estructuras conocidas como núcleos pueden emitir luz en el espectro visible y hasta el infrarrojo cercano. En ocasiones, a los núcleos se les adiciona una coraza de ZnS con el objetivo de incrementar su estabilidad fisicoquímica y propiedades fotoluminiscentes (Figura 9) [54, 58].

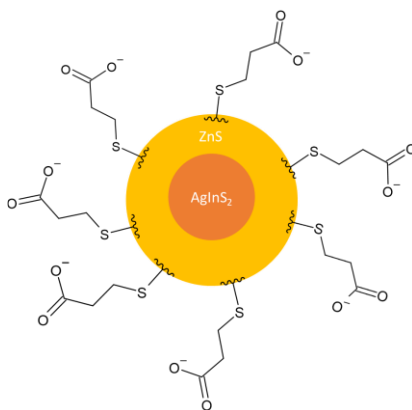


Figura 9. Nanopartículas ternarias de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ estabilizadas con ácido 3-mercaptopropiónico.

En la literatura no existen trabajos en las que se empleen estos materiales para la detección de digoxina, sin embargo, Joshi *et al.* (2023), emplean nanopartículas fluorescentes de óxido de molibdeno funcionalizadas con sero-albúmina bovina. La detección de digoxina se basa en el abatimiento de la señal de fluorescencia a los 406 nm debido a la agregación de las nanopartículas. La metodología fue empleada en el análisis de muestras farmacéuticas y biológicas obteniendo un intervalo lineal de trabajo de 1–25 μM [59].

1.2.7.3 Uso de nanopartículas en la detección de carbohidratos

El uso de nanopartículas binarias y ternarias en el análisis de carbohidratos se ha descrito bajo diferentes mecanismos de análisis.

Chen et al., describen la detección de ácido N-acetilneuramínico empleando nanopartículas núcleo/coraza de CdSe/ZnS. La estrategia se basa en un mecanismo de transferencia de electrón por resonancia Förster (FRET) de abatimiento de la señal de emisión de las nanopartículas por el compuesto Black Hole Quencher-2, tras la adición del analito se recupera la fluorescencia original de las nanopartículas. La metodología espectrofluorimétrica permite obtener un límite de cuantificación en el orden de pM [60].

La funcionalización de nanopartículas ternarias es una alternativa que ofrece cierta selectividad, Liu *et al* describe la funcionalización de nanopartículas de CuInS₂ con ácido 3-amino-bencenborónico para la detección de glucosa. Las nanopartículas presentan fluorescencia a los 742 nm que al estar funcionalizados con el ácido borónico estos se complejan con la glucosa al tener un sistema 1,2-diol lo que produce un abatiendo la señal de fluorescencia. La metodología fue empleada para el análisis de glucosa en suero sanguíneo obteniendo límites de detección de 5 μM [61].

Con base en lo anterior se plantea el desarrollo de metodologías espectrofluorimétricas diseñadas para el análisis de digoxina mediante el uso de nanopartículas de materiales semiconductores empleando nanopartículas de AgInS₂/ZnS, basado en la interacción nanopartículas-analito.

Objetivos

2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar y validar metodologías analíticas para determinar digoxina en muestras complejas.

2.2 Objetivos específicos

1. Evaluar las condiciones de separación en CZE con detección UV del complejo boronato-digoxina y validar las metodologías de análisis de digoxina siguiendo el protocolo establecido por la IUPAC.
2. Sintetizar, caracterizar y evaluar nanopartículas ternarias de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ en el desarrollo de estrategias de análisis espectrofluorimétricas en sistemas estándar.
3. Diseñar y validar una metodología analítica para la determinación de digoxina en muestras farmacéuticas y biológicas empleando nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ funcionalizadas con ácido 4-aminofenilborónico.

***Desarrollo de metodologías
electroforéticas en el análisis de
digoxina***

3. Desarrollo de metodologías electroforéticas en el análisis de digoxina.

3.1 Antecedentes

El uso de agentes derivatizantes en electroforesis capilar es común en el análisis de carbohidratos en las que destaca el uso de compuestos fluoróforos como el ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico, el cual permite obtener una amina tras una reacción de aminación reductiva con el carbohidrato mediada por cianoborohidruro de sodio como agente reductor (Figura 10). Sin embargo, el uso de este tipo de estrategias de derivatización conlleva a múltiples desventajas como el uso de agentes corrosivos y tóxicos, por lo que es necesario el desarrollo de técnicas analíticas que permitan la derivatización de carbohidratos en condiciones de reacción menos drásticas.

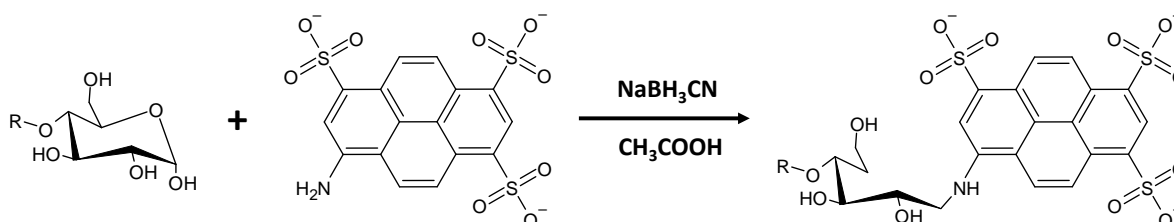


Figura 10. Aminación reductiva entre carbohidratos y ácido 8-aminopireno-1,3,6-trisulfónico empleando cianoborohidruro de sodio como agente reductor [62].

Una alternativa de derivatización es la síntesis de boronatos empleando ácidos borónicos, los cuales son compuestos orgánicos que han sido empleados en el desarrollo de estrategias de análisis de azúcares y de moléculas con sistemas 1,2-cis y 1,3-cis diol en medio acuoso. Cuando el valor de pH del medio es ≥ 10.0 , predomina el anión boronato y es capaz de formar complejos con moléculas que contienen un grupo cis,1-2, diol, observándose cambios en la carga y las propiedades espectroscópicas del analito permitiendo su incorporación en sistemas de separación como electroforesis capilar (Fig. 11) [63].

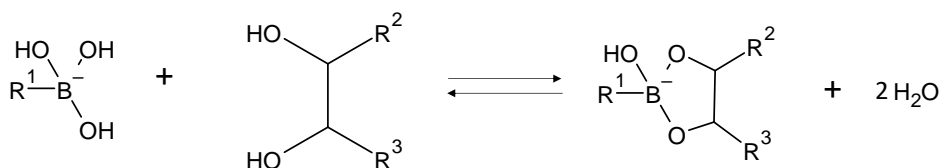


Figura 11. Reacción de condensación entre el ion boronato y un diol.

Los complejos boronato-carbohidrato al presentar carga y adecuados valores de coeficientes de extinción molar pueden ser separados mediante electroforesis capilar en muestras complejas y pueden ser detectados en el espectro UV. Existen pocas metodologías en la que se integran esta

reacción en sistemas de electroforesis capilar. Lü *et.al.* emplearon electroforesis capilar de zona para determinar constantes de afinidad entre diferentes ácidos borónicos (ácido fenilborónico, ácido 3-carboxifenilborónico y ácido butilborónico) y azúcares, nucleósidos y glicoproteínas, encontrando valores de constantes de afinidad mayores conforme se incrementa el valor de pH en los sistemas evaluados [64]. En el presente capítulo se propone el uso del ácido 2-naftilborónico (2-NBA) y ácido *o*-tolilborónico (*o*-TBA) como agentes derivatizantes de digoxina (Figura 12. a y b) y su separación por electroforesis capilar en diferentes modalidades en matrices farmacéuticas y biológicas.

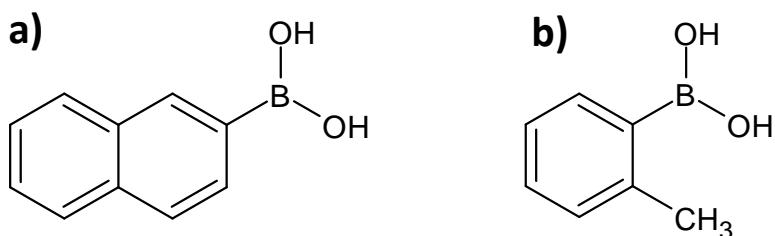


Figura 12. Estructura de a) ácido 2-naftilborónico y b) ácido *o*-tolilborónico

3.2 Parte experimental

3.2.1 Reactivos y equipos.

Las disoluciones empleadas se prepararon usando agua con resistividad no menor a 18.0 M Ω cm, obtenida de un sistema Milli-Q academic (Millipore, Bedford, MA, USA), los estándares de digoxina así como las muestras farmacéuticas se prepararon en metanol grado HPLC. El electrolito de trabajo se preparó a partir de fosfato de sodio dibásico trihidratado (Sigma Aldrich). El ácido 2-naftilborónico, ácido *o*-tolilborónico, *p*-nitrofenol (estándar interno), 2-propanol fueron adquiridos de Merck. El hidróxido de potasio y acetato de amonio fueron adquiridos de J.T. Baker. El diclorometano fue adquirido de disolventes TEDIA (Fairfield, OH, USA). Los cartuchos de extracción en fase sólida empelado fueron marca Waters (Oasis HLB, 3 cc; 60 mg).

Los espectros de resonancia magnética nuclear de ^{11}B se obtienen en un espectrómetro Bruker 400 MHz (Madison, WI, USA) y los datos obtenidos fueron analizados empleando el software MestReNova (Versión . 6.0.2-5475, Mestrelab Research). Los experimentos electroforéticos fueron realizados en un equipo Beckman Coulter PA 800 plus (Fullerton, CA, USA) empleando un detector de arreglo de diodos. Los electroferogramas obtenidos fueron analizados empleando el software 32 Karat.

3.2.2 RMN ^{11}B de sistemas boronato-digoxina

Las interacciones entre 2-NBA y *o*-TBA fueron evaluadas mediante ^{11}B RMN. Los ácidos borónicos 2-NBA y *o*-TBA (2mg) fueron disueltos en 0.8 mL de NaOH 0.1 M preparado en agua deuterada y la solución fue colocada en tubos de RMN. Tras la obtención de los espectros individuales, se adicionaron 8 mg de digoxina en los tubos para su análisis.

3.2.3 Preparación de muestras farmacéuticas y biológicas

Tres muestras farmacéuticas comerciales en forma de tableta fueron seleccionadas para el análisis de contenido de digoxina empleando las metodologías desarrolladas. Las tabletas (0.12 g) fueron pulverizadas empleando un mortero con pistilo, posteriormente fueron pesadas y colocadas en tubos de centrífuga (15 mL). Posteriormente se añadió 10 mL de metanol para la extracción de digoxina, los tubos fueron agitados mecánicamente por 10 minutos y la solución se hizo pasar a través de un filtro Whatman 1442-042 (tamaño de poro: 2.5 μm). El metanol fue evaporado y la digoxina fue reconstituida en 10 mL de agua. 0.8 mL de muestra fue mezclada con *p*-nitrofenol (40 μM) y agua aforando a un volumen final de 2.0 mL para el análisis electroforético.

Las muestras de suero sanguíneo son pretratadas de acuerdo con lo descrito por Lu *et al.*, con ligeras modificaciones: 1.0 mL de suero sanguíneo fue dopado con digoxina (2, 3 y 4 μM) y diluido con 3.5 mL de agua y 0.5 mL de acetato de amonio (2.0 M, pH=9.5), las muestras fueron agitadas mecánicamente por 10 minutos y posteriormente centrifugadas a 2500 rpm por 20 minutos. Posteriormente las muestras se trataron mediante extracción en fase sólida empleando la siguiente metodología: en una primera etapa los cartuchos se acondicionaron haciendo pasar metanol (2 mL) seguido de agua desionizada (2 mL) y posteriormente acetato de amonio (4 mL, 0.1 M, pH=9.5). A continuación, se hizo pasar la muestra (diluida y centrifugada) donde la digoxina fue retenida en la fase sólida. Con la finalidad de eliminar posibles interferentes que se quedaron en la fase líquida remanente, se llevó a cabo un lavado haciendo pasar a través del cartucho 2 mL de una disolución de acetato de amonio (0.1 M, pH=9.5). La elución de la digoxina se realizó haciendo pasar 3 mL de diclorometano:2-propanol (95:5). La fase líquida (con el analito disuelto) fue evaporada a sequedad y el residuo sólido fue reconstituido en 1.0 mL de una disolución acuosa de *p*-nitrofenol (40 μM), filtrado empleando una membrana de 0.45 μm y reservado para el análisis mediante electroforesis capilar.

3.2.4 Análisis de boronatos en sistemas de electroforesis capilar

En el desarrollo de una metodología de separación por electroforesis capilar es de importancia evaluar las diferentes variables que existen en la separación para definir en cuales se obtienen mejores parámetros como resolución, tiempo de separación, sensibilidad y precisión. Las condiciones análisis deben seleccionarse de forma que permitan una detección estable y sencilla del analito.

El presente trabajo propone dos estrategias de análisis, en primera instancia se plantea la separación de boronatos mediante electroforesis capilar de zona, para ello se evalúa la composición del electrolito de trabajo y su efecto en la separación, los componentes evaluados fueron: 1) los componentes de del electrolito de trabajo (fosfatos y glicina) con la finalidad de que permitan mantener el valor de pH y proporcione la conductividad requerida, 2) el pH de trabajo debido que la forma química (y la carga) de los analitos puede modificarse, 3) el uso de disolventes orgánicos y/o surfactantes que permitan modificar la viscosidad del medio y 4) selección del estándar interno que permita la correcta cuantificación del analito. Las mejores condiciones de derivatización pre-capilar fueron: disolución estándar que consta de una mezcla de 2-NBA o *o*-TBA (0.5 mM), digoxina (0 μM - 96 mM) y *p*-nitrofenol (150 μM). El electrolito de trabajo está compuesto de fosfatos (pH = 12.0, 30 mM), la muestra es inyectada al capilar por presión positiva (0.5 psi, 5 segundos) para posteriormente realizar la separación en polaridad positiva aplicando un voltaje de

14 kV durante 5 minutos. La señal analítica se registra empleado como detector el arreglo de diodos a los 225 nm.

La segunda estrategia se basa en diseño de una metodología de derivatización en capilar empleando preconcentración por volumen de muestra en electroforesis capilar de zona con detección UV (InCapD-LVSS-CZE-UV), una vez establecidas las condiciones de separación se evalúa el uso de una derivatización y preconcentración en línea, para ello se lleva a cabo la inyección hidrodinámica de la muestra que contiene el analito de carga neutra y posteriormente del derivatizante a pH básico con el objetivo de que el complejo de boronatos se encuentre en su forma aniónica. Tras la aplicación de voltaje en polaridad negativa, la digoxina tendrá una mayor movilidad hacia el cátodo lo que permite su movilidad a través del agente derivatizante propiciando la formación del complejo boronato-digoxina y su preconcentración al inicio del capilar (InCapD-LVSS-CZE-UV) para su posterior separación y análisis.

Las condiciones de análisis propuestas para el sistema combinado son: inyección hidrodinámica (20 psi, 30 segundos) una solución que contiene digoxina (0 - 50 μ M), *p*-nitrofenol (65 μ M) y solución de fosfatos (3 mM, pH=12.0), a continuación, se introduce la disolución de derivatizante (2-NBA u *o*-TBA, 0.3 mM). Una vez contenidas ambas disoluciones en el capilar, se aplica un potencial de 8 kV (polaridad negativa) durante 51 segundos, produciéndose una preconcentración y derivatización en modalidad tándem (muestra/derivatizante). En la etapa final se lleva a cabo la separación en polaridad positiva (14 kV, 5 minutos), registrando la señal a una longitud de onda de 225 nm (Figura 13).

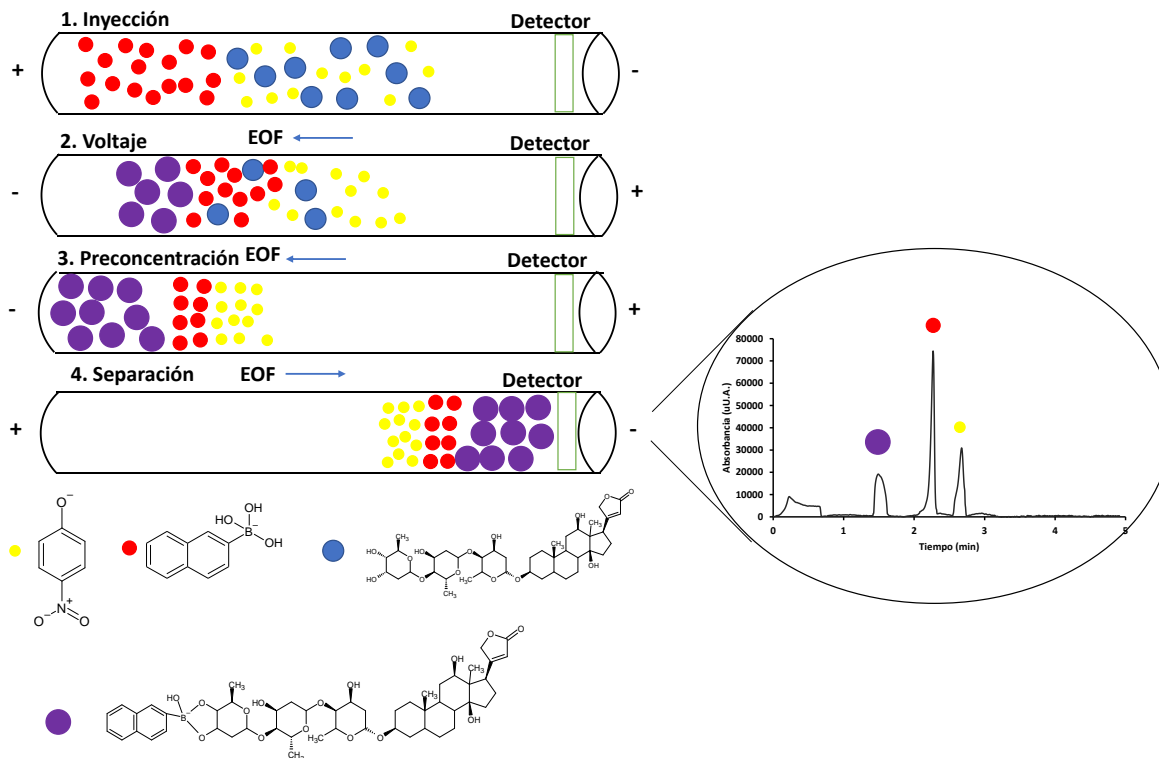


Figura 13. Etapas de análisis de digoxina mediante InCapD-LVSS-CZE-UV

3.3 Resultados y discusión

3.1.1 Espectros de ^{11}B RMN de sistemas boronato-digoxina

En la Figura 14.a se presenta el espectro ^{11}B -RMN del anión boronato correspondiente a 2-NBA en pH básico, en la cual se observa una señal a 2.97 ppm indicativo de la presencia de especie tetraédrica. Tras la adición equimolar de digoxina la señal de boro se desplaza a frecuencias mayores (5.38 ppm) para 2-NBA. Asimismo, se observa un comportamiento análogo en *o*-TBA (Fig. 14.b) la señal de boro se desplaza de 2.98 ppm a 5.21 ppm tras la adición de digoxina. Valenzuela *et. al*, describen que los ácidos **borónicos** presentan una hibridación sp^2 cuya reactividad hacia los dioles es baja, sin embargo, cuando se encuentran como boronatos, en forma tetraédrica, la interacción hacia los dioles se ve favorecida [65].

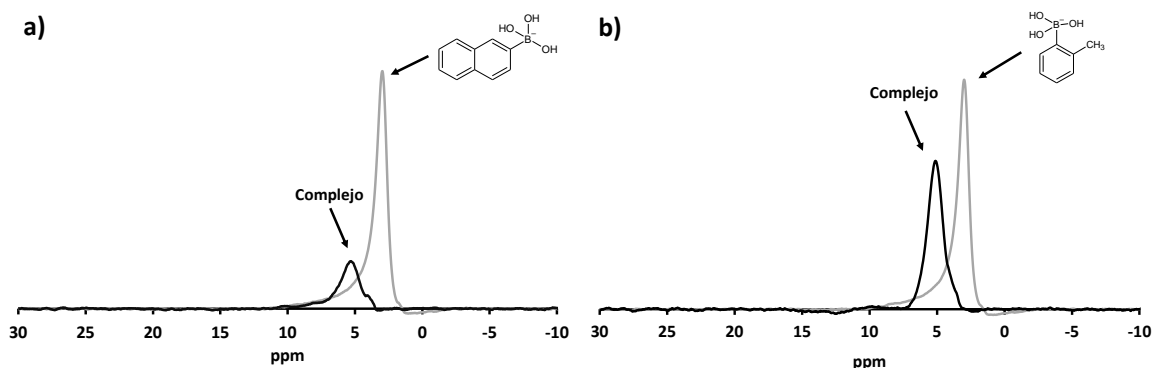


Figura 14. ^{11}B RMN de boronatos a)2-NBA, b)*o*-TBA

La formación de complejos boronato-diol produce un desplazamiento de la señal analítica a frecuencias mayores, Martínez-Aguirre *et al.*, describe el desplazamiento de la señal de boro del ácido 2-fluorofenil borónico (1.57 ppm) a frecuencias mayores (5.88 ppm) tras la formación del complejo con pinanediol. En este sentido, los espectros de ^{11}B RMN sugieren la formación de los complejos de digoxina con 2-NBA y *o*-TBA [66].

3.3.2 Evaluación de condiciones de separación del sistema boronato-digoxina pre-capilar

Como se ha mencionado previamente, es posible la formación del complejo boronato-diol mediante la reacción entre un ácido borónico y compuestos con sistemas 1,2-cis-diol a $\text{pH} \geq 10.0$, por lo que se propone el uso de 2-NBA y *o*-TBA como agentes de derivatización de digoxina y la separación de las diferentes especies involucradas por electroforesis capilar de zona (Fig. 15) [67].

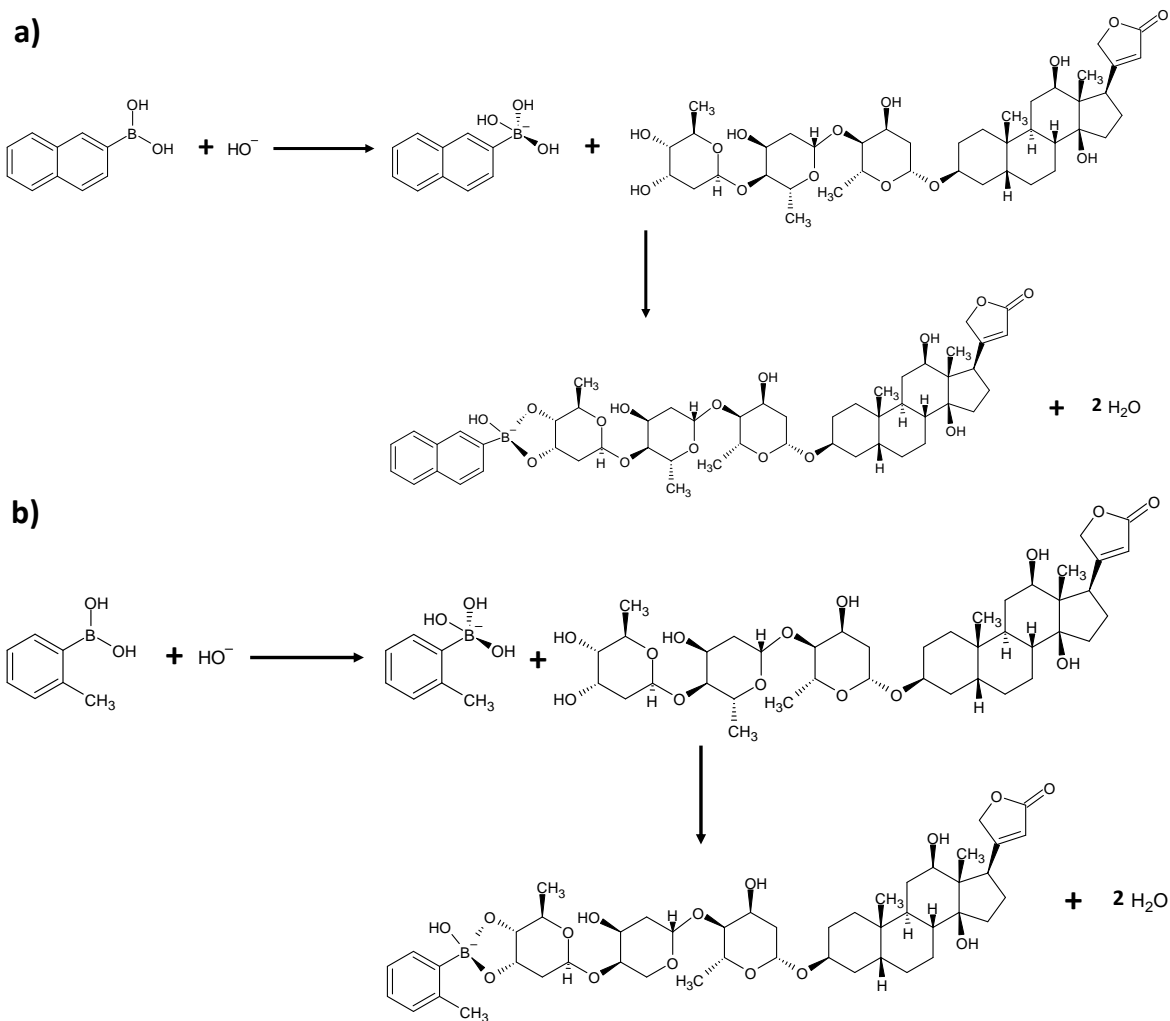


Figura 15. Equilibrio ácido-base y reacciones de derivatización propuestas de a) 2-NBA-digoxina y b) o-TBA-digoxina

El parámetro inicial para evaluar fue el pH, debido a que de acuerdo con la literatura es relevante para la formación de la especie aniónica del ácido borónico y la que permite la formación del complejo boronato-digoxina [65]. En la Figura 16 se presentan los electroferogramas del complejo y el 2-NBA. A pH de 9.0 y 10.0 se observa que existen dos señales tras un minuto de separación, sin embargo, no se obtiene una buena resolución. En el pH=11.0 solo se observa una pequeña señal a los 1.4 minutos y una señal a los 2.1 minutos atribuidos al complejo y derivatizante, respectivamente. En el pH=12.0 se observan 2 señales a los 1.6 y 2.3 minutos, atribuidos al complejo y al boronato respectivamente. Brooks *et al.* describen que las constantes de formación del complejo incrementan con el valor de a pH lo que se observa en el incremento de la primera señal, por lo que se elige la solución amortiguadora de fosfatos 30 mM, pH=12.0 para llevar a cabo los análisis posteriores [68].

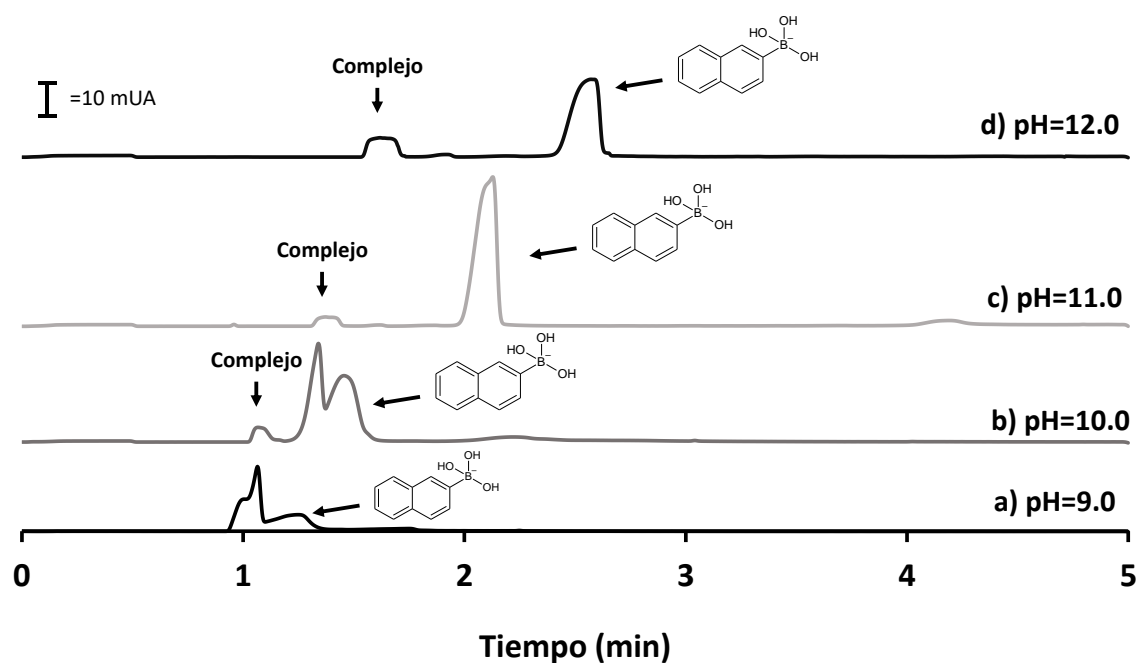


Figura 16. Electroferogramas de boronato y complejo a pH= a) 9.0, b) 10.0, c) 11.0 y d) 12.0.

Tras evaluar el pH se llevó a cabo la selección de un estándar interno. En la Figura 17, se muestran los electroferogramas del boronato formado pH=12.0 en presencia de los estándares evaluados: ácido cafeico (a), ácido gálico (b) y *p*-nitrofenol (c). En los tres electroferogramas se observan 2 señales tras los dos minutos de análisis, correspondientes al boronato y al estándar evaluado. De los estándares evaluados se elige el uso de *p*-nitrofenol debido a que se observa una mayor resolución en comparación al ácido cafeico y al ácido gálico.

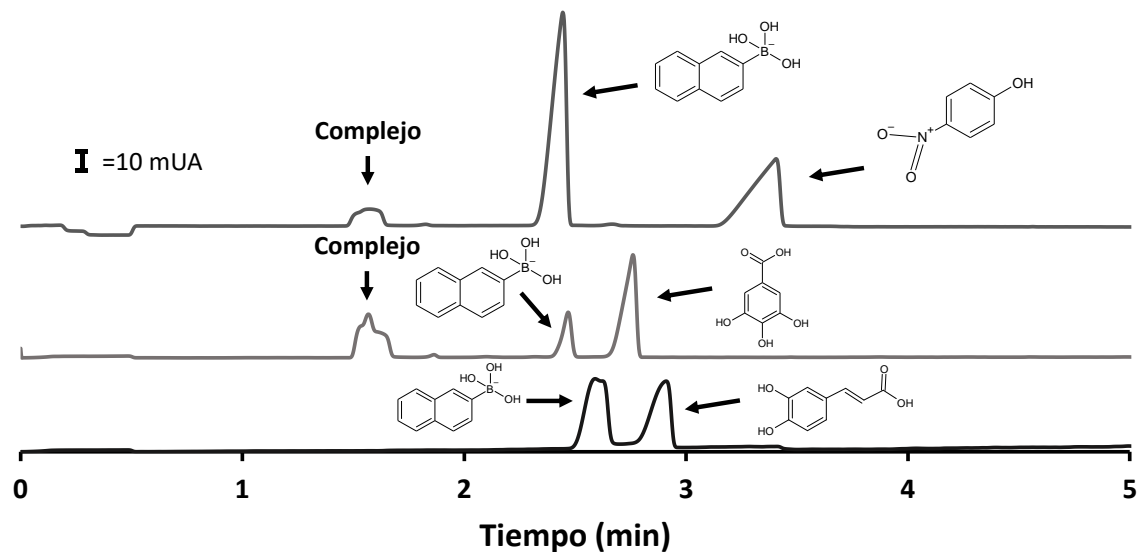


Figura 17. Electroferogramas de ácido borónico y de estándar interno a) ácido cafeico, b) ácido gálico y c) p-nitrofenol.

Tras la selección del estándar interno se evaluaron diferentes estrategias de separación. En la Figura 18, se muestran los electroferogramas de las condiciones evaluadas a) solución amortiguadora de fosfatos 30 mM pH=12.0, b) a + metanol 3%, c) a+ isopropanol, d) a+ acetonitrilo y e) a+ SDS 5 mM. Se observa que cuando se ocupan co-solventes (b, c y d) los tiempos de migración de las especies incrementan en comparación con a, siendo el metanol el cosolvente que permite incrementar los tiempos de análisis y de esta forma obtener mejor resolución [69]. En el electroferograma se observan 3 señales asociadas al analito derivatizado (1.5 min), derivatizante (2.6 min) y estándar interno (2.8 min.), sin embargo, se observa una disminución en la señal analítica del agente derivatizante y del complejo.

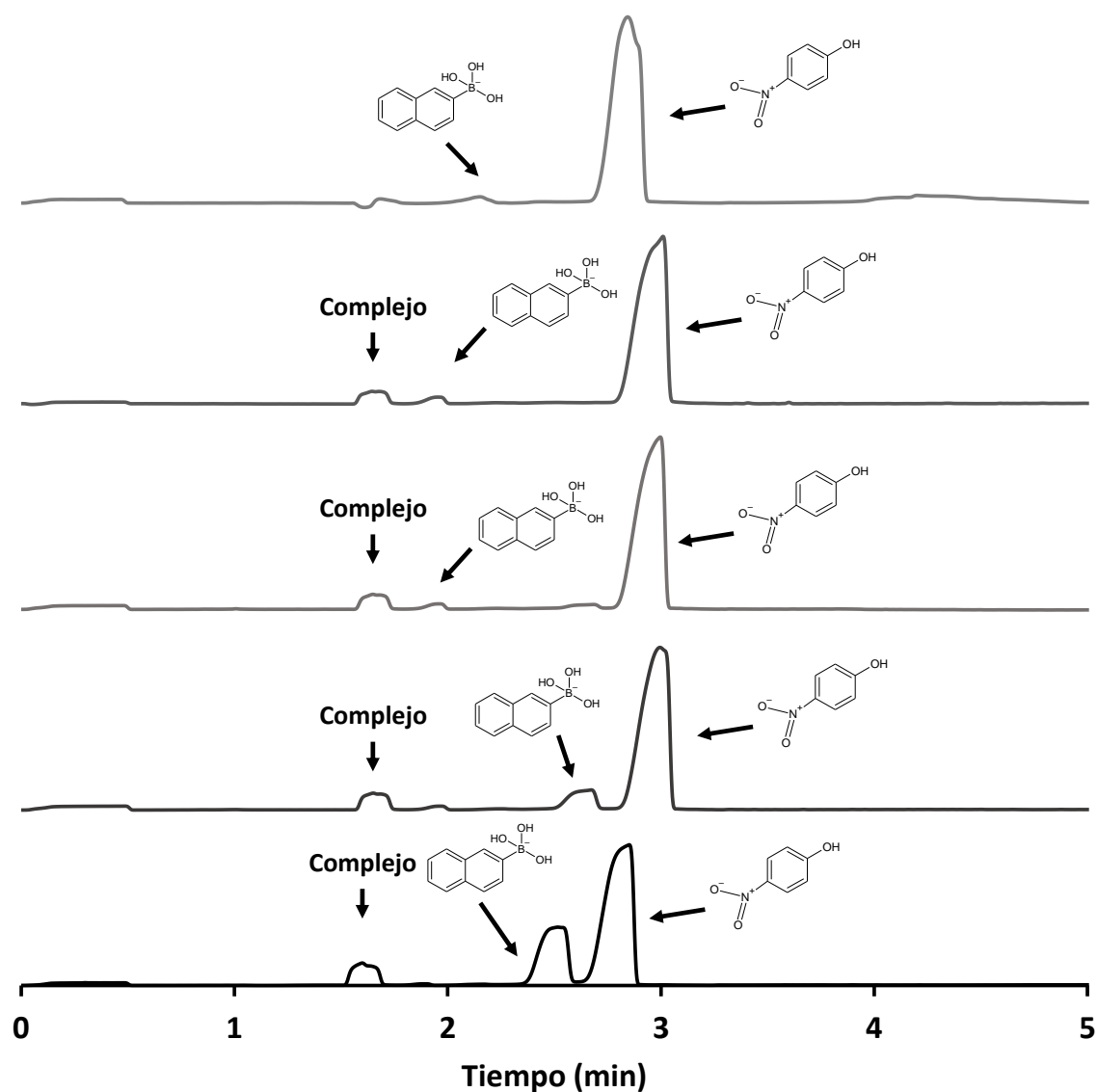


Figura 18. Electroferogramas de complejo boronato-digoxina, boronato y estándar interno en diferentes estrategias de separación a) solución amortiguadora fosfatos 30 mM pH=12, b) a + metanol 3%, c) a+ isopropanol, d) a+ acetonitrilo y e) a+ SDS 5 mM

En la Figura 18.b, 18.c y 18.d se puede observar que la señal del complejo boronato-digoxina disminuye en comparación a la Figura 18.a. La evidencia sugiere que, en el caso de los alcoholes, el boronato puede formar complejos con el metanol e isopropanol dando lugar a una serie de equilibrios competitivos, que afecta la formación del complejo boronato-digoxina (Fig.19):

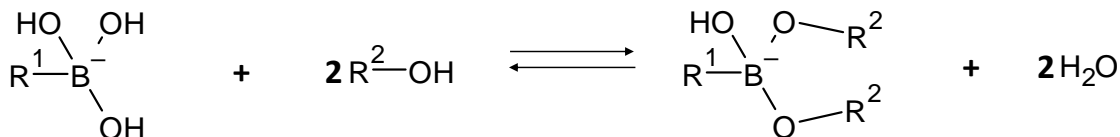


Figura19. Reacción de condensación entre un grupo boronato y alcoholes.

En el electroferograma 18.e, se observa un cambio en la movilidad electroforética de los componentes obteniendo una señal del complejo a los 2.2 minutos, sin embargo, no existe una mejoría cuando se emplea SDS, por lo que se optó por continuar los experimentos subsecuentes sin el uso de co-solventes o surfactantes [70].

Tras la selección de la composición del electrolito de trabajo (solución amortiguadora de fosfatos pH=12.0, 30 mM) se llevó a cabo la derivatización de la digoxina empleando 2-NBA y o-TBA y la separación de las diferentes especies involucradas por electroforesis capilar de zona.

En la Figura 20 se muestran los electroferogramas obtenidos del análisis de 2-NBA (Fig. 20.a) y o-TBA (Fig.20.b) en presencia de diferentes concentraciones de digoxina.

En la Figura 20.a. se observan 3 señales que corresponden a el complejo boronato-digoxina (1.5 min), el exceso de derivatizante (2.6 min) y el estándar interno (3.0 min). Asimismo, se observa el incremento de la primera señal a mayores concentraciones de digoxina. De manera análoga cuando se emplea el o-TBA como derivatizante (Fig. 20.b) se observan 3 señales correspondientes al complejo boronato-digoxina (1.8 min), derivatizante (2.8) y estándar interno (3.1 min).

En los electroferogramas se observa que el complejo 2-NBA-digoxina y el boronato de 2-NBA presentan menores tiempos de migración en comparación a sus análogos de o-TBA, debido a que a mayor tamaño del anión el tiempo de migración se reduce. Lu *et al.*, describen la separación de los complejos ácido butilborónico-citidina y ácido butilborónico-inosina, obteniendo tiempos de migración menores en el primer complejo por tener menor tamaño [64]. La señal analítica del complejo con 2-NBA presenta un ligero incremento en comparación al o-TBA debido a que el coeficiente de extinción molar del grupo naftil es mayor al del o-tolil.

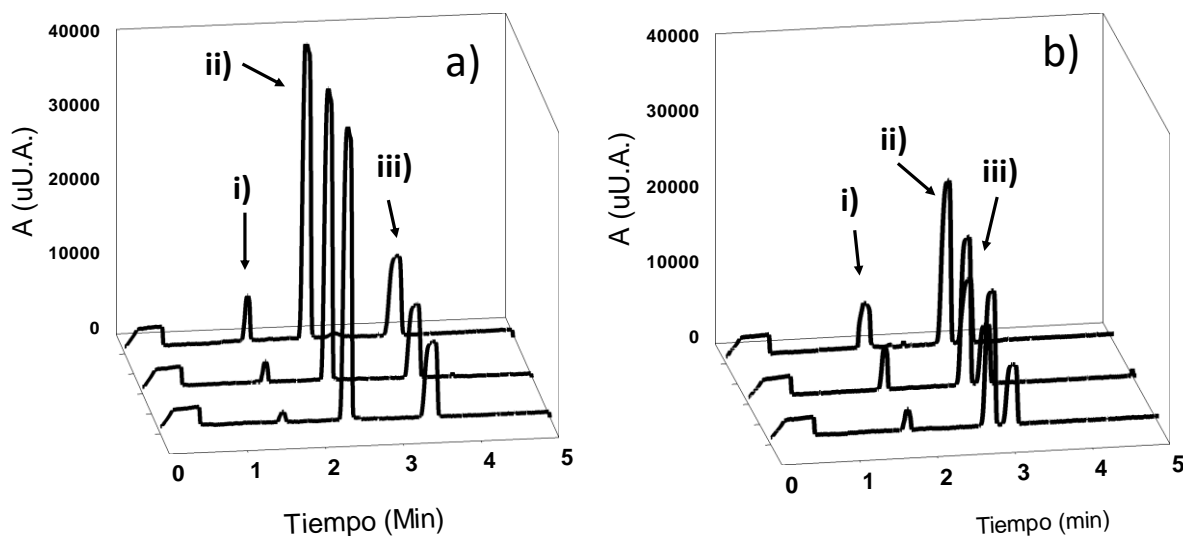


Figura 20. Electroferogramas de complejos de boronatos-digoxina de a) 2-NBA y b) *o*-TBA en presencia de digoxina a diferentes concentraciones donde i) complejo boronato-digoxina, ii) anión boronato y c) estándar interno.

3.3.3 Evaluación de condiciones de separación del sistema InCapD-LVSS-CZE-UV

El desarrollo de una metodología de preconcentración (LVSS) y derivatización en electroforesis capilar requiere que algunos parámetros del sistema sean evaluados previamente. Uno de los parámetros seleccionados relacionado con la derivatización es la relación de los tiempos de inyección de la muestra y del ácido borónico en una derivatización muestra/derivatizante. Conociendo que el capilar se llena a un 90% de su capacidad en 60 segundos empleando presión hidrodinámica a 20 psi, una relación de 1 implica que 30 segundos se emplearon en la inyección de la muestra y 30 segundos se emplearon en la inyección de derivatizante. Los otros parámetros seleccionados relacionados con la preconcentración son el voltaje de preconcentración y el tiempo de preconcentración.

Con el objetivo de llevar a cabo un análisis completo, se plantea el uso de un diseño Box Behnken para la evaluación de las variables seleccionadas en la derivatización y preconcentración en electroforesis capilar de zona. La variable de salida seleccionada fue el factor de preconcentración, el cual fue estimado como la relación de áreas de las señales de digoxina obtenidas empleando y sin emplear la técnica de preconcentración. Al emplear el diseño Box Behnken es posible evaluar diferentes modelos matemáticos y determinar cuál se ajusta más al sistema, asimismo es posible obtener superficies de respuesta que permiten describir y optimizar el sistema.

Los niveles seleccionados para ser optimizados de cada una de las variables de control se presentan en la Tabla 3. El diseño Box Behnken para 3 variables involucra la realización de 15 experimentos. La matriz de diseño que resulta se muestra en la Tabla 3. Bajo cada una de las condiciones establecidas se analiza una muestra de digoxina 20 μ M.

Tabla 3. Niveles de significancia de variables, matriz de diseño y respuestas del diseño Box Behnken.

| Experimento | Relación de tiempo (muestra/derivatizante) | Tiempo de concentración (s) | Voltaje de preconcentración (-kV) | Factor de preconcentración (2-NBA) | Factor de preconcentración (o-TBA) |
|-------------|---|-----------------------------------|---|--|--|
| 1 | 1.5(+1) | 60(+1) | 8(0) | 0.61 | 2.20 |
| 2 | 1(0) | 40(-1) | 7(-1) | 1.02 | 0.54 |
| 3 | 0.5(-1) | 50(0) | 9(+1) | 2.31 | 2.83 |
| 4 | 1.5(+1) | 50(0) | 7(-1) | 2.02 | 1.75 |
| 5 | 0.5(-1) | 40(-1) | 8(0) | 1.24 | 1.43 |
| 6 | 0.5(-1) | 50(0) | 7(-1) | 1.57 | 1.53 |
| 7 | 1(0) | 40(-1) | 9(+1) | 0.00 | 1.43 |
| 8 | 1(0) | 60(+1) | 7(-1) | 1.62 | 3.07 |
| 9 | 1.5(+1) | 40(-1) | 8(0) | 1.05 | 0.95 |
| 10 | 0.5(-1) | 60(+1) | 8(0) | 1.74 | 1.78 |
| 11 | 1.5(+1) | 50(0) | 9(+1) | 2.39 | 2.70 |
| 12 | 1(0) | 60(+1) | 9(+1) | 1.12 | 0.88 |
| 13 | 1(0) | 50(0) | 8(0) | 3.16 | 2.31 |
| 14 | 1(0) | 50(0) | 8(0) | 3.16 | 3.03 |
| 15 | 1(0) | 50(0) | 8(0) | 3.08 | 3.00 |

Las fuentes que contribuyen a la varianza del sistema incluyen la regresión y el error residual. La regresión incluye el uso de los modelos lineal, cuadrados e interacciones. La Tabla 4 muestra los resultados obtenidos de las sumas de cuadrados, encontrándose que:

- Para el sistema que emplea 2-NBA la combinación de los modelos lineal + cuadrático explica el 84.45% de la varianza, y se ajusta a la siguiente ecuación:

$$R = 3.133 - 0.099 Re + 0.223 V - 0.051 t - 0.420 Re^2 - 1.553 V^2 - 0.640 t^2$$

- Cuando se utiliza o-TBA se observa que el modelo completo (modelo lineal, cuadrados e interacciones) explica el 80.66% del sistema por lo que se elige como el más adecuado para la descripción del sistema, y se ajusta a la siguiente ecuación:

$$R = 2.780 + 0.004 Re + 0.448 V + 0.119 t - 0.234 Re^2 - 0.956 V^2 - 0.344 t^2 + 0.225 Re * V - 0.087 Re * t - 0.770 V * t$$

Siendo R: Respuesta (factor de preconcentración), Re: Relación de tiempo muestra/derivatizante, V: Voltaje de preconcentración y t: Tiempo de preconcentración.

Tabla 4. Análisis de varianza de los resultados obtenidos de los diseños de experimentos

| Fuente | 2-NBA | | o-TBA | |
|---------------|----------|----------------------------|----------|----------------------------|
| | Varianza | Porcentaje de varianza (%) | Varianza | Porcentaje de varianza (%) |
| Lineal | 0.4951 | 3.92 | 1.71498 | 17.20 |
| Cuadrado | 10.1720 | 80.53 | 3.72157 | 37.33 |
| Interacciones | NA | NA | 2.60472 | 26.13 |
| Error puro | 0.0043 | 0.04 | 0.33180 | 3.33 |

El análisis de la varianza de los resultados muestra de forma adicional la contribución de cada factor, cuadrado del factor e interacción en la respuesta (Tabla 5).

Tabla 5. Porcentaje de contribución de factores evaluados.

| Factor | Porcentaje de contribución en sistema con 2-NBA | Porcentaje de contribución en sistema con o-TBA |
|-----------------|---|---|
| Re | 0.68 | 0.00 |
| V | 3.42 | 19.22 |
| T | 0.18 | 1.35 |
| Re ² | 5.64 | 2.42 |
| V ² | 76.99 | 40.51 |
| t ² | 13.09 | 5.23 |
| Re*V | NA | 2.43 |
| Re*t | NA | 0.38 |
| V*t | NA | 28.46 |

NA=No aplica, Se resaltan los factores que presentan mayor contribución.

Se observa que los factores que incluyen el voltaje de preconcentración presentan mayor contribución en el sistema, lo cual se le atribuye a que de este factor depende principalmente la derivatización del analito y la preconcentración de las especies [71]. En las Figuras 21 y 22 se presentan las superficies de respuesta correspondientes a los sistemas con 2-NBA y o-TBA respectivamente.

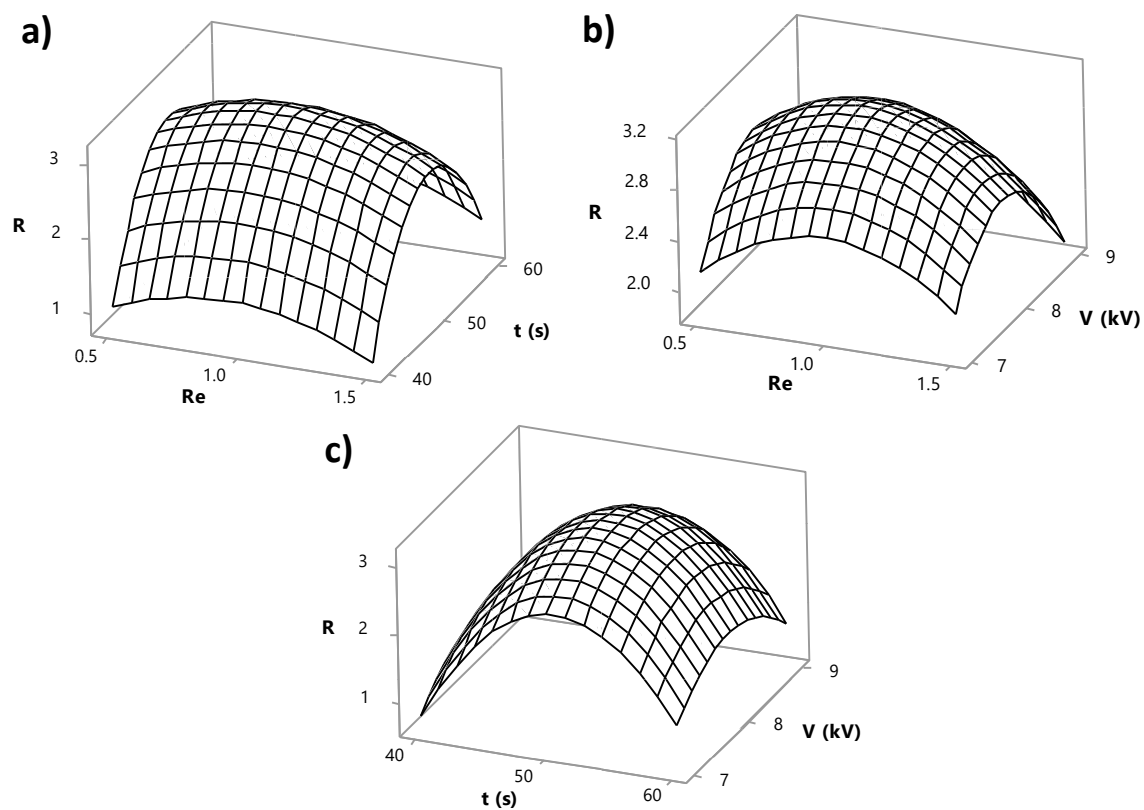


Figura 21. Superficies de respuestas del diseño empleando 2-NBA a) Relación de tiempos vs Tiempo (s), b) Relación de tiempos vs voltaje de preconcentración (-kV) y c) Tiempo (s) vs voltaje de preconcentración (-kV).

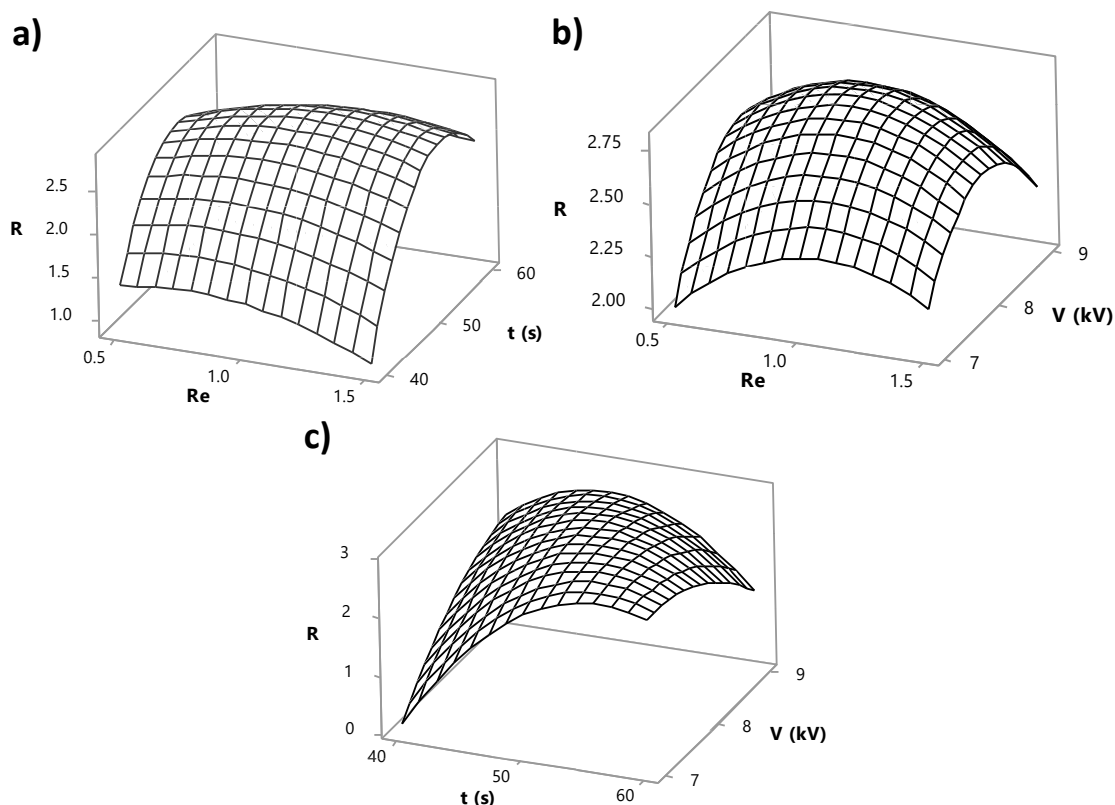


Figura 22. Superficies de respuestas del diseño empleando *o*-TBA a) Relación de tiempos vs Tiempo (s), b) Relación de tiempos vs voltaje de preconcentración (-kV) y c) Tiempo (s) vs voltaje de preconcentración (-kV).

A partir de las ecuaciones de superficies de respuesta se obtienen los parámetros óptimos para el análisis de digoxina por electroforesis capilar para 2-NBA los cuales son: relación de tiempo muestra-derivatizante: 0.9 (tiempo de muestra: 28 segundos, tiempo de derivatizante: 32 segundos), tiempo de voltaje: 51 s y voltaje -8.0 kV. Para *o*-TBA las condiciones óptimas son relación de tiempos: 1.1 (tiempo de muestra: 32 segundos, tiempo de derivatizante: 28 segundos), tiempo de voltaje: 53 segundos y voltaje de preconcentración: -7.8 kV.

En la Figura 23 se muestran los electroferogramas obtenidos mediante la técnica de derivatización en capilar y LVSS empleando 2-NBA (Fig. 23. a) y *o*-TBA (Fig. 23. b). El orden de elución es consecuencia del procedimiento diseñado:

- Primero se inyecta la digoxina (especie neutra) y posteriormente el boronato (especie aniónica).
- Se aplica un potencial de separación en polaridad inversa, donde fluirán hacia el cátodo las especies neutras, seguidas de los aniones, permitiendo la formación del complejo boronato-digoxina y la acumulación al inicio del capilar del complejo, boronato en exceso y el estándar interno.

- La separación de las especies en polaridad normal donde se separan de acuerdo con su tamaño, observándose la siguiente tendencia en el tiempo de migración: complejo < boronato < estándar interno.

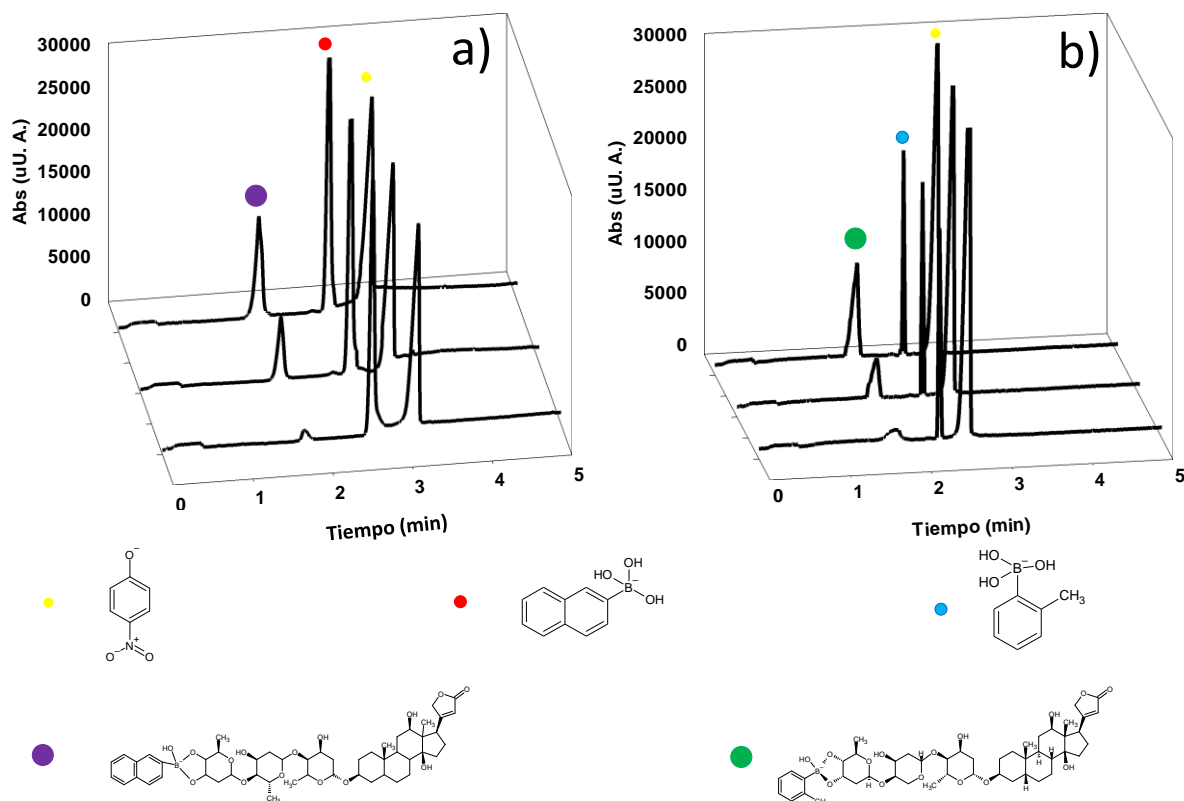


Figura 23. Electroferogramas de complejos boronato-digoxina empleando a) 2-NBA y b) *o*-TBA en un sistema InCapD-LVSS-CZE-UV.

Tras la separación en polaridad normal y detección se observa en los electroferogramas obtenidos que las metodologías InCapD-LVSS-CZE-UV muestran el mismo perfil comparado con la estrategia de CZE. Cabe destacar que la derivatización y preconcentración en línea de complejos boronato-diol por electroforesis capilar no ha sido abordada extensamente en la bibliografía. De forma adicional la diferencia en la movilidad electroforética de los complejos formados le proporciona selectividad a la metodología de análisis, finalmente la derivatización en capilar permite una menor manipulación de la muestra lo cual reduce el error sistemático, lo cual puede permitir su uso en el análisis de muestras complejas [72].

3.3.4 Validación analítica de metodologías propuestas

Los parámetros de desempeño analítico de las metodologías propuestas fueron obtenidos en un intervalo de concentración de digoxina 0 a 96 μM . Para ello se grafica la relación de áreas del complejo boronato-digoxina y el estándar interno contra la relación de concentración de digoxina y estándar interno. Los parámetros obtenidos son la sensibilidad analítica, intervalo lineal de trabajo (μM), LOD y LOQ (μM) (Tabla 6).

En la Tabla 6 se observa un incremento en la sensibilidad analítica y en los límites de detección cuando se emplea la técnica de derivatización en línea y preconcentración. La precisión intermedia de las metodologías se determina en términos de repetitividad y reproducibilidad y se expresa como desviación estándar relativa (% RSD) de tres determinaciones realizadas el mismo día y tres determinaciones en días diferentes respectivamente. Para ello se emplean estándares de digoxina 19.2 μM y 32.0 μM en las metodologías desarrolladas. Tanto repetitividad y reproducibilidad presentan valores de %RSD menores al 5% para todas las soluciones estándar indicando una precisión adecuada. Asimismo, se observa una mejora en la repetitividad y reproducibilidad en las metodologías InCapD-LVSS-UV atribuido principalmente a que existe una menor manipulación por parte del analista.

Tabla 6. Parámetros de la regresión lineal y precisión intermedia de las metodologías evaluadas.

| Parámetro | CZE-2-NBA | InCapD-LVSS-CZE-2NBA | CZE-o-TBA | InCapD-LVSS-CZE-o-TBA |
|--|-----------------|----------------------|-------------|-----------------------|
| Intervalo lineal (μM) | 8.4 – 96.0 | 1.2 – 50.0 | 11.7 – 96.0 | 5.4 – 50.0 |
| Límite de detección (μM) | 2.8 | 0.4 | 3.9 | 1.80 |
| Límite de cuantificación (μM) | 8.4 | 1.2 | 11.7 | 5.40 |
| Sensibilidad ($\mu\text{U.A. L } \mu\text{mol}^{-1}$ y $\text{L } \mu\text{mol}^{-1}$) | 0.18 ± 0.04 | 0.44 ± 0.01 | 0.17 | 0.35 ± 0.03 |
| Repetitividad (%DER, n=3) | | | | |
| 19.2 μM | 4.2 | 2.6 | 3.9 | 3.10 |
| 32.0 μM | 4.6 | 2.3 | 4.4 | 2.80 |
| Reproducibilidad (%DER, n=3) | | | | |
| 19.2 μM | 4.9 | 3.1 | 4.4 | 2.60 |
| 32.0 μM | 5.0 | 3.4 | 4.6 | 3.30 |

3.3.5 Exactitud y análisis de muestras

Los métodos propuestos fueron empleados para determinar la concentración de digoxina en tres muestras farmacéuticas. Un electroferograma obtenido de las muestras farmacéuticas se muestra en la Figura 24, observándose las señales características del complejo boronato-digoxina (min. 1.5), el agente derivatizante en exceso (2.4 min), el estándar interno (3.2 min), además de diferentes interferentes a los 2.7 y 3.3 minutos.

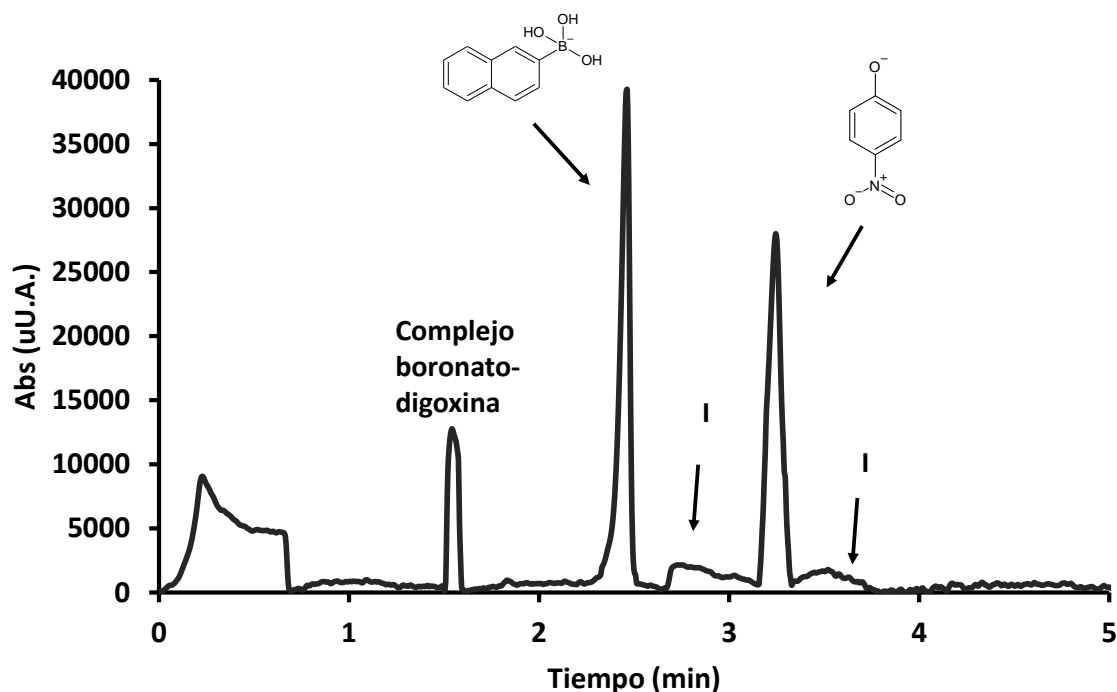


Figura 24. Electroferograma de muestra farmacéutica empleando un sistema InCapD-LVSS-CZE-UV empleando 2-NBA como derivatizante.

Con el objetivo de evaluar la exactitud se realizó el análisis de las muestras por triplicado, la Tabla 7 muestra la media de los resultados obtenidos ($n=3$) para cada metodología propuesta y de la metodología oficial propuesta por la farmacopea de los estados unidos (HPLC-UV). Se incluye el %RSD entre muestras, observándose que en las metodologías aplicadas presenta valores menores al 5%. La exactitud se determinó mediante el análisis de varianza (ANOVA) comparando las medias de los valores obtenidos por cada metodología.

Tabla 7. Concentración de digoxina en muestras farmacéuticas (%RDS, $n=3$).

| Muestra | Metodología | | | | | |
|---------|--|--|---|---|--|-------------------|
| | CZE-2-NBA (μM , %DER y μg tableta $^{-1}$) | InCapD-LVSS- CZE-2-NBA (μM , %DER y μg tableta $^{-1}$) | CZE- <i>o</i> -TBA (μM , %DER y μg tableta $^{-1}$) | InCapD-LVSS- CZE- <i>o</i> -TBA (μM , %DER y μg tableta $^{-1}$) | HPLC-UV (μM , %DER y μg tableta $^{-1}$) | F_{calc} |
| 1 | 31.89 (2.72) 249.06 | 31.58 (3.01) 246.59 | 31.59 (3.25) 246.67 | 31.75 (1.54) 247.99 | 31.69 (2.05) 247.46 | 0.08 |
| 2 | 31.59 (2.35) 246.67 | 31.32 (3.50) 244.56 | 31.59 (3.31) 246.70 | 31.65 (1.86) 247.15 | 31.42 (0.60) 245.43 | 0.09 |
| 3 | 31.16 (1.24) 243.38 | 31.51 (3.62) 246.09 | 31.22 (3.27) 243.82 | 31.29 (2.62) 243.76 | 31.21 (1.70) 243.76 | 0.08 |

El análisis de varianza indica que no existe diferencia significativa entre las concentraciones de digoxina encontradas empleando las diferentes metodologías desarrolladas y la metodología HPLC-UV, puesto que el valor de F calculado para las diferentes muestras es menor al valor crítico ($F_{4,10} = 3.48$) a un nivel de confianza del 95%, por lo tanto, las metodologías electroforéticas propuestas son aplicables a este tipo de análisis.

Las diferencias en las concentraciones obtenidas por las metodologías propuestas se representan empleando gráficos de caja y bigote. La Figura 25 muestra los gráficos obtenidos para la muestra 3, encontrándose que los valores obtenidos son similares en las metodologías empleadas.

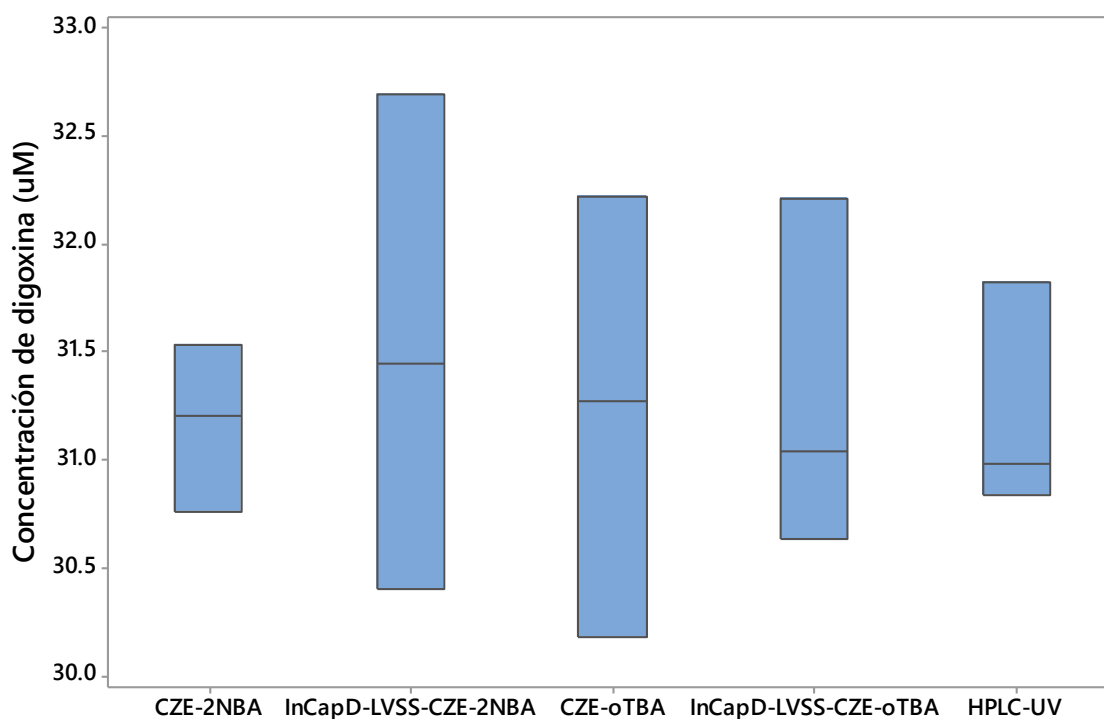


Figura 25. Gráfico de cajas de concentración de digoxina en muestra farmacéutica empleando las metodologías propuestas.

Adicionalmente, la metodología InCapD-LVSS-CZE-UV-2-NBA fue empleada para el análisis de digoxina en muestras de suero sanguíneo al presentar los mejores parámetros analíticos (Tabla 6). El electroferograma se presenta en la Figura 26, en la que se observa la formación del complejo boronato-digoxina a los 1.7 minutos adicionalmente se observa una señal a los 2.1 minutos la cual se atribuye al exceso de carbohidratos presentes en la muestra como glucosa, formando el complejo boronato-carbohidrato lo cual permitiría su detección [73].

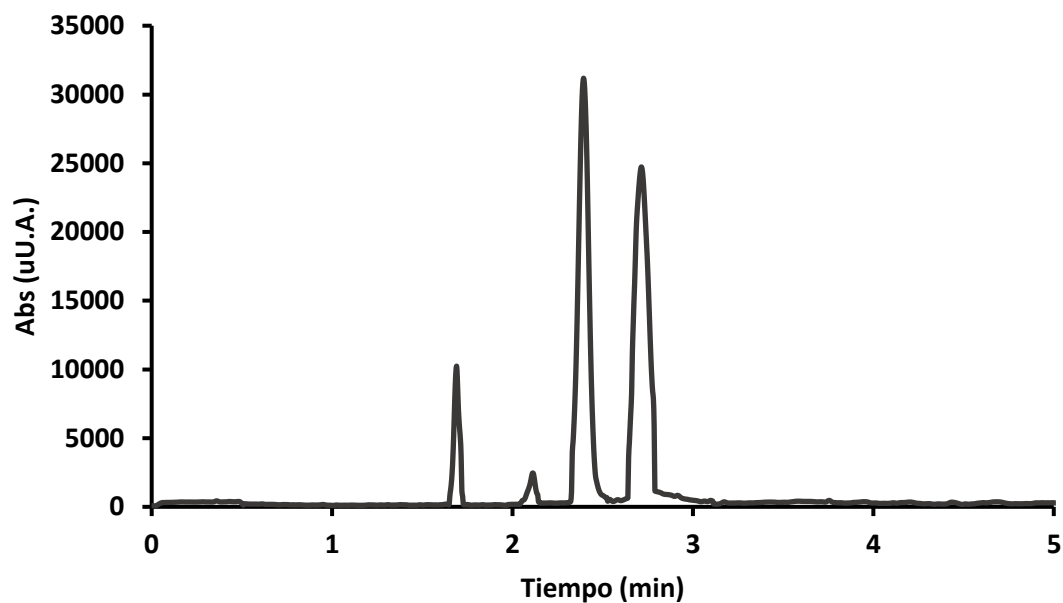


Figura 26. Electroferograma de muestra biológica empleando un sistema InCapD-LVSS-CZE-UV empleando 2-NBA como derivatizante.

Para la obtención de la exactitud se emplearon muestras dopadas de digoxina de 2.0 a 4.0 μM , encontrándose porcentajes de recuperación en el intervalo de 96.2 a 103.0 % (Tabla 8).

Tabla 8. Ensayos de recuperación de digoxina en muestras de suero mediante electroforesis capilar de zona (InCapD-LVSS-CZE-UV)

| Concentración añadida (μM) | Concentración encontrada (μM) | Porcentaje de recuperación (%) | %RSD |
|---|--|--------------------------------|------|
| | 2.06 | 103.0 | 2.05 |
| 2.00 | 2.04 | 102.0 | |
| | 1.98 | 99.0 | |
| 3.00 | 2.96 | 98.7 | 1.29 |
| | 2.90 | 96.7 | |
| | 2.97 | 99.0 | |
| 4.00 | 3.95 | 98.7 | 1.28 |
| | 3.90 | 97.5 | |
| | 3.85 | 96.2 | |

3.3.6 Análisis de interferentes.

Para evaluar la selectividad de las metodologías propuestas, una muestra estándar de digoxina fue dopada con potenciales interferentes que se encuentran en las muestras farmacéuticas y biológicas (almidón: 20%, lactosa 50 %, estereato de magnesio 5%, sero albúmina bovina 7% y glucosa 1% [73, 74].

Las muestras fueron pretratadas y analizadas empleando las metodologías propuestas en la cual la mayoría de las moléculas evaluadas no presentan interferencia en el electroferograma sin embargo en el caso la lactosa se observa una señal a los 2.0 minutos correspondiente al complejo lactosa-boronato. Cabe destacar que ninguna molécula evaluada interfiere con la señal del complejo digoxina-boronato, en el caso de la lactosa, al existir una diferencia en tamaño entre los complejos, esto resulta en un cambio en la movilidad electroforética de las especies.

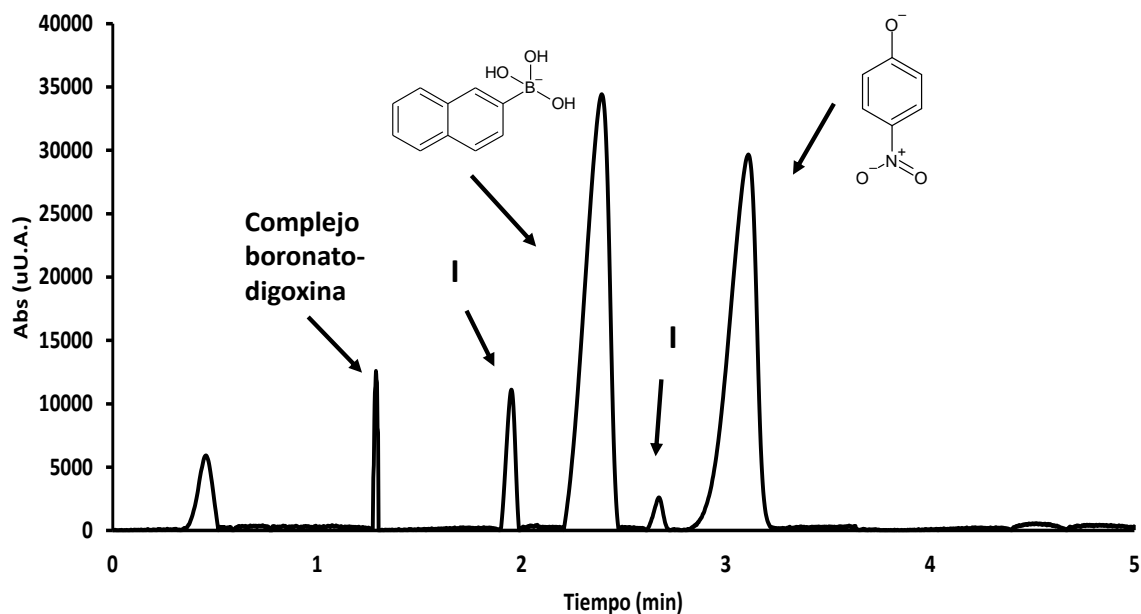


Figura 27. Electroferogramas de complejo de boronato-digoxina en presencia de lactosa (17.5 mM)

3.3.7 Conclusiones

Se desarrollaron metodologías electroforéticas para la determinación de digoxina empleando ácidos borónicos como agentes derivatizantes. El análisis de digoxina se basa en la formación del complejo boronato-digoxina (aniónico) a pH básico, lo cual permite su separación mediante electroforesis capilar de zona.

Las metodologías propuestas presentan parámetros analíticos adecuados que permiten detectar y cuantificar digoxina en diferentes matrices como farmacéuticas y biológicas con un pretratamiento simple y con tiempos de análisis cortos.

En los espectros de ^{11}B RMN se observan un desplazamiento de la señal de los iones boronato a frecuencias mayores cuando se añade digoxina, lo anterior es característico de la formación de complejos boronato-diol.

La integración de ácidos borónicos (2-NBA y *o*-TBA) en sistemas electroforéticos como derivatización precapilar y en capilar permite realizar el análisis de digoxina. La técnica de derivatización en capilar y preconcentración en línea ha sido poco descrita en la literatura, sin embargo, se observa que en comparación a las metodologías de derivatización pre-capilar se pueden mejorar los parámetros analíticos como LOD y LOQ, así como la precisión intermedia.

Entre las metodologías desarrolladas destaca InCapD-LVSS-CZE-2-NBA en términos de parámetros analíticos. Esto se atribuye a dos principios 1) al grupo naftil en la molécula de 2-NBA que presenta un mayor coeficiente de absorptividad molar y 2) a LVSS permite pre-concentrar la muestra. Adicionalmente al existir menor manipulación en la derivatización por parte del analista observa una mejoría en la repetibilidad y reproducibilidad del método.

*Análisis de digoxina empleando
nanopartículas ternarias de materiales
semiconductores*

4. Análisis de digoxina empleando nanopartículas ternarias de materiales semiconductores

4.1 Introducción

De forma general las metodologías analíticas en las que se emplean nanopartículas se basan en los cambios espectroscópicos debido a la interacción con los analitos, por lo que es importante considerar la estructura y propiedades fisicoquímicas del analito. Algunos ejemplos de interacción nanopartícula-analito son el abatimiento debido a transferencia de electrón fotoinducida, abatimiento debido a la transferencia de energía de resonancia Förster, incremento de la señal de emisión debida a la pasivación de la superficie, abatimiento de la señal por agregación, inmunoensayos, etc. [54].

Entre las estrategias de análisis destacan el abatimiento de la fluorescencia por agregación de partículas y transferencia de electrón fotoinducida (PET), en este proceso las nanopartículas absorben los fotones para excitar los electrones de la banda de valencia hacia la banda de conducción. De forma convencional cuando el electrón vuelve a la banda de conducción se produce la fluorescencia, sin embargo, si existe una molécula o aceptor de electrones en el medio, los electrones son transferidos hacia el aceptor disminuyendo la fluorescencia del medio [75].

Una estrategia de análisis novedosa que implica el uso de nanopartículas, se basa en la reversibilidad del fenómeno PET el cual comprende las siguientes etapas: 1) abatimiento de la señal de fluorescencia de las nanopartículas de materiales semiconductores por una molécula debido a una transferencia de electrones fotoinducida, 2) adición del analito de interés, en esta etapa es de suma importancia que la molécula que induce el PET presente una mayor afinidad o constante termodinámica con el analito que con la nanopartícula, 3) debido a la interacción entre la molécula y el analito, las nanopartículas no presentan interacción PET por lo que se recupera la señal de fluorescencia y se asocia a la concentración de analito [76].

La aplicación de nanopartículas en el desarrollo de estrategias analíticas empleando agregación, PET o la reversibilidad del PET se ha descrito de forma amplia para nanopartículas binarias, sin embargo, el uso de nanopartículas ternarias es reciente por lo que en primera instancia se evalúa su uso en sistemas analíticos conocidos [76].

4.2 Parte experimental

4.2.1 Reactivos y equipos.

Todas las soluciones se prepararon empleando agua con resistividad no menor a 18.2 M Ω cm, obtenida de un sistema Milli-Q academic (Millipore). Nitrato de plata (AgNO₃), nitrato de indio (III) hidratado (In(NO₃)₃, 99.99%), nitrato de zinc Zn(NO₃)₂, ácido 3-mercaptopropiónico (3-MPA, USA, \geq 99%), acrilamida (China, \geq 99%), 2-tionaftol (Belgium, 99%), ácido ascórbico, digoxina (USA, \geq 95%), ácido 4-aminofenil borónico (USA, 95%) fueron adquiridos de Sigma Aldrich. Hidróxido de sodio (NaOH, \geq 97.0%) y sulfato de sodio 9-hidratado (Na₂S·9H₂O, \geq 98.0%) fue adquirido de Meyer Chemicals, México.

Los espectros de absorción de las nanopartículas se obtienen en un equipo Perkin Elmer Lambda 40, en un intervalo de 400 a 1000 nm empleando celdas de cuarzo con un paso óptico de 1.0 cm.

Los espectros de emisión se obtienen en un equipo de fluorescencia Perkin Elmer LS 55. La longitud de onda de excitación empleada fue de 350 nm y se registra el espectro de emisión en el intervalo de 420 a 700 nm.

4.2.2 Síntesis de AgInS₂/ZnS

La síntesis de nanopartículas de AgInS₂/ZnS QDs tipo núcleo se lleva a cabo empleando dos metodologías diferentes: por reflujo y por autoclave. En la primera metodología se mezclan 0.5 mL de AgNO₃ 62.5 mM, 0.5 mL de In(NO₃)₃ 200 mM y 225 µL de ácido 3-mercaptopropiónico concentrado en un volumen final de 25 mL aforando con agua, posteriormente se ajusta el pH de la solución a un valor de 10.0, se añaden 0.5 mL de Na₂S 200 mM y se coloca el sistema a reflujo tomando alícuotas de 2 mL a los 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos. Para el segundo sistema se mezclan 0.2 mL de AgNO₃ 62.5 mM, 0.2 mL de In(NO₃)₃ 200 mM y 90 µL de ácido 3-mercaptopropiónico concentrado en un volumen final de 10 mL. Asimismo, el pH de la solución se ajusta a 10.0 con NaOH 1.0 M, se añade 0.2 mL Na₂S de 200 mM y se trasvasa la solución a un reactor que se coloca en una autoclave, la reacción se evalúa a los 5, 10, 20, 30, 60 y 120 minutos.

Asimismo, la síntesis de nanopartículas de AgInS₂ y AgInS₂/ZnS se llevan a cabo un sistema autoclave (121°C), en la primera etapa se mezclan 200 µL de In(NO₃)₃ (200 mM) con 160 µL de AgNO₃ 62.5 mM y 35.9 µL de ácido 3-mercaptopropiónico (3-AMP) en 20 mL de agua con resistividad no menor a 18.2 MΩ cm⁻¹. Posteriormente el pH de la solución se ajusta a 10.0 con NaOH 1.0 M, se afora a 20 mL y se coloca en el sistema autoclave por 20 minutos para la obtención de AgInS₂ estabilizadas con ácido 3-mercaptopropiónico. Para la síntesis de AgInS₂/ZnS se emplean las nanopartículas de AgInS₂ sintetizadas en autoclave (20 min) y se les añade 0.2 mL de Zn(NO₃)₃ 200 mM y se prolonga la reacción por 5, 10 y 20 minutos.

4.2.3 Caracterización de nanopartículas de AgInS₂/ZnS (Espectros UV-Vis y de fluorescencia)

Los espectros de absorción de las nanopartículas se obtienen en un equipo Perkin Elmer Lambda 40, en un intervalo de 400 a 1000 nm empleando celdas de cuarzo con un paso óptico de 1.0 cm. Los espectros de emisión se obtienen en un equipo de fluorescencia Perkin Elmer LS 55. Para ello las muestras son diluidas con agua desionizada en relación 1:333 (v/v, nanopartículas:agua) previo a su análisis. La longitud de onda empleada fue de 350 nm y se registra el espectro de emisión en el intervalo de 420 a 700 nm.

4.2.4 Análisis TEM, EDS y tamaño de partícula

Las micrografías se obtuvieron colocando una gota de la dispersión sobre una rejilla de níquel con una membrana delgada de carbón empleando un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución (TEM) marca JEOL, modelo JEM 2200FS+Cs., las muestras son irradiadas con luz IR previo al análisis con el objetivo de evaporar el disolvente.

La composición elemental de las nanopartículas de AgInS₂/ZnS fue obtenida por espectroscopía de rayos X de energía dispersiva (EDS) empleando el sistema Oxford Modelo AZtec, para ello se toman varias micrografías de diferentes zonas, además de patrones de difracción y mapeo EDS.

La distribución de tamaños de las nanopartículas se obtiene en un equipo Malvern Zetasizer Nano-ZS90, para ello 2 mL de la dispersión se colocan en una celda de cuarzo, se mide el movimiento browniano y se registra la distribución del tamaño de partícula tras estabilizarse la medición.

4.2.5 Evaluación espectroscópica de sistemas- AgInS₂/ZnS-Ácido ascórbico

Con el objetivo de evaluar las posibles interacciones nanopartícula-analito, se construyen sistemas empleando moléculas modelo como ácido ascórbico, acrilamida y digoxina en presencia de AgInS₂/ZnS. El ácido ascórbico se usa como molécula modelo para observar el abatimiento de la señal de emisión de diferentes nanopartículas, para observar este efecto se preparan soluciones las cuales contienen 200 µL de las nanopartículas sintetizadas de AgInS₂/ZnS y ácido ascórbico en el intervalo de concentraciones de 0 a 0.7 mM en 10 mL de agua. Los espectros de emisión de los sistemas nanopartícula-ácido ascórbico se registran en un intervalo de 420 a 720 nm empleando una longitud de onda de excitación de 350 nm.

4.2.6 Evaluación espectroscópica de sistemas acrilamida- AgInS₂/ZnS QDs

Debido a que las nanopartículas de AgInS₂/ZnS son materiales relativamente novedosos es necesario comprobar su efectividad en sistemas análogos a los empleados con nanopartículas binarias. Es por ello que se emplea una molécula modelo (acrilamida, AA) para evaluar las interacciones que pueden ocurrir sobre los AgInS₂/ZnS, para ello se plantean diferentes estrategias de análisis. Los diferentes sistemas fueron analizados en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 empleando una longitud de onda de 350 nm y registrando la señal de emisión de 375 a 675 nm.

La primera estrategia se basa en el abatimiento de la señal analítica por polímero como poli(acrilamida) sobre las nanopartículas. 30 µL de nanopartículas de AgInS₂/ZnS son mezcladas con acrilamida (10 -60 µg L⁻¹) en un volumen final de 10 mL, las soluciones fueron irradiadas con luz ultravioleta de 365 nm por 30 minutos, y se obtuvieron los espectros de emisión de los sistemas registrando la señal en el intervalo de 400 a 650 nm, empleando una longitud de onda de excitación de 350 nm. Las subsecuentes mediciones fluorimétricas fueron obtenidas empleando estas condiciones.

4.2.6.1 Evaluación de sistemas nanopartículas de AgInS₂/ZnS-2-Tionaftol/Acrilamida

Se ha descrito que la acrilamida puede reaccionar con grupos tiol en una adición de Michael modificando así la señal de emisión en los sistemas que contienen nanopartículas, por lo que se evalúa la adición de 2-tionaftol y su efecto en el sistema de AgInS₂/ZnS QDs. Para ello diferentes concentraciones en el intervalo de 10 a 30 µM de 2-tionaftol fueron añadidas a las diluciones de 30 µL de AgInS₂/ZnS en un volumen de 10 mL. De los sistemas se obtienen los espectros de emisión bajo las condiciones antes mencionadas.

Con el objetivo de evaluar los cambios en la señal de fluorescencia en presencia del analito de interés, se construyen sistemas que contienen nanopartículas de AgInS₂/ZnS (30 µL), 30 µM de 2-tionaftol y acrilamida en el intervalo de concentración de 5 a 30 µg L⁻¹ en un volumen final de 10 mL, posteriormente se obtienen sus espectros de emisión en el intervalo de 375 a 675 nm empleando una longitud de onda de excitación de 350 nm.

4.2.6.2 Obtención de los parámetros de desempeño de las metodologías evaluadas

Los parámetros que comprenden la validación son el intervalo lineal, límites de detección y cuantificación, la precisión (expresada como repetitividad y reproducibilidad) y la exactitud. La metodología empleada para determinar los parámetros de desempeño es la recomendada por la IUPAC.

Los parámetros analíticos de las metodologías se obtuvieron realizando las curvas de calibración, empleando la intensidad de emisión. La precisión se evaluó en términos de repetitividad y reproducibilidad, midiendo muestras dopadas de papas fritas comerciales a dos niveles de concentración ($20.0 \mu\text{g L}^{-1}$ y $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$) por triplicado durante tres días. Posteriormente una metodología fue aplicada para al análisis de muestras.

4.2.6.3 Determinación de acrilamida en muestras alimenticias.

El análisis de acrilamida se llevó a cabo en 10 muestras de botanas comerciales: 6 muestras diferentes de papas fritas y 4 muestras de frituras a base de trigo. El pretratamiento de la muestra se lleva a cabo de acuerdo con lo descrito por Martínez *et al.* con ligeras modificaciones [77]. Cada muestra se homogeniza y se pesa de 0.3 a 1 g, posteriormente se adicionan 10 mL de agua desionizada y la mezcla se agita por 15 minutos, la muestra se centrifuga a 2500 rpm a temperatura ambiente, se recolecta la fase acuosa y se extraen los lípidos con 10 mL de hexano, se recupera nuevamente la fase acuosa y se filtra por una membrana de nylon de 0.45 micras. De 1.0 a 2.0 mL de fase acuosa se añade al sistema de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ o $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -2-tionaftol y se añade agua para obtener un volumen final de 10.0 mL. Los espectros se obtuvieron en las condiciones mencionadas con anterioridad.

4.2.7 Evaluación espectroscópica de sistemas digoxina- $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ QDs

Se ha descrito en trabajos previos interacciones entre QDs y azúcares en los que se modifica la señal de fluorescencia, Sandros *et al* desarrolla un sensor analítico de maltosa empleando nanopartículas funcionalizadas de CdSe, en el sistema descrito la maltosa abate la señal de fluorescencia de las nanopartículas lo cual es atribuido a un fenómeno PET [78]. Por lo que bajo esta premisa se evalúa si existe alguna interacción entre el fragmento de digitoxinas de la digoxina y los QDs.

Los espectros de emisión de sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ QDs-digoxina se obtienen en un intervalo de 375 a 675 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 empleando una longitud de excitación de 350 nm. los sistemas evaluados se componen de una dilución 1:100 de la dispersión de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y digoxina (0 -10 mM) aforando a 10.0 mL con agua desionizada.

4.2.8 Evaluación espectroscópica de sistemas nanopartículas funcionalizadas y digoxina.

Se ha descrito en trabajos previos la interacción entre nanopartículas funcionalizadas y analitos en los que se modifica la señal de fluorescencia., por lo que bajo esta premisa se evalúa si existe alguna interacción entre las nanopartículas AgInS_2 y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ funcionalizadas con ácido borónico/boronato y la digoxina puesto que el analito presenta un sistema cis-1,2- diol.

Con el objetivo de inducir la interacción nanopartícula analito, las dispersiones de AgInS_2 y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ estabilizadas por 3-AMP (20 mM) se funcionalizan con ácido 4-aminofenilborónico

mediado por 1-etil-3-(3 dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) y N-hidrosulfosuccinimida (NHS) (Fig. 28).

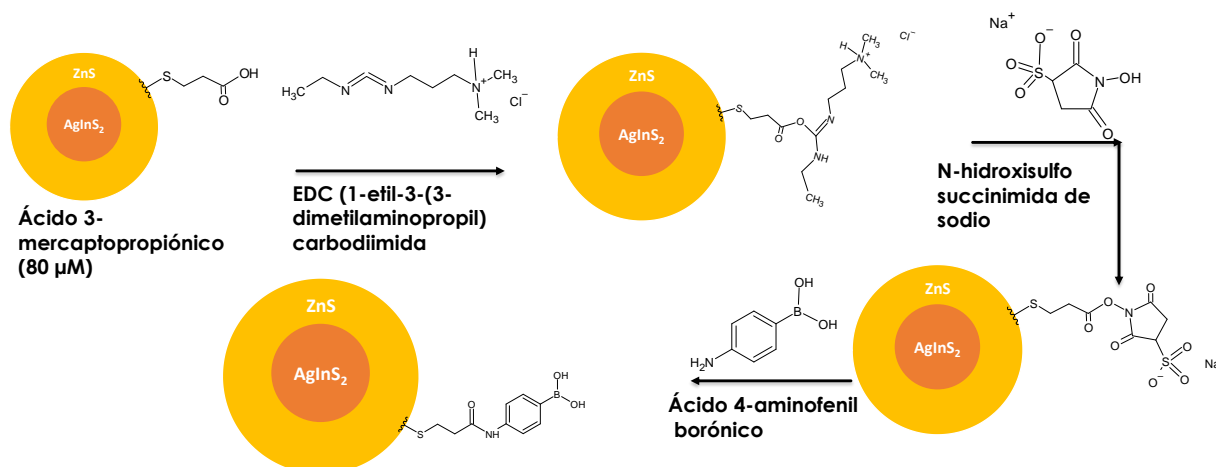


Figura 28. Funcionalización de nanopartículas de AgInS₂/ZnS con ácido 4-aminofenil borónico mediado por EDC/NHS.

200 μ L de la dispersión de nanopartículas (4×10^{-3} mmoles de 3-AMP) se mezclan con 100 μ L de una solución amortiguadora de fosfatos (pH=7.0, 30 mM), posteriormente se adiciona 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida 20 mM y N-hidrosulfosuccinimida 20 mM para obtener 3 diferentes sistemas con relación estequiométrica 1:0.25:0.25, 1:0.5:0.5 y 1:1:1 entre 3-AMP:EDC:NHS en un volumen final de 1 mL. Las soluciones se agitan por ultrasonido por 60 minutos. Posteriormente se adicionan de ácido 4-aminofenilborónico 20 mM (en la relación estequiométrica correspondiente) y la mezcla se mantiene por 24 horas en reposo en oscuridad para obtener la nanopartícula funcionalizada.

En una etapa preliminar, se evalúa la interacción la nanopartículas-analito en sistemas que comprenden 200 μ L de AgInS₂ y AgInS₂/ZnS funcionalizadas a diferentes concentraciones de ácido 4-aminofenil borónico (20 – 80 μ M) en presencia de digoxina 80.0 μ M y 300 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (pH=11.0, 50 mM) en un volumen final de 5 mL, los sistemas se colocan bajo una cámara de luz UV de 365 nm, se capturan las imágenes fotográficas correspondientes y se observan los cambios en la señal de fluorescencia.

Los espectros de emisión de los sistemas AgInS₂ y AgInS₂/ZnS funcionalizados en presencia de digoxina se obtienen en un intervalo de 375 a 675 nm en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS 55 empleando una longitud de excitación de 350 nm, los sistemas evaluados se componen de una dilución 200 μ L de la dispersión de AgInS₂ y AgInS₂/ZnS funcionalizadas con ácido 4-aminofenilborónico (80 μ M), 300 μ L de solución amortiguadora de fosfatos (pH= 11.0, 50 mM) y digoxina (6.0 -80.0 μ M) aforando a 5.0 mL con agua desionizada en un pH=10.0.

4.2.9 Preparación de muestras farmacéuticas

Tres muestras farmacéuticas comerciales en forma de tableta fueron seleccionadas para el análisis de contenido de digoxina empleando la metodología espectrofluorimétrica. Las tabletas fueron pulverizadas empleando un mortero con pistilo, luego fueron pesadas y colocadas en tubos de centrífuga (15 mL). Posteriormente se añadió 10 mL de metanol para la extracción de digoxina, los tubos fueron agitados mecánicamente por 10 minutos y la solución se hizo pasar a través de un filtro Whatman 1442-042 (tamaño de poro: 2.5 μm). El metanol fue evaporado a sequedad y la muestra fue reconstituida en 10 mL de agua. 200 μL de nanopartículas funcionalizadas se mezclan con 300 μL de solución amortiguadora de fosfatos (50 mM, pH=11.0) y 2 mL de muestra en un volumen final de 5 mL.

4.3 Resultados y discusión

4.3.1 Espectros UV-Vis y emisión de nanopartículas de AgInS_2 y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$

Los espectros UV-Vis de las nanopartículas de AgInS_2 sintetizadas por reflujo (Fig. 29.a) y autoclave (Fig. 29.b) no muestran diferencias significativas en cuanto al tiempo de reacción y la forma de espectro que presentan es característica de nanopartículas ternarias y esto se atribuye a que existen una gran dispersión en tamaños de partícula [79]. De forma visual se percibe una coloración marrón a lo largo de las reacciones.

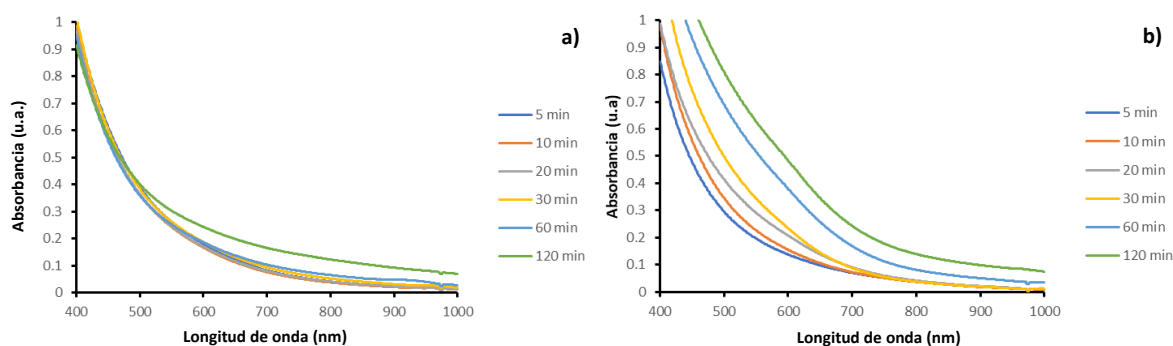


Figura 29. Espectros de absorción de nanopartículas de AgInS_2 a diferentes tiempos de reacción por síntesis a) hidrotérmica y b) solvotérmica.

Los espectros de absorción a diferentes tiempos de reacción de las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ sintetizadas por autoclave se presentan en la Figura 30.a. Los espectros muestran una amplia zona de absorción sin presentar un “pico” máximo de excitación, lo anterior es característico de las nanopartículas ternarias [79]. El band gap fue determinado de acuerdo con lo descrito por Neela *et al.* graficando la energía ($h\nu$, eV) contra el producto de la absorbancia por energía al cuadrado ($(Ah\nu)^2$) y extrapolando la tangente o segmento de línea recta del gráfico [80]. Las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ presentan band gap en el intervalo de 2.2 a 2.8 eV, valores característicos de materiales semiconductores (Fig. 30.b).

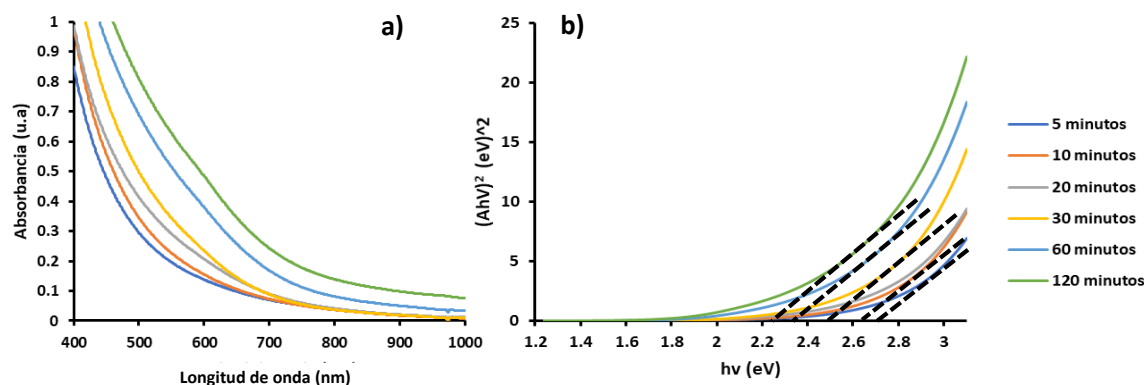


Figura 30. Espectros de absorción de nanopartículas de AgInS₂/ZnS (a) y band gap de nanopartículas de AgInS₂/ZnS (b).

Los espectros de emisión de las nanopartículas sintetizadas por las diferentes metodologías se muestran en la Figura 31, se observa un efecto hipercrómico en las nanopartículas sintetizadas por autoclave (31. b) en comparación a la sintetizadas por reflujo (31.a), esto se atribuye a que la reacción es favorecida por la presión y altas temperaturas (120°C) que se pueden alcanzar en una autoclave, propiciando de esta manera la maduración de Ostwald [81].

En el gráfico se observa una mayor fluorescencia de las nanopartículas de AgInS₂/ZnS (Fig. 31.c) en comparación con las de AgInS₂, el incremento de la señal se asocia a la formación de la capa externa de ZnS, lo que permite una mejora en el rendimiento cuántico (QY, relación entre fotones emitidos y absorbidos). De igual manera la coraza de ZnS le permite a la nanopartícula una mayor estabilidad lo que evita la fotooxidación y degradación de la nanopartícula [82].

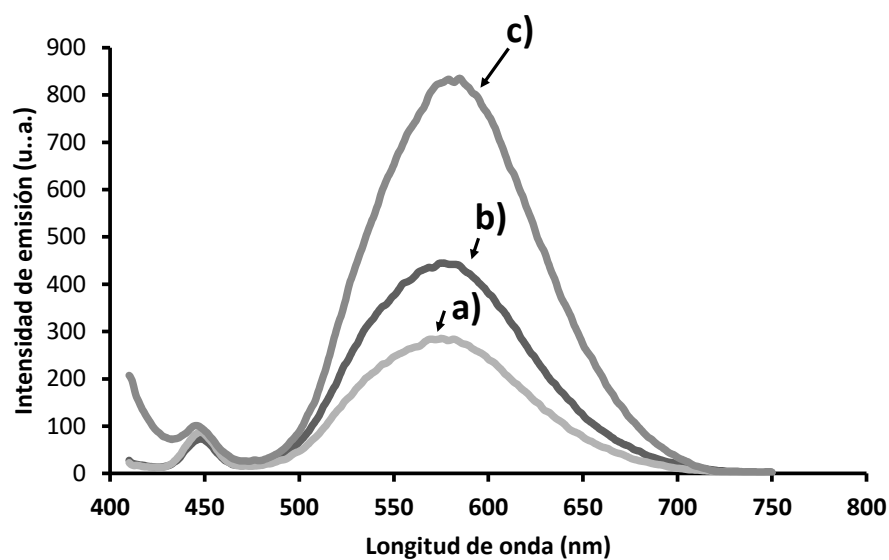


Figura 31. Espectros de emisión de nanopartículas de a) AgInS₂ sintetizados por reflujo, b) AgInS₂ sintetizados en autoclave y c) AgInS₂/ZnS sintetizados por autoclave.

Los espectros de emisión obtenidos, muestran efectos batocrómicos e hipercrómicos respecto al tiempo de síntesis. Debido a que no se observa un cambio significativo en la señal de fluorescencia se opta por el uso de las nanopartículas AgInS₂/ZnS sintetizadas por autoclave a los 20 minutos de reacción.

El cálculo de rendimiento cuántico de las nanopartículas sintetizadas se obtiene a partir de la obtención de la pendiente de diferentes concentraciones de un estándar y su comparación con las pendientes de diferentes concentraciones de nanopartículas, en este caso se emplea la fluoresceína cuyo valor de pendiente obtenido corresponde a un porcentaje de rendimiento cuántico de 93% (Tabla 9).

Tabla 9. Rendimiento cuántico (%QY) de nanopartículas sintetizadas.

| Compuesto | Pendiente (u.a.) | Rendimiento cuántico (QY) |
|--------------------------------|------------------|---------------------------|
| Fluoresceína | 137.48 | 93% |
| AgInS ₂ (reflujo) | 3.18 | 2.1% |
| AgInS ₂ (autoclave) | 15.56 | 10.5% |
| AgInS ₂ /ZnS | 36.55 | 24.7 |

Los valores de rendimiento cuántico corresponden a los descritos en la literatura para materiales semiconductores ternarios.

4.3.2 Evaluación espectroscópica de sistemas- AgInS₂/ZnS-Ácido ascórbico

Los espectros de emisión de nanopartículas de AgInS₂/ZnS en presencia de ácido ascórbico muestran un abatimiento de la señal de fluorescencias en las concentraciones evaluadas (0.2 -0.7 mM), esto se explica debido a la interacción entre la superficie de la nanopartícula con el ácido ascórbico lo que provoca una agregación de la nanopartícula de forma irreversible y la pérdida de su fluorescencia (Figura 32) [83]. El abatimiento no muestra una correlación lineal con la concentración de ácido ascórbico por lo que es de suma importancia evaluar el tiempo de reacción para verificar si es posible construir una curva de calibrado.

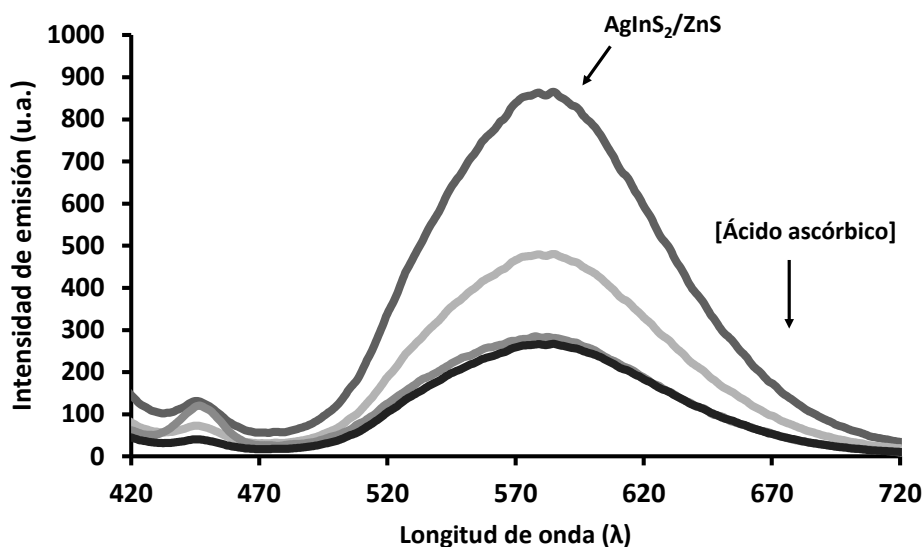


Figura 32. Espectros de emisión de nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ en presencia de diferentes concentraciones ácido ascórbico (0.2 mM, 0.5 mM y 0.7 mM).

4.3.3 Evaluación espectroscópica de sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -digoxina.

En la Figura 33 se muestran los sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -digoxina a diferentes concentraciones y se observa que no existen cambios en la intensidad de emisión de las nanopartículas esto se puede explicar a que la digoxina carece de propiedades redox que propicien fenómenos de PET, asimismo al ser una molécula neutra no puede formar complejos o alterar la superficie de la nanopartícula mediante cargas electrostáticas, por lo que para propiciar una interacción se propone el uso de agentes de selectivos a digoxina [84]. Lo anterior se corrobora en los espectros de emisión donde no se observa cambios en la señal analítica a 550 nm (Fig. 34).

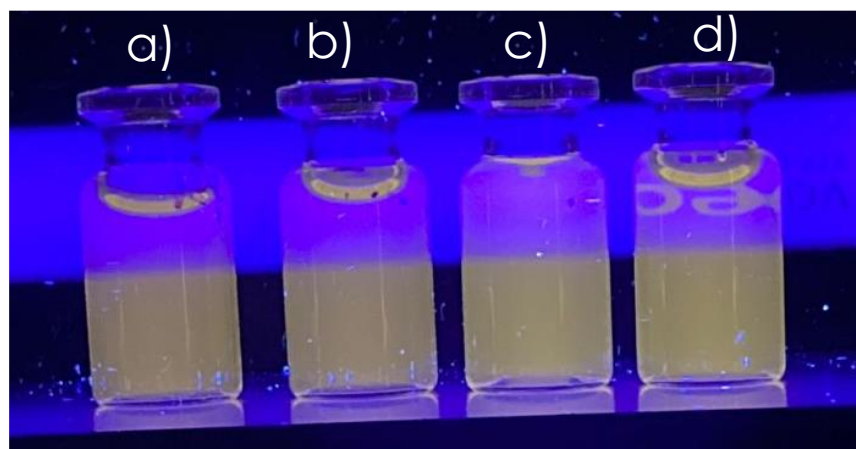


Figura 33. Sistemas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ en presencia de digoxina (a: 0 mM, b: 0.33 mM. c:1 mM y d:2mM)

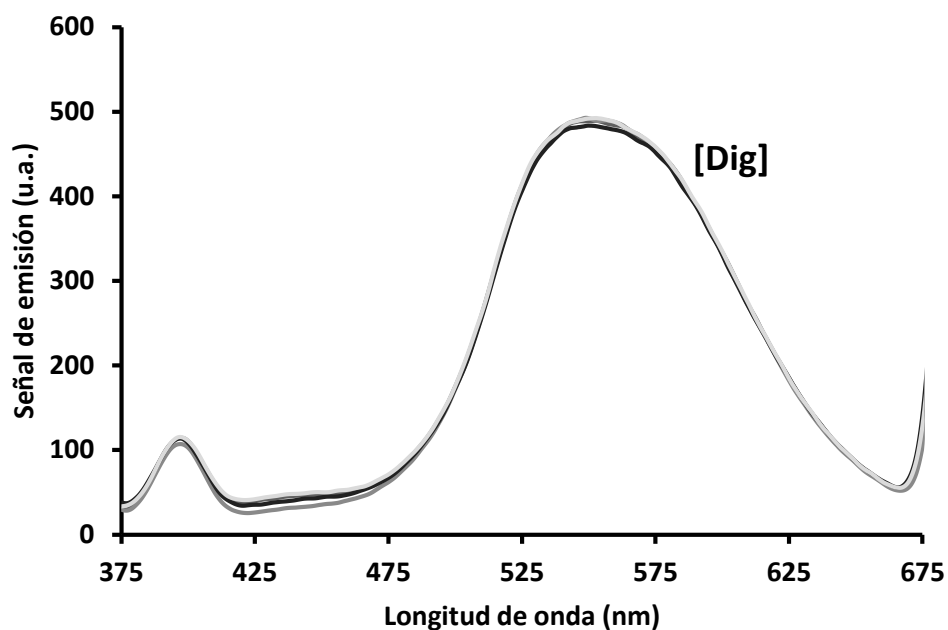


Figura 34. Espectros de emisión de nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ en presencia de diferentes concentraciones digoxina (0 – 2 mM).

4.3.4 Evaluación espectroscópica de sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -acrilamida

En la figura 35 se observa el abatimiento de la señal de emisión a los 550 nm, tras el incremento de la señal de emisión ($20 - 60 \mu\text{g L}^{-1}$), esto se explica debido a la formación de una red de poliacrilamida bajo la luz UV, lo cual ocasiona una transferencia de electrón fotoinducida (PET) entre las nanopartículas y la poliacrilamida. El abatimiento de la señal ha sido descrito para diferentes polímeros como el polimetilmetacrilato que promueve la disminución de la señal analítica de nanopartículas de CdSe [85].

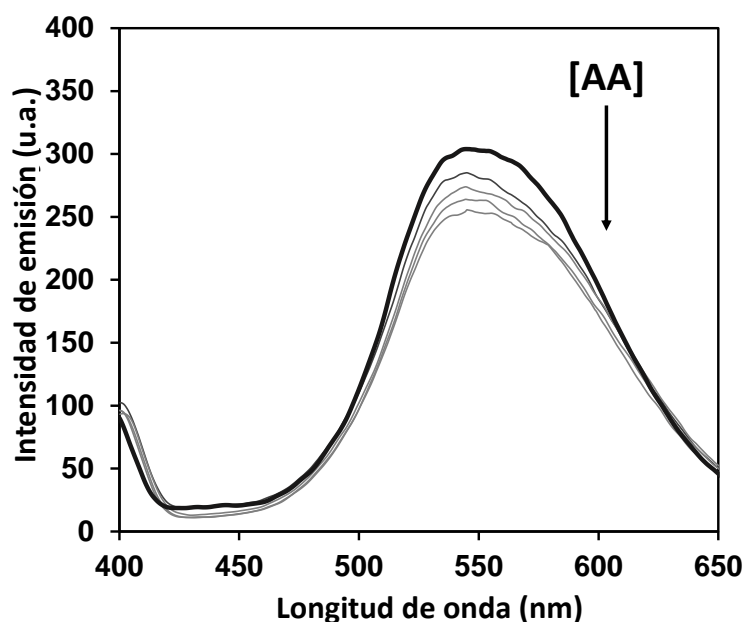


Figura 35. Espectro de emisión de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y AA (20 – 60 $\mu\text{g L}^{-1}$).

La segunda metodología desarrollada se basa en una reacción de adición de Michael, donde se emplea una molécula que contiene un grupo tiol para promover la adición a un compuesto carbonilo α - β -insaturado resultando en cambios espectroscópicos sobre las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ [86]. En este sentido se emplea 2-tionaftol (denominado 2N) como molécula para el desarrollo de la detección y cuantificación de acrilamida empleando nanopartículas de materiales semiconductores.

Como estudio preliminar 2N fue evaluado a diferentes concentraciones (10 - 30 μM) en presencia de nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$. En la figura 36.a, se presentan los espectros de los sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -2N, y se observa el abatimiento de la señal analítica a 550 nm conforme la concentración de 2N incrementa, los cambios espectroscópicos pueden ser explicados debido a un proceso PET. Adicionalmente se observa una señal a 470 nm atribuida los grupos cromóforos de 2N, para la determinación de acrilamida se selecciona la concentración de 2N de 30 μM , a esta concentración la señales a 450 y 550 nm se observa sin un traslape o interferencia de 2N.

Tras la selección de concentración de 2N en el sistema, diferentes concentraciones de acrilamida se añadieron y los cambios espectrofluorimétricos fueron evaluados. En la figura 36.b, se observa la recuperación de la señal analítica a 550 nm tras la adición de acrilamida, el comportamiento espectroscópico se puede explicar debido a la reversibilidad del proceso PET. 2N es un nucleófilo que reacciona con la acrilamida en una adición de Michael obteniendo 3-(naftalen-2-iltio) propanamida, el compuesto resultante no participa en el proceso PET recuperándose la señal de emisión abatida por 2N. La recuperación de señal de emisión ha sido descrita previamente por Liu, *et al*, en nanopartículas de CuInS_2 , en el sistema la señal de emisión es abatida por Cu^{2+} debido a un

proceso PET, y tras la adición de biotioles, se forma un complejo Cu(II)-biotiol, el cual no participa en el proceso PET recuperándose la señal de emisión de las nanopartículas [87].

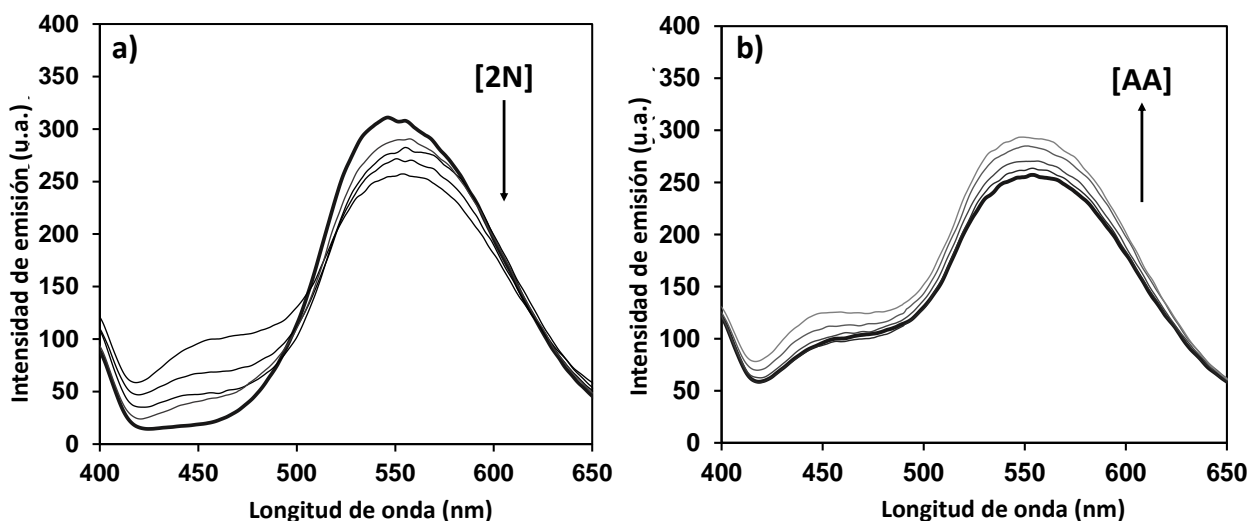


Figura 36. Espectros de emisión de nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y 2N ($10 - 30 \mu\text{M}$ a) y espectros de emisión de sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -2N y acrilamida ($5 - 30 \mu\text{g L}^{-1}$)

Las microscopías electrónicas de transmisión en presencia de AA (Fig. 37.a) y el sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (Fig. 37.b) muestran una diferencia significativa en la proximidad entre partículas, mostrando un incremento en la distancia entre las nanopartículas en el segundo sistema. Hu, *et al.* han descrito que cuando las nanopartículas tienen mayor proximidad la emisión disminuye, y cuando la distancia entre nanopartículas se incrementa también lo hace la emisión [88].

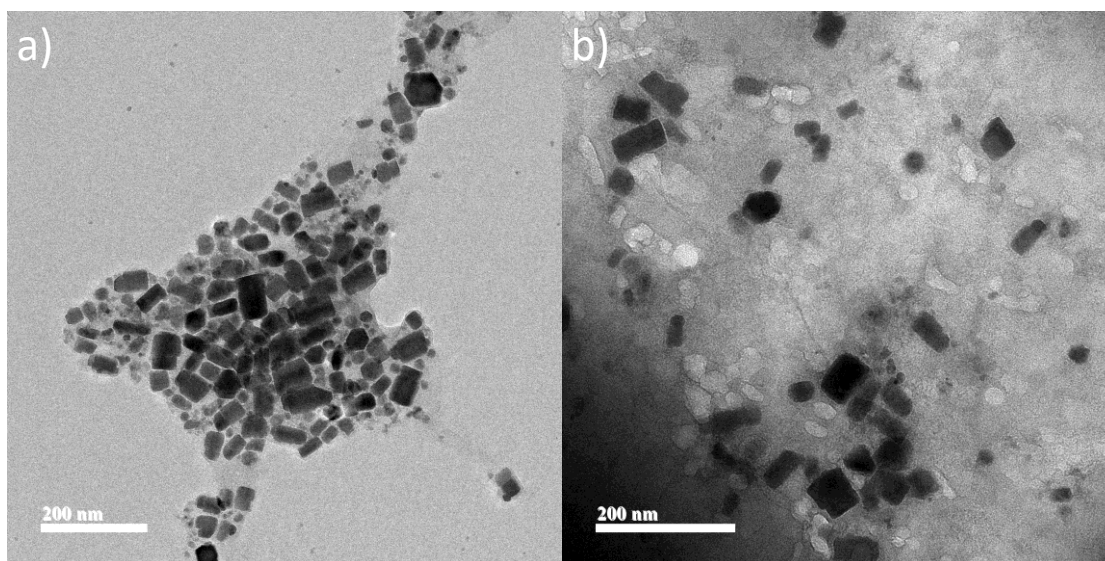


Figura 37. Microscopías electrónicas de transmisión de a) AgInS_2 -AA y b) $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ -2N-AA

4.3.4.1 Validación de metodologías analíticas

En condiciones óptimas se construyeron las curvas de calibrado a diferentes concentraciones de acrilamida ($5 - 60 \mu\text{g L}^{-1}$) empleando ambas metodologías desarrolladas ($\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N}$). Las curvas consisten en graficar la señal de emisión abatida (sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-PAA}$) o recuperada (sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$) a 550 nm contra la concentración de AA. Ambas metodologías presentan una correlación lineal entre la señal analítica y la concentración de AA. El sistema que consta de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y AA (poliacrilamida) presentan un intervalo lineal de $15 - 60 \mu\text{g L}^{-1}$. El sistema que incluye $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$ presenta un incremento en el LOQ pero una disminución en el intervalo lineal ($4.8 - 30 \mu\text{g L}^{-1}$). Los LOD de las metodologías fueron obtenidos a partir de lo descrito por la IUPAC siendo el resultado de $3.29 s_e/b_1$ y los LOQ $10 s_e/b_1$ donde s_e es la raíz cuadrada de la varianza residual y b_1 la sensibilidad analítica. De acuerdo con diversos autores la concentración de AA en productos de fritura se encuentra en el intervalo de 100 a $2200 \mu\text{g kg}^{-1}$, por lo que es necesaria una metodología con mejores LOQ para este tipo de análisis [89].

Los parámetros analíticos obtenidos de la curva de calibrado del análisis de AA se presentan en la Tabla 10. La precisión intermedia de las metodologías se expresan en términos de repetibilidad y reproducibilidad y se expresan como el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de tres determinaciones el mismo día y de tres días diferentes respectivamente. Para ello se emplearon estándares de acrilamida de 20 y $25 \mu\text{g L}^{-1}$, la repetibilidad y reproducibilidad de las concentraciones fueron menores al 5% de RSD para todas las soluciones estándar en las metodologías indicando una precisión adecuada.

Tabla 10. Parámetros analíticos obtenidos a partir de las curvas de calibrado

| | Abatimiento de fluorescencia ($\text{AgInS}_2/\text{ZnS-PAA}$) | Recuperación de fluorescencia ($\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$) |
|---|--|---|
| Parámetro | Valor | Valor |
| Ordenada al origen $b_0 \pm ts(b_0)$ (AU) | 1.7 ± 6.2 | 0.6 ± 4.4 |
| Sensibilidad, $b_1 \pm ts(b_1)$, (AU L μg^{-1}) | 0.9 ± 0.1 | 2.1 ± 0.2 |
| Intervalo lineal ($\mu\text{g L}^{-1}$) | $15.6 - 60.0$ | $4.8 - 30.0$ |
| Límite de detección ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 5.2 | 1.6 |
| Límite de cuantificación ($\mu\text{g L}^{-1}$) | 15.6 | 4.8 |
| Repetibilidad | 3.1 | 2.9 |
| (%RSD, $n=3$, $20.0 \mu\text{g L}^{-1}$) | 1.7 | 1.9 |
| (%RSD, $n=3$, $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$) | | |
| Reproducibilidad | 4.9 | 2.2 |
| (%RSD, $n=3$, $20.0 \mu\text{g L}^{-1}$) | 4.6 | 3.8 |
| (%RSD, $n=3$, $25.0 \mu\text{g L}^{-1}$) | | |

La selectividad de las metodologías fue evaluada añadiendo los potenciales interferentes a 1% en los sistemas con acrilamida a $25 \mu\text{g L}^{-1}$. Los potenciales interferentes seleccionados fueron los carbohidratos de mayor contenido en papas y productos basados en trigo (almidón y sacarosa), los azúcares reductores (fructosa y glucosa) y los colorantes añadidos (tartrazina, rojo allura y amarillo oca).

Las moléculas evaluadas se consideran interferentes cuando existe una diferencia en la señal analítica de $\pm 5\%$ en comparación a la respuesta sin los interferentes. Los resultados muestran que las moléculas no muestran interferencia en el análisis de AA cuando se emplea el sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$, sin embargo, se observa un abatimiento de la señal analítica (7%) por parte del almidón en el sistema $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-AA}$, este efecto ha sido descrito previamente para nanopartículas de CdS, CdSe y ZnS [90].

Ambas metodologías presentan parámetros analíticos adecuadas y fueron aplicadas para la determinación de AA en muestras alimenticias. La concentración de AA en las muestras fue determinada por interpolación de la curva de calibrado, y los resultados son expresados en $\mu\text{g kg}^{-1}$. La concentración de AA encontrada en cada muestra se presenta en la Tabla 11. La exactitud de las metodologías propuestas fue determinada mediante la comparación de los datos obtenidos con HPLC-FLD empleando una prueba *t* de datos emparejados. Los resultados obtenidos por la estrategia $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (abatimiento) muestran diferencia significativa en comparación a HPLC-FLD. Por otra parte, los valores obtenidos por la metodología $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$, no presentan diferencia significativa en comparación a la metodología HPLC-FLD [77].

Los valores obtenidos a partir de la primera metodología desarrollada muestran una sobre cuantificación de acrilamida debido a la interferencia de almidón. En contraste, la metodología $\text{AgInS}_2/\text{ZnS-2N-AA}$ mejora la selectividad dado que está condicionada a la reacción de Michael y los valores obtenidos son similares a lo obtenido por HPLC-FLD. Tomando en cuenta el desempeño analítico de las metodologías, la recuperación de la fluorescencia es la mejor opción para la determinación de acrilamida en productos fritos.

Tabla 11. Concentración de acrilamida determinada en productos de fritura determinados por las metodologías propuestas y HPLC-FLD.

| Muestra | Abatimiento de fluorescencia (AgInS ₂ /ZnS-PAA, $\mu\text{g kg}^{-1}$) | Recuperación de fluorescencia (AgInS ₂ /ZnS-2N-AA, $\mu\text{g kg}^{-1}$) | HPLC-FLD ($\mu\text{g kg}^{-1}$) |
|---------|--|---|------------------------------------|
| 1 | 396.0 | 294.8 | 255.4 |
| 2 | 715.6 | 611.3 | 645.1 |
| 3 | 1613.8 | 1582.7 | 1619.8 |
| 4 | 627.8 | 395.4 | 410.0 |
| 5 | 1245.3 | 1124.3 | 1108.0 |
| 6 | 634.8 | 673.8 | 666.8 |
| 7 | 667.3 | 633.3 | 634.9 |
| 8 | 329.5 | 285.7 | 292.8 |
| 9 | 1400.6 | 1090.5 | 1349.9 |
| 10 | 514.7 | 528.4 | 533.7 |

4.3.5 Evaluación espectroscópica de sistemas nanopartículas funcionalizadas y digoxina.

En la Figura 38 se muestran los sistemas AgInS₂ (Fig. 38 a, b y c) y AgInS₂/ZnS (Fig. 38 d, e y f) funcionalizadas a diferentes concentraciones de ácido 4-aminofenilborónico 20, 40 y 80 μM en presencia de digoxina (80 μM). La funcionalización esta mediada por 1-etil-3- (3 dimetilaminopropil) carbodiimida y N-hidrosulfosuccinimida lo cual permite la formación de una amida entre el grupo carboxilo en la superficie de la nanopartícula y el grupo amino del ácido 4-aminofenilborónico, obteniendo una nanopartícula fluorescente con un ácido borónico como ion boronato en la superficie que permite reconocer sistemas cis-1,2- diol como la digoxina [91].

En la evaluación espectroscópica se observa que no existen cambios en la intensidad de emisión de las nanopartículas cuando están funcionalizadas en concentraciones de 20 y 40 μM de ácido 4-aminofenil borónico, (Fig. 38 a, b, d y e) en presencia de digoxina, sin embargo cuando se emplea una concentración de 80 μM de ácido 4-aminofenilborónico se observa un cambio en la fluorescencia de las nanopartículas en presencia de la digoxina (80 μM) (Fig. 38 c y f). Esto se puede atribuir a que las nanopartículas al presentar un mayor número de moléculas de ácido 4-aminofenilborónico en la superficie se favorece la mayor interacción entre la nanopartícula y la digoxina contribuyendo a un cambio en la fluorescencia del sistema, por lo que se selecciona la concentración de ácido 4-aminofenilborónico de 80 μM para el desarrollo de la estrategia de análisis [54].

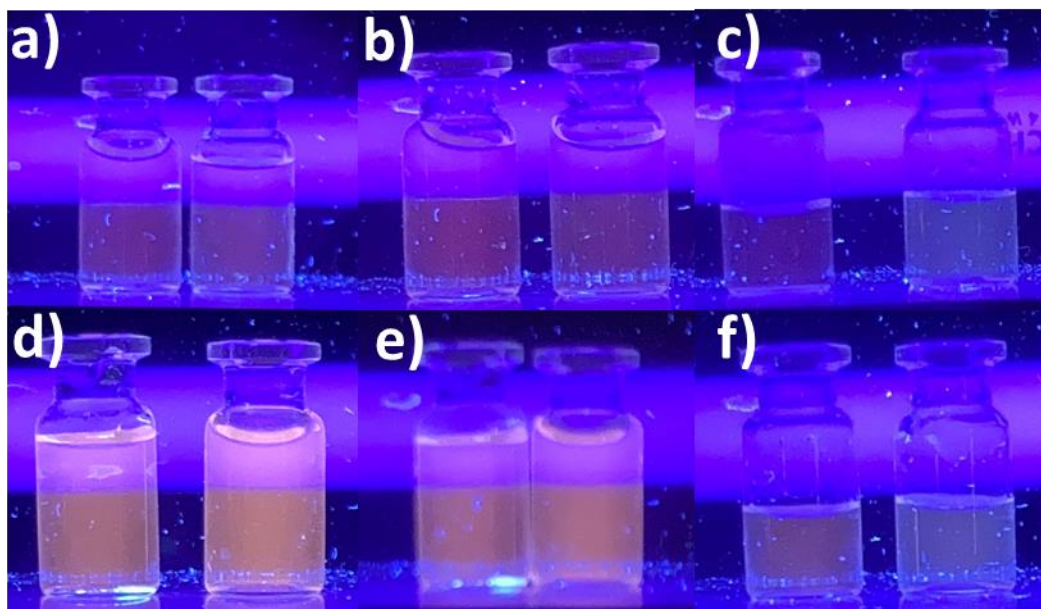


Figura 38. Nanopartículas de AgInS_2 (a,b y c) y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (d,e y e) funcionalizadas con ácido 4-aminofenilborónico 20, 40 y 80 μM en presencia de digoxina 80 μM .

4.3.5.1 Espectros de fluorescencia de sistemas AgInS_2 y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ funcionalizadas en presencia de digoxina.

Una vez seleccionada la concentración óptima de ácido 4-aminofenilborónico para la funcionalización (80 μM) se construyen los sistemas de nanopartículas de AgInS_2 y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ y en presencia de diferentes concentraciones del analito (6.0-80.0 μM) con el objetivo de evaluar los cambios en la señal de fluorescencia. En la Figura 39.a se presentan los espectros de AgInS_2 funcionalizadas en presencia de diferentes concentraciones de digoxina, en los que se observan 2 fenómenos espectroscópicos: 1) el incremento de la señal analítica a los 440 nm en el intervalo de 20-60 μM (Fig. 39.a.ii y iii) atribuido a la formación del complejo boronato-digoxina [91] y 2) a concentraciones mayores (80 μM) se observa el abatimiento de la fluorescencia a los 440 nm (Fig. 39.a.iv) [18], indicativo de la agregación de las nanopartículas. Debido que la señal de emisión del ácido 4-aminofenilborónico y la de las nanopartículas se traslapan se plantea el uso de nanopartículas núcleo/coraza.

En la Figura 39.b se presentan los espectros de fluorescencia de los sistemas $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$, estos presentan 2 máximos en la señal de emisión a los 420 nm y a los 550 nm asociados a el ácido 4-aminofenilborónico y a las nanopartículas respectivamente. Tras la adición de digoxina (6.0 – 80.0 μM) se observa el incremento de la señal de fluorescencia a los 440 nm y el abatimiento a los 550 nm. Debido a que la formación del complejo entre el boronato-digoxina es un proceso reversible y a que la disminución de la fluorescencia debido a la agregación de la nanopartícula es un proceso irreversible se opta por llevar a cabo el seguimiento del analito a los 550 nm [93].

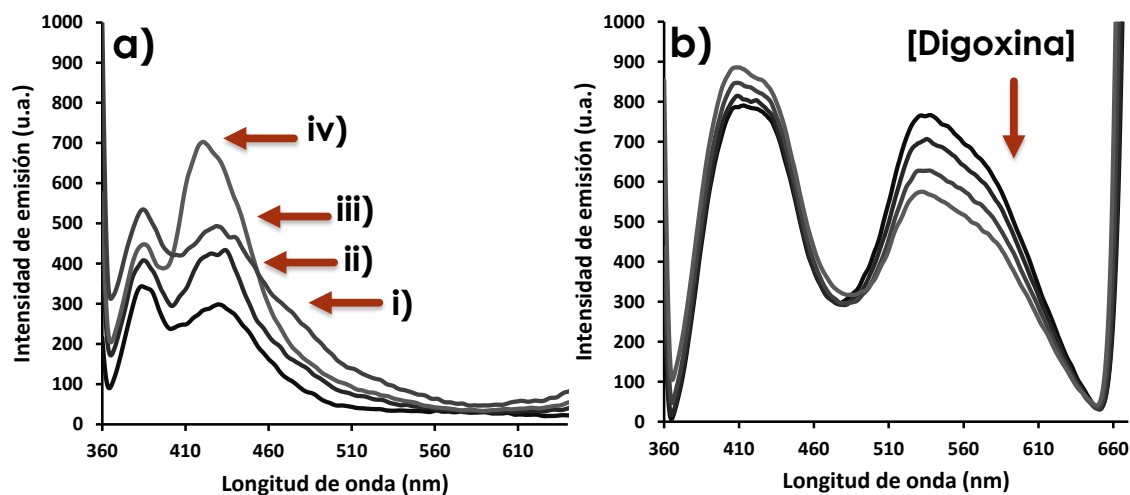


Figura 39. Espectros de emisión de AgInS_2 funcionalizadas (a.i) en presencia de digoxina (20.0 a.ii, 60.0 a.iii, y 80.0 μM a.iv) y $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ (b) funcionalizadas con ácido 4 -aminofenilborónico en presencia de digoxina (6.0 – 80.0 μM)

La disminución de la señal de emisión se atribuye a que la nanopartícula presenta en su superficie ácido 4-aminofenilborónico que al formar un complejo boronato-digoxina se induce un cambio en el tamaño y la carga disminuyendo su estabilidad y provocando su agregación. Este comportamiento se ha observado previamente en nanopartículas ternarias con otros analitos como la tripsina, oxitetraciclina, Pb^{2+} , en las que tras la interacción nanopartícula-analito se observa la disminución de la señal analítica [94,95,96].

4.3.5.2 Efecto de la interacción nanopartícula-digoxina en el tamaño de nanopartículas.

Las microscopías electrónicas de transmisión de las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ muestran una morfología prismática de un diámetro medio de 62.5 nm (Fig. 40.a), cuando se lleva a cabo la funcionalización de las nanopartículas se observa un cambio en la estructura a nanorods, esto se puede explicar debido a que la presencia de especies de boro (boronato) en la superficie de la nanopartícula las cuales pueden interactuar con otros grupos boronato de otras nanopartículas y formar dímeros o polímeros lo que permite la formación de diferentes estructuras [97, 98].

La formación de nanorods permite obtener nanopartículas de mayor tamaño con menor distribución de tamaño, lo cual resulta en la reducción anchura a media altura de la señal de fluorescencia de las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ de 107 nm hasta 60 nm en algunas nanopartículas funcionalizadas (Fig. 40.b) [99].

La interacción entre los grupos boronato en la superficie de las nanopartículas funcionalizadas y la digoxina resulta en la disminución de la señal analítica de fluorescencia de las $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$. En la microscopia 40.c se observa la formación de agregados de nanopartículas. [100].

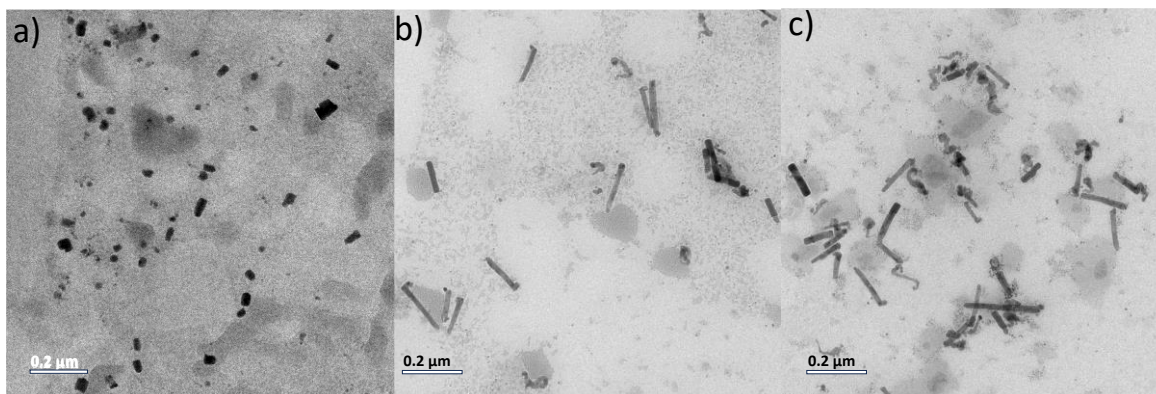


Figura 40. a) Nanopartículas de AgInS₂/ZnS, b) nanopartículas de AgInS₂/ZnS funcionalizadas con ácido 4-aminofenilborónico y c) nanopartículas de AgInS₂/ZnS funcionalizadas con ácido 4-aminofenilborónico en presencia de digoxina.

4.3.5.3 Validación de metodología analítica

Los parámetros de desempeño analítico de las metodologías propuestas fueron obtenidos en un intervalo de concentración de digoxina 0 a 80.0 μM , para ello se construye una curva de calibrado entre la concentración de digoxina contra el cambio en la señal de emisión a los 550 nm. Los parámetros analíticos son obtenidos a partir de la curva de calibrado del análisis de digoxina se presentan en la Tabla 10, se destaca la sensibilidad analítica ($3.60 \text{ UA } \mu\text{M}^{-1}$), intervalo lineal de trabajo ($5.70 - 80.00 \mu\text{M}$), límite de detección ($1.90 \mu\text{M}$) y LOQ ($5.70 \mu\text{M}$) [23]. La precisión intermedia de las metodologías se expresan términos de repetibilidad y reproducibilidad y se expresan como el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD) de tres determinaciones el mismo día y de tres días diferentes respectivamente. Para ello se emplearon estándares de digoxina 10 y 20 μM , la repetibilidad y reproducibilidad de las concentraciones fueron menores al 5% de RSD para todas las soluciones estándar en las metodologías indicando una precisión adecuada (Tabla 12) [89].

Tabla 12. Parámetros analíticos de metodología espectrofluorimétrica de análisis de digoxina.

| Parámetro | Valor |
|---|-----------------|
| Ordenada al origen $b_0 \pm ts(b_0)$ (AU) | 2.95 ± 5.19 |
| Sensibilidad, $b_1 \pm ts(b_1)$, (UA μM^{-1}) | 3.60 ± 0.15 |
| Intervalo lineal (μM) | $5.70 - 80.00$ |
| Límite de detección (μM) | 1.90 |
| Límite de cuantificación (μM) | 5.70 |
| Repetibilidad | |
| (%RSD, n=3, 10 μM) | 1.2 |
| (%RSD, n=3, 20 μM) | 1.6 |
| Reproducibilidad | |
| (%RSD, n=3, 10 μM) | 2.2 |
| (%RSD, n=3, 20 μM) | 4.4 |

La selectividad de la metodología fue evaluada añadiendo los potenciales interferentes en presencia de digoxina 20 μM , para ello se seleccionaron moléculas presentes en las formulaciones farmacéuticas (almidón 20 %, lactosa 50%, y estereato de magnesio 5%). Las moléculas evaluadas se consideran como interferentes cuando existe una diferencia en la señal analítica mayor al $\pm 5\%$ en comparación al estándar evaluado sin interferentes. Los resultados muestran que las moléculas evaluadas no presentan interferencia en el análisis espectrofluorimétrico de digoxina, sin embargo, la lactosa presenta la mayor contribución al sistema (4.6%), esto se atribuye a que la estructura presenta un sistema 1,2-diol que puede interactuar con el boronato en la superficie de la nanopartícula obteniendo una estructura poco estable.

La metodología desarrollada fue empleada en la determinación de digoxina en muestras farmacéuticas (tabletas). La concentración de digoxina fue determinada por interpolación en la curva de calibrado y los resultados son expresados en μM . Las concentraciones de digoxina determinadas en las muestras se encuentran en la Tabla 13. La exactitud de la metodología propuesta fue determinada mediante la comparación de los datos obtenidos mediante la metodología espectrofluorimétrica con las concentraciones de digoxina obtenidas con una estrategia HPLC-UV, empleando una prueba t para dos muestras con varianzas iguales. Los valores obtenidos mediante la técnica espectrofluorimétrica no presentan diferencia significativa a los obtenidos por HPLC-UV debido a que el valor de t_{cri} de t de 2.12 es superior al valor de $t_{\text{calc}}=0.60$.

Tabla 13. Concentración de digoxina en muestras farmacéuticas

| Muestra | Metodología espectrofluorimétrica μM (%DER) y μg tableta⁻¹ | HPLC-UV (μM) |
|----------------|--|---|
| 1 | 32.09 (0.40) 250.63 | 31.69 (2.05) 247.46 |
| 2 | 31.59 (3.62) 246.67 | 31.42 (0.60) 245.43 |
| 3 | 31.11 (0.64) 242.98 | 31.21 (1.70) 243.76 |

4.4 Conclusiones

Los espectros de emisión de las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ muestran un efecto batocrómico e hipercrómico y un aumento en el rendimiento cuántico en comparación a las nanopartículas de AgInS_2 como resultado del aumento de tamaño y pasivación de la partícula por la formación de una capa de ZnS sobre el núcleo.

Las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ no presentan cambios en la intensidad de fluorescencia al interactuar con la digoxina debido a que la digoxina carece de carga o propiedades redox que permitan la interacción nanopartícula-artículo. Las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ presentan un abatimiento de la señal de emisión en presencia de acrilamida o 2-tionaftol atribuido a un fenómeno de transferencia de electrón fotoinducida. Las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ presentan una recuperación en la intensidad de emisión al adicionar acrilamida al sistema nanopartícula-2-tionaftol debido a la formación de 3-(2-naftiltiol) propanamida, permitiendo el desarrollo de una estrategia analítica para la determinación de acrilamida en muestras alimenticias.

Las nanopartículas de materiales semiconductores $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ funcionalizadas con ácido 4-aminofenil borónico ($80 \mu\text{M}$) presentan interacción con la digoxina, lo cual se observa en la disminución de la fluorescencia a 550 nm , lo cual permite el desarrollo de una metodología analítica. Asimismo, los parámetros de desempeño obtenidos de la metodología espectrofluorimétrica permite la cuantificación de digoxina en muestras farmacéuticas.

La determinación de digoxina en muestras farmacéuticas se realizó mediante una metodología espectrofluorimétrica, la cual se basa en la disminución de la señal analítica de emisión a los 550 nm de las nanopartículas de $\text{AgInS}_2/\text{ZnS}$ funcionalizadas con ácido 4-aminofenil borónico. La metodología propuesta presenta LOD de $3.60 \mu\text{M}$, así como repetibilidad y reproducibilidad menor al 5%, lo cual lo hace competitivo a las estrategias cromatográficas (HPLC-UV).

Bibliografía

5. Bibliografía

- [1] Botelho, A. F. M., Pierezan, F., Soto-Blanco, B., Melo, M. M. (2019). A review of cardiac glycosides: Structure, toxicokinetics, clinical signs, diagnosis and antineoplastic potential. *Toxicol*, 158, 63-68.
- [2] Karaś, K., Sałkowska, A., Dastyk, J., Bachorz, R. A., Ratajewski, M. (2020). Cardiac glycosides with target at direct and indirect interactions with nuclear receptors. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 127, 110106.
- [3] Petschenka, G., Züst, T., Hastings, A. P., Agrawal, A. A., Jander, G. (2023). Quantification of plant cardenolides by HPLC, measurement of Na⁺/K⁺-ATPase inhibition activity, and characterization of target enzymes. In *Methods in enzymology* (Vol. 680, pp. 275-302). Academic Press.
- [4] Patel, S. (2016). Plant-derived cardiac glycosides: Role in heart ailments and cancer management. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 84, 1036-1041.
- [5] Zhang, Y., Shi, X., Han, J., Peng, W., Fang, Z., Zhou, Y., Lin, Y. (2021). Convallatoxin promotes M2 macrophage polarization to attenuate atherosclerosis through PPAR γ -integrin $\alpha\beta 5$ signaling pathway. *Drug Design, Development and Therapy*, 803-812.
- [6] Cheng, C. S., Wang, J., Chen, J., Kuo, K. T., Tang, J., Gao, H., Meng, Z. (2019). New therapeutic aspects of steroidal cardiac glycosides: the anticancer properties of Huachansu and its main active constituent Bufalin. *Cancer Cell International*, 19(1), 1-27.
- [7] Elbaz, H. A., Stueckle, T. A., Tse, W., Rojanasakul, Y., Dinu, C. Z. (2012). Digitoxin and its analogs as novel cancer therapeutics. *Experimental hematology & oncology*, 1(1), 1-10.
- [8] Kumar, A., De, T., Mishra, A., & Mishra, A. K. (2013). Oleandrin: A cardiac glycosides with potent cytotoxicity. *Pharmacognosy reviews*, 7(14), 131.
- [9] Baecher, S., Kroiss, M., Fassnacht, M., Vogeser, M. (2014). No endogenous ouabain is detectable in human plasma by ultra-sensitive UPLC-MS/MS. *Clinica Chimica Acta*, 431, 87-92.
- [10] Ueda, Y., Mishiro, K., Yoshida, K., Furuta, T., Kawabata, T. (2012). Regioselective diversification of a cardiac glycoside, lanatoside C, by organocatalysis. *The Journal of Organic Chemistry*, 77(18), 7850-7857.
- [11] Patocka, J., Nepovimova, E., Wu, W., & Kuca, K. (2020). Digoxin: Pharmacology and toxicology—A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 79, 103400.
- [12] Shattock, M. J., Ottolia, M., Bers, D. M., Blaustein, M. P., Boguslavskyi, A., Bossuyt, J., Xie, Z. J. (2015). Na⁺/Ca²⁺ exchange and Na⁺/K⁺-ATPase in the heart. *The Journal of physiology*, 593(6), 1361-1382.
- [13] Roberts, D. M., Gallapatthy, G., Dunuwille, A., Chan, B. S. (2016). Pharmacological treatment of cardiac glycoside poisoning. *British journal of clinical pharmacology*, 81(3), 488-495.
- [14] Martin, N., Soriani, O., Bernard, D. (2020). Cardiac glycosides as senolytic compounds. *Trends in Molecular Medicine*, 26(3), 243-245.

- [15] Laursen, M., Gregersen, J. L., Yatime, L., Nissen, P., Fedosova, N. U. (2015). Structures and characterization of digoxin-and bufalin-bound Na⁺, K⁺-ATPase compared with the ouabain-bound complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(6), 1755-1760.
- [16] National Center for Biotechnology Information (2023). PubChem Compound Summary for CID 2724385, Digoxin. Retrieved September 26, 2023, from <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Digoxin>.
- [17] Carroll, E., Ravi Gopal, B., Raghavan, I., Mukherjee, M., Wang, Z. Q. (2023). A cytochrome P450 CYP87A4 imparts sterol side-chain cleavage in digoxin biosynthesis. *Nature Communications*, 14(1), 4042.
- [18] Jamshed, F., Dashti, F., Ouyang, X., Mehal, W. Z., Banini, B. A. (2023). New uses for an old remedy: Digoxin as a potential treatment for steatohepatitis and other disorders. *World Journal of Gastroenterology*, 29(12), 1824.
- [19] Salcedo-Mingoarranz, Á. L., García-Díaz, B., Barcia-Hernández, E. (2022). Population pharmacokinetics of digoxin in elderly patients: A systematic review. *Farmacia Hospitalaria*, 46(6), 359-366.
- [20] Muzzarelli, S., Stricker, H., Pfister, O., Foglia, P., Moschovitis, G., Mombelli, G., Brunner-La Rocca, H. (2011). Individual dosage of digoxin in patients with heart failure. *QJM: An International Journal of Medicine*, 104(4), 309-317.
- [21] Dasgupta, A., Wahed, A. (2021). Chapter 2: Immunoassay design and issues of interferences. *Clinical Chemistry, Immunology and Laboratory Quality Control*, second ed., Academic Press, Elsevier Science Ltd, San Diego, 1, 25-45.
- [22] Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, 72, 4-15.
- [23] Dasgupta, A. (2022). Significant Improvement in Digoxin Immunoassays Over Four Decades: Newer Assays are Less Affected by Interferences. *Therapeutic Drug Monitoring*, 10-1097.
- [24] Li, H., Sørensen, J. V., Gothelf, K. V. (2019). Quantitative detection of digoxin in plasma using small-molecule immunoassay in a recyclable gravity-driven microfluidic chip. *Advanced Science*, 6(6), 1802051.
- [25] Skoog, D. A., West, D. M., Holler, J. (2020). *Fundamentos de química analítica. Volumen 2*. Reverté.
- [26] DagerAlbalawi, M. A. (2016). Chemistry, spectroscopic characteristics and biological activity of natural occurring cardiac glycosides. *IOSR J. Biotechnol. Biochem*, 2, 20-35.
- [27] Botelho, A. F., Miranda, A. L., Freitas, T. G., Milani, P. F., Barreto, T., Cruz, J. S., Melo, M. M. (2020). Comparative cardiotoxicity of low doses of digoxin, ouabain, and oleandrin. *Cardiovascular Toxicology*, 20, 539-547.

- [28] Laguna-Hernández, G., Brechú-Franco, A. E., De la Cruz-Chacón, I., González-Esquinca, A. R. (2017). A histochemical technique for the detection of annonaceous acetogenins. *Histochemistry of Single Molecules: Methods and Protocols*, 331-338.
- [29] Britten, A. Z., & Njau, E. (1975). The specific fluorimetric determination of digoxin. *Analytica Chimica Acta*, 76(2), 409-415.
- [30] Harris, D. C. (2003). *Análisis químico cuantitativo*. Editorial Reverté
- [31] Jedlička, A., Grafnetterová, T., Miller, V. (2003). HPLC method with UV detection for evaluation of digoxin tablet dissolution in acidic medium after solid-phase extraction. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 33(1), 109-115.
- [32] Lawrence, J. F., Frei, R. W. (2000). *Chemical derivatization in liquid chromatography*. Elsevier.
- [33] Morsy, N. (2017). *Cardiac glycosides in medicinal plants. Aromatic and medicinal plants—back to nature*. London: Intechopen, 29-45.
- [34] Chen, S. H., Wu, H. L., Chang, J. C., Wu, S. M., Lin, S. J. (1999). Simultaneous determination of digoxin and digitoxin by derivatization and high-performance liquid chromatography. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 22(15), 2321-2335.
- [35] Danielson, N. D., Gallagher, P. A., Bao, J. J. (2000). Chemical reagents and derivatization procedures in drug analysis. *Encyclopedia of Analytical Chemistry*, 7042-7076.
- [36] Pashazadeh-Panahi, P., Hasanzadeh, M. (2020). Digoxin as a glycosylated steroid-like therapeutic drug: Recent advances in the clinical pharmacology and bioassays of pharmaceutical compounds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 123, 109813.
- [37] Yao, M., Zhang, H., Chong, S., Zhu, M., Morrison, R. A. (2003). A rapid and sensitive LC/MS/MS assay for quantitative determination of digoxin in rat plasma. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32(6), 1189-1197.
- [38] Ballotari, M., Taus, F., Tolle, G., Danese, E., Dorizzi, R. M., Tagliaro, F., Gottardo, R. (2022). Development of a new ultra-high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of digoxin and digitoxin in plasma: Comparison with a clinical immunoassay. *Electrophoresis*, 43(9-10), 1019-1026.
- [39] Thormann, W. (2018). Theoretical principles of capillary electromigration methods. In *Capillary Electromigration Separation Methods* (pp. 21-44). Elsevier.
- [40] Ghosal, S. (2006). Electrokinetic flow and dispersion in capillary electrophoresis. *Annu. Rev. Fluid Mech.*, 38, 309-338.
- [41] Kubáň, P., Dvořák, M., Kubáň, P. (2019). Capillary electrophoresis of small ions and molecules in less conventional human body fluid samples: A review. *Analytica Chimica Acta*, 1075, 1-26.
- [42] Guijarro-Díez, M., Paniagua, G., Fernández, P., Crego, A. L., Marina, M. L. (2012). Molecularly imprinted SPE and MEKC with in-capillary sample pre-concentration for the determination of digoxin in human urine. *Electrophoresis*, 33(11), 1582-1588.

- [43] Wuethrich, A., Quirino, J. P. (2018). Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2015–2017). *Electrophoresis*, 39(1), 82-96.
- [44] Waterval, J. C., Lingeman, H., Bult, A., Underberg, W. J. (2000). Derivatization trends in capillary electrophoresis. *ELECTROPHORESIS: An International Journal*, 21(18), 4029-4045.
- [45] Kostel, K. L., Lunte, S. M. (1997). Evaluation of capillary electrophoresis with post-column derivatization and laser-induced fluorescence detection for the determination of substance P and its metabolites. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 695(1), 27-38.
- [46] Wuethrich, A., Quirino, J. P. (2016). Derivatisation for separation and detection in capillary electrophoresis (2012–2015). *Electrophoresis*, 37(1), 45-55.
- [47] Yu, Y. L., Shi, M. Z., Zhu, S. C., Cao, J. (2022). Rapid stacking of amino acids in soybean and *Dendrobium officinale* by on-capillary sandwich derivatization in capillary electrophoresis. *Food Research International*, 162, 112071.
- [48] Akamatsu, S., Mitsuhashi, T. (2012). Development of a simple capillary electrophoretic determination of glucosamine in nutritional supplements using in-capillary derivatisation with o-phthalaldehyde. *Food chemistry*, 130(4), 1137-1141.
- [49] Kubo, T., Kanemori, K., Kusumoto, R., Kawai, T., Sueyoshi, K., Naito, T., Otsuka, K. (2015). Simple and effective label-free capillary electrophoretic analysis of sugars by complexation using quinoline boronic acids. *Analytical chemistry*, 87(10), 5068-5073.
- [50] Simpson Jr, S. L., Quirino, J. P., Terabe, S. (2008). On-line sample preconcentration in capillary electrophoresis: Fundamentals and applications. *Journal of Chromatography A*, 1184(1-2), 504-541.
- [51] Šlampová, A., Malá, Z., Pantůčková, P., Gebauer, P., Boček, P. (2013). Contemporary sample stacking in analytical electrophoresis. *Electrophoresis*, 34(1), 3-18.
- [52] Stanisavljevic, M., Krizkova, S., Vaculovicova M., Kizek, M., Adam, V., (2015), Quantum dots-fluorescence resonance energy transfer-based nanosensors and their application, *Biosens Bioelectron*, 74, 562-574.
- [53] Breger, J. C., Sapsford, K. E., Ganek, J., Susumu, K., Stewart, M. H., Medintz, I. L., (2014) Detecting Kallikrein Proteolytic Activity with Peptide-Quantum Dot Nanosensors, *Applied Material Interfaces*, 6 11529–11535.
- [54] Muñoz, R., Santos, E. M., Galan-Vidal, C. A., Miranda, J. M., Lopez-Santamarina, A., Rodriguez, J. A. (2021). Ternary quantum dots in chemical analysis. Synthesis and detection mechanisms. *Molecules*, 26(9), 2764.
- [55] Donegan, J., Rakovich, Y. (Eds.). (2013). Cadmium telluride quantum dots: advances and applications.
- [56] Sajwan, R. K., Bagbi, Y., Sharma, P., Solanki, P. R. (2017). L-cysteine and 3-mercaptopropionic acid capped cadmium selenide quantum dots based metal ion probes. *Journal of Luminescence*, 187, 126-132.

- [57] Modlitbová, P., Pořízka, P., Střítežská, S., Zezulka, Š., Kummerová, M., Novotný, K., Kaiser, J. (2020). Detail investigation of toxicity, bioaccumulation, and translocation of Cd-based quantum dots and Cd salt in white mustard. *Chemosphere*, 251, 126174.
- [58] Rivaux, C., Akdas, T., Yadav, R., El-Dahshan, O., Moodelly, D., Ling, W. L., Reiss, P. (2022). Continuous Flow Aqueous Synthesis of Highly Luminescent AgInS₂ and AgInS₂/ZnS Quantum Dots. *The Journal of Physical Chemistry C*, 126(48), 20524-20534.
- [59] Joshi, D. J., Malek, N. I., Kailasa, S. K. (2023). Fluorescence OFF-ON-OFF mechanism for the detection of digoxin, La³⁺, and epinephrine using bovine serum albumin functionalized molybdenum oxide quantum dots. *Materials Today Chemistry*, 27, 101291.
- [60] Chen, J., Sun, N., Chen, H., Zhang, Y., Wang, X., Zhou, N. (2022). A FRET-based detection of N-acetylneuraminic acid using CdSe/ZnS quantum dot and exonuclease III-assisted recycling amplification strategy. *Food Chemistry*, 367, 130754.
- [61] Liu, Z., Liu, L., Sun, M., Su, X. (2015). A novel and convenient near-infrared fluorescence “turn off–on” nanosensor for detection of glucose and fluoride anions. *Biosensors and Bioelectronics*, 65, 145-151.
- [62] Krenkova, J., Dusa, F., Cmelik, R. (2021). Characterization of multi-cationic aminopyrene-based tag for oligosaccharide labeling by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis*, 42(12-13), 1333-1339.
- [63] Bian, Z., Liu, A., Li, Y., Fang, G., Yao, Q., Zhang, G., Wu, Z. (2020). Boronic acid sensors with double recognition sites: a review. *Analyst*, 145(3), 719-744.
- [64] Lu, C., Li, H., Wang, H., Liu, Z. (2013). Probing the interactions between boronic acids and cis-diol-containing biomolecules by affinity capillary electrophoresis. *Analytical chemistry*, 85(4), 2361-2369.
- [65] Valenzuela, S. A., Howard, J. R., Park, H. M., Darbha, S., Anslyn, E. V. (2022). ¹¹B NMR Spectroscopy: Structural Analysis of the Acidity and Reactivity of Phenyl Boronic Acid–Diol Condensations. *The Journal of Organic Chemistry*, 87(22), 15071-15076.
- [66] Martínez-Aguirre, M. A., Flores-Alamo, M., Medrano, F., Yatsimirsky, A. K. (2020). Examination of pinanediol–boronic acid ester formation in aqueous media: Relevance to the relative stability of trigonal and tetrahedral boronate esters. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 18(14), 2716-2726.
- [67] Fossey, J. S., D'Hooge, F., van den Elsen, J. M., Pereira Morais, M. P., Pascu, S. I., Bull, S. D., James, T. D. (2012). The development of boronic acids as sensors and separation tools. *The Chemical Record*, 12(5), 464-478.
- [68] Brooks, W. L., Deng, C. C., Sumerlin, B. S. (2018). Structure–reactivity relationships in boronic acid–diol complexation. *ACS omega*, 3(12), 17863-17870.
- [69] Sarmini, K., Kenndler, E. (1997). Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 792(1-2), 3-11.

- [70] Rizvi, S. A. A., Do, D. P., Saleh, A. M. (2011). Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC). *European Journal of Chemistry*, 2(2), 276-281.
- [71] Zarad, W., Shawky, A., Ali, A., Aboulella, Y., Kamal, M., Masujima, T., El-Gendy, H. (2021). Field amplified sample stacking and in-capillary derivatization for forensic analysis of morphine and morphine-6-glucuronide in human urine by capillary electrophoresis. *Talanta Open*, 3, 100041.
- [72] Michalcová, L., Nevídalová, H., Glatz, Z. (2021). Toward an automated workflow for the study of plasma protein-drug interactions based on capillary electrophoresis-frontal analysis combined with in-capillary mixing of interacting partners. *Journal of Chromatography A*, 1635, 461734.
- [73] Kupke, I. R., Kather, B., Zeugner, S. (1981). On the composition of capillary and venous blood serum. *Clinica Chimica Acta*, 112(2), 177-185.
- [74] Gautam, D., Talwan, M. P. Formulation Aspects and Manufacturing Technology—A Review on Fast Disintegrating Tablets.
- [75] Rodrigues, S. S. M., Ribeiro, D. S., Soares, J. X., Passos, M. L., Saraiva, M. L. M., Santos, J. L. (2017). Application of nanocrystalline CdTe quantum dots in chemical analysis: Implementation of chemosensing schemes based on analyte-triggered photoluminescence modulation. *Coordination Chemistry Reviews*, 330, 127-143.
- [76] Castro, R. C., Lopes, A. F., Soares, J. X., Ribeiro, D. S., Santos, J. L. (2021). Determination of atenolol based on the reversion of the fluorescence resonance energy transfer between AgInS₂ quantum dots and Au nanoparticles. *Analyst*, 146(3), 1004-1015.
- [77] Martínez, E., Rodríguez, J. A., Bautista, M., Rangel-Vargas, E., Santos, E. M. (2018). Use of 2-Naphthalenethiol for derivatization and determination of acrylamide in potato crisps by high-performance liquid chromatographic with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 11, 1636-1644.
- [78] Sandros, M. G., Shete, V., Benson, D. E. (2006). Selective, reversible, reagentless maltose biosensing with core-shell semiconducting nanoparticles. *Analyst*, 131(2), 229-235.
- [79] Mansur, A. A., Mansur, H. S., Tabare, C., Paiva, A., Capanema, N. S. (2019). Eco-friendly AgInS₂/ZnS quantum dot nanohybrids with tunable luminescent properties modulated by pH-sensitive biopolymer for potential solar energy harvesting applications. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 30, 16702-16717.
- [80] Mohan, C. N., Renuga, V. (2019). Exploration of dopant and surface passivation on optical and morphological properties of AgInS₂ nanocrystals. *Journal of Alloys and Compounds*, 787, 972-981.
- [81] Hu, X., Chen, T., Xu, Y., Wang, M., Jiang, W., Jiang, W. (2018). Hydrothermal synthesis of bright and stable AgInS₂ quantum dots with tunable visible emission. *Journal of Luminescence*, 200, 189-195.
- [82] Islas-Rodriguez, N., Muñoz, R., Rodriguez, J. A., Vazquez-Garcia, R. A., Reyes, M. (2023). Integration of ternary I-III-VI quantum dots in light-emitting diodes. *Frontiers in Chemistry*, 11, 1106778.

- [83] May, B. M., Parani, S., Oluwafemi, O. S. (2019). Detection of ascorbic acid using green synthesized AgInS₂ quantum dots. *Materials Letters*, 236, 432-435.
- [84] Zhang, Y., Wang, T. H. (2012). Quantum dot enabled molecular sensing and diagnostics. *Theranostics*, 2(7), 631.
- [85] Mehata, M. S. (2015). Enhancement of charge transfer and quenching of photoluminescence of capped CdS quantum dots. *Scientific Reports*, 5(1), 12056.
- [86] Achadu, O. J., Nyokong, T. (2017). Graphene quantum dots decorated with maleimide and zinc tetramaleimido-phthalocyanine: Application in the design of "OFF-ON" fluorescence sensors for biothiols. *Talanta*, 166, 15-26.
- [87] Liu, S., Shi, F., Chen, L., Su, X. (2013). Tyrosine-functionalized CuInS₂ quantum dots as a fluorescence probe for the determination of biothiols, histidine and threonine. *Analyst*, 138(19), 5819-5825.
- [88] Hu, Q., Xu, X., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., Fu, Y., Li, Y. (2014). Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 54, 64-71.
- [89] Currie, L. A., Svehla, G. Y. U. L. A. (1994). Nomenclature for the presentation of results of chemical analysis (IUPAC Recommendations 1994). *Pure and applied chemistry*, 66(3), 595-608.
- [90] Tayebi, M., Tavakkoli Yaraki, M., Mogharei, A., Ahmadi, M., Tahriri, M., Vashaei, D., Tayebi, L. (2016). Thioglycolic acid-capped CdS quantum dots conjugated to α -amylase as a fluorescence probe for determination of starch at low concentration. *Journal of fluorescence*, 26, 1787-1794.
- [91] Amiri, N. S., Hosseini, M. R. M. (2020). Application of ratiometric fluorescence sensor-based microwave-assisted synthesized CdTe quantum dots and mesoporous structured epitope-imprinted polymers for highly efficient determination of tyrosine phosphopeptide. *Analytical Methods*, 12(1), 63-72.
- [92] Masteri-Farahani, M., Ghorbani, F., Mosleh, N. (2021). Boric acid modified S and N co-doped graphene quantum dots as simple and inexpensive turn-on fluorescent nanosensor for quantification of glucose. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 245, 118892.
- [93] Stubelius, A., Lee, S., Almutairi, A. (2019). The chemistry of boronic acids in nanomaterials for drug delivery. *Accounts of chemical research*, 52(11), 3108-3119.
- [94] Wang, J., Wang, M., Guo, J., Guo, M., Yan, Y. (2021). Preparation of AgInS₂ quantum dots and their application for trypsin detection. *Journal of Materials Science: Materials in Electronics*, 32, 26490-26502.
- [95] Castro, R. C., Páscoa, R. N., Saraiva, M. L. M., Santos, J. L., Ribeiro, D. S. (2021). Chemometric-assisted kinetic determination of oxytetracycline using AgInS₂ quantum dots as PL sensing platforms. *Analytica Chimica Acta*, 1188, 339174.

- [96] Xue, T., Shi, Y., Guo, J., Guo, M., Yan, Y. (2021). Preparation of AgInS₂ quantum dots and their application for Pb²⁺ detection based on fluorescence quenching effect. *Vacuum*, 193, 110514.
- [97] Tajbakhsh, S., Hajiali, F., Maric, M. (2021). Recyclable polymers with boronic ester dynamic bonds prepared by miniemulsion polymerization. *ACS Applied Polymer Materials*, 3(7), 3402-3415.
- [98] Howell, M. T., Kei, P., Anokhin, M. V., Losovyj, Y., Fronczek, F. R., Nesterov, E. E. (2023). Suzuki–Miyaura catalyst-transfer polymerization: new mechanistic insights. *Polymer Chemistry*, 14(37), 4319-4337.
- [99] Huang, L., Ye, Z., Yang, L., Li, J., Qin, H., Peng, X. (2021). Synthesis of colloidal quantum dots with an ultranarrow photoluminescence peak. *Chemistry of Materials*, 33(5), 1799-1810.
- [100] Pal, A., Arshad, F., Sk, M. P. (2020). Emergence of sulfur quantum dots: Unfolding their synthesis, properties, and applications. *Advances in Colloid and Interface Science*, 285, 102274.