



**UNIVERSIDAD DE JAÉN**

---

**FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FÍSICA Y  
ANALÍTICA**

**TESIS DOCTORAL**

**APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS  
OPTOSENSORES EN FLUJO CON  
DETECCIÓN FLUORESCENTE**

**PRESENTADA POR:  
JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES**

**DIRIGIDA POR:  
DR. D. ANTONIO MOLINA DÍAZ  
DRA. DÑA. PILAR ORTEGA BARRALES**

**JAÉN, 3 DE MARZO DE 2006**

**ISBN 84-8439-328-3**

Nombre y apellidos del autor

JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES

Título de la Tesis Doctoral

APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS OPTOSENSORES EN FLUJO CON DETECCIÓN  
FLUORESCENTE

I.S.B.N.

84-8439-328-3

Fecha de Lectura

3 DE MARZO DE 2006

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES  
*Departamento de Química Física y Analítica*

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis

|                           |                                                                                                         |
|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Dirección de la Tesis     | Dr. D. Antonio Molina Díaz<br>Dra. Dña. Pilar Ortega Barrales                                           |
| Presidente/a del Tribunal | Dr. D. Lucas Hernández Hernández                                                                        |
| Vocales                   | Dr. D. Miguel de la Guardia Cirugeda<br>Dr. D. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba<br>Dr. D. Bernhard Lendl |
| Secretario/a              | Dr. D. María José Ayora Cañada                                                                          |

Calificación Obtenida

SOBRESALIENTE CUM LAUDE (DOCTORADO EUROPEO)



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

# Resumen

En esta memoria se presenta el desarrollo de optosensores en flujo (análisis por inyección en flujo (FIA) y multiconmutación) con detección fluorimétrica y se evalúan diversas aplicaciones de los mismos al análisis de compuestos de interés en diferentes campos (medioambiental, farmacéutico, alimentario, etc.).

Se ha abordado el desarrollo de 8 métodos basados en el uso de optosensores en flujo con detección luminiscente que han sido aplicados a la determinación de (a) residuos de pesticidas (benomilo, carbendazima, tiabendazol, orto-fenilfenol, carbarilo, fuberidazol) en aguas superficiales, aguas de consumo y productos fitosanitarios; (b) iones metálicos en aguas de consumo (Aluminio (III) y Cadmio (II)); (c) residuos de productos fitosanitarios post-cosecha (tiabendazol y difenilamina) en frutas (cítricos, manzanas y peras); y (d) principios activos de fármacos (ácido salicílico y naproxeno) en productos farmacéuticos y fluidos biológicos (orina y suero).

Las características más relevantes de estos métodos desarrollados son la rapidez, la sencillez y el bajo coste. Permiten determinar la concentración de uno o varios analitos de forma rápida, selectiva y sensible. Estas características hacen especialmente adecuado su uso en aplicaciones de análisis de rutina y control de calidad, como por ejemplo en los ensayos de contenido de principios activos en productos farmacéuticos.

La implementación de la multiconmutación en el campo de los optosensores proporciona un grado mayor de automatización, aportando a su vez ventajas notorias frente a los sistemas de análisis por inyección en flujo (FIA) convencionales hasta ahora empleados para el desarrollo de optosensores en flujo. El empleo de válvulas solenoide de tres vías proporciona la posibilidad de incrementar el nivel de automatización en varias etapas de estos métodos de análisis tales como la inserción de muestra o la regeneración de la superficie sensora. Además estos sistemas permiten un ahorro en consumos de muestra y reactivos y generan un menor volumen de residuos. Esta estrategia se ha empleado en tres de los métodos propuestos (tiabendazol, difenilamina y la mezcla ácido salicílico y naproxeno).

Atendiendo al número de analitos que permiten analizar, los sensores desarrollados pueden clasificarse en dos grupos: (a) sensores «monoparámetro», que permiten el análisis de un solo analito; y b) sensores «multiparámetro» que permiten el

análisis (en este caso, mediante una sola inserción de muestra) de varios componentes en una muestra. En esta Memoria se han puesto a punto 4 optosensores monoparámetro (Al (III), Cd (II), tiabendazol y difenilamina) y 4 optosensores multiparámetro (3 de ellos biparámetro y 1 triparámetro).

Para llevar a cabo el desarrollo de estos optosensores multiparámetro, se emplearon dos estrategias para permitir la separación de los compuestos estudiados en cada caso. Una de ellas estaba basada en el uso de una «precolumna», empaquetada con el mismo soporte sólido empleado en la zona sensora (célula de flujo), que retiene temporalmente los analitos, permitiendo la discriminación y separación de los mismos, basándose en la diferente interacción de cada analito con el soporte en la precolumna. Esto permite la separación y llegada secuencial de los analitos a la zona de detección. Con este dispositivo se ha desarrollado el sensor triparámetro para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol. Con una sola inserción de muestra, se analizan los tres compuestos, aunque la detección de cada analito esté secuenciada en el tiempo.

La otra estrategia desarrollada en esta memoria es el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido en la cubeta de flujo para realizar la separación de las especies de interés. El fundamento es similar al anterior, ya que básicamente la separación de los analitos se efectúa basándose en las diferencias de comportamiento de éstos (debido a la distinta polaridad) al interaccionar con el soporte sólido empleado ( $C_{18}$  silica gel) pero esta vez la separación ocurre en la misma célula de flujo, justo por encima del área de detección. Para poder efectuar esta separación con una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo es necesario que la diferencia de polaridad entre los analitos a separar sea muy elevada. Mediante el empleo de esta estrategia se han desarrollado tres sensores biparámetro: dos para el análisis de mezclas de pesticidas (benomilo/ carbendazima y tiabendazol/ ortofenilfenol) y uno para el análisis de principios activos en fármacos (naproxeno/ ácido salicílico).

En todos los métodos se ha realizado un amplio estudio de las variables experimentales que hay que considerar en el desarrollo de este tipo de sensores como: características de los espectros y variables instrumentales, variables de la unidad de retención-detección, variables químicas (pH, naturaleza del portador, etc.), separación de los analitos, variables del sistema de flujo continuo, etc., optimizándose los respectivos valores en cada método desarrollado. A continuación se procedió a la calibración de los sensores para cada analito y obtención de los parámetros analíticos, evaluación de la selectividad mediante el estudio de interferencias y finalmente se procedió a la aplicación analítica de los sensores desarrollados al análisis de muestras reales o fortificadas.

De los resultados obtenidos se puede concluir que los optosensores en flujo con detección fluorescente son herramientas útiles, sencillas y económicas que pueden ser empleadas en la resolución de un gran número de problemas analíticos en campos muy diversos como son los que se han abordado en la presente memoria:

- Control Ambiental (análisis de pesticidas en aguas superficiales)

- Calidad de agua de consumo humano (Cd (II) y Al(III))
- Control industrial (ensayo de contenido de principios activos en preparados farmacéuticos y pesticidas en productos fitosanitarios)
- Control alimentario (análisis de residuos de fungicidas post-cosecha en frutas)
- Química Analítica Clínica (análisis de principios activos en fluidos biológicos)

El empleo de este tipo de métodos analíticos es especialmente recomendable y ventajoso en el caso de muestras sencillas y análisis de rutina, como por ejemplo el ensayo de contenido de principios activos en productos farmacéuticos o análisis de agua de consumo humano, aunque como se ha corroborado en esta memoria también sirven para abordar problemas analíticos más complejos, como puede ser el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos. Se han desarrollado dos métodos para este problema analítico con resultado plenamente satisfactorio. Estos métodos cumplen la normativa europea en cuanto a límite máximo de residuos (LMRs) ya que permiten detectar niveles de concentración más bajos que los establecidos como máximos en estas normativas. Por otra parte, también hay que subrayar que el empleo de sistemas de flujo con multiconmutación proporciona ventajas evidentes con respecto a sistemas FIA convencionales, lo que, contribuye a aumentar el potencial de los optosensores en flujo.

## Abstract

In this work, we have described the development of novel fluorescence-based flow-through optosensors and their application to solve very different and demanding analytical problems. The proposed optosensors are based on the combination of solid phase spectroscopy and continuous-flow systems. We have used conventional flow injection systems based on six-port rotary valves but also we have designed muticommutated assemblies employing solenoid valves. As a detection technique, we used fluorescence spectroscopy in all cases. Here we report the application of flow-through optosensors in different fields: environmental, food and pharmaceutical analysis.

The work presented here consists of eight fluorescence-based optosensors, which have been applied to the determination of: (a) pesticide residues in surface waters and commercial products (benomyl, carbendazim, thiabendazole, o-phenylphenol, carbaryl and fuberidazole); (b) metal ions in drinking waters (Al (III) and Cd (II)); (c) post-harvest fungicide residues (thiabendazole and diphenylamine) in fruits (citrus, apples and pears); and (d) pharmaceuticals (salicylic acid and naproxen) in commercial pharmaceutical products and biological fluids (serum and urine).

The main advantaging features of these methods are: high sampling throughput, cost-effectiveness and simplicity together with a remarkably high sensitivity and selectivity. On the other hand, the improvement of the analytical features in terms of reliability, precision, sample handling as well as reagent consumption and minor waste generation in relation to conventional methods based on classical FIA configurations is also remarkable. These advantages are fully complementary with the fields of routine applications and quality control requirements, such as the pharmaceutical analyses to assay the content of the drug in commercial products for routine quality control purposes.

The implementation of muticommutation with optosensor involves a higher degree of automation, providing also remarkable advantages with regards to conventional flow systems (FIA) which were the systems previously used for the development of optosensors. Multicommutation enables increased repeatability, easier sample handling, reduced reagent consumption, providing an invaluable tool to develop environmentally friendly methods, which provide benefits in terms of reagent waste

generation or sample/reagent consumption. Three out of the eight methods proposed in this work are based on multicommutated systems (thiabendazole, diphenylamine and the mixture of salicylic acid and naproxen).

On the other hand, the sensors described in this memory can be classified according to the number of parameter/analytes which can be analysed. We can divide the methods in: (a) monoparameter sensors (response to a unique analyte) or (b) multiparameter sensors (or «multisensor») which response to, at least, two different species within a unique injection. In this memory, 4 out of the 8 methods are monoparameter sensors (Al (III), Cd(II), thiabendazole and diphenylamine) and the rest are multisensors (1 triparameter and 3 biparameter).

To design and develop these «multisensors» and allow the separation of the different species we employed two different strategies:

- (a) The implementation of a separation unit (an on-line «precolum») just prior to detection for the development of multi-analyte flow-through optosensors. Just with the use on-line of a minicolumn filled with the appropriate active solid support, a single and complete separation of the analytes can be achieved based on the difference in the retention/interaction of each individual analyte with the material placed in the «precolum». With this strategy, a method for the determination of a ternary pesticide mixture (benomyl, carbaryl and fuberidazole) has been developed.
- (b) the use of an additional amount of solid support in the flow cell (in relation to conventional flow-through optosensors) can be used to undertake the separation of two species with different properties regarding the interaction with a solid support (ca. a large difference on polarity). This extra amount of solid support is located in the flow-cell, just above the irradiated area. The separation is performed when the sample plug containing the mixture impinges the top part of the flow-cell, which is filled with an appropriate material (a non-polar sorbent) in order to obtain substantial differences in the retention/desorption kinetics of the species of interest. For this purpose, a remarkable difference in polarity between the target compounds to discriminate is mandatory. The difference in polarity should be high enough to allow a complete separation within the use of a small amount of extra solid support. The analytical potential of this approach has been fully proved by means of its application in three different methods for the analysis of pesticides in water and commercial products and the analysis of analgesics in pharmaceutical products and biological fluids.

In all the developed methods, we have undertaken a comprehensive study of each individual variable which can affect the performance of this kind of sensors (viz. spectral features, instrumental variables, retention-detection unit, chemical variables (pH, carrier, etc), separation of the species, flow injection variables, etc). The different values of these variables were carefully optimised for each sensor. Subsequently, the analytical figures of merit were obtained for each developed sensor. After that, the selectivity of each method to potential interfering species was tested. Finally,

the usefulness of all of the optosensors was evaluated by applying them to different real or fortified samples.

From the results obtained, it can be concluded that the fluorescence-based flow-through optosensors are single, useful and cost-effective analytical tools which could be applied for the resolution of a wide variety of analytical problems such as:

- Analysis of pesticide residues in surface waters
- Analysis of trace metal ions in drinking waters
- Quality control (assay of content of drug in pharmaceutical products and pesticide content in agrochemical products)
- Food Analysis (Pesticide residue analysis in food samples).
- Clinical Chemistry (analysis of pharmaceuticals in biological fluids)

The use of these analytical tools is especially advantageous in single matrices and routine purposes such as the content assay of pharmaceutical products. However, more demanding analytical problems involving complex samples such as food can also be covered by flow-through optosensors. These methods proposed for the determination of pesticides in fruits meet the European Regulations concerning the maximum residue limits of the studied pesticides in these commodities. Finally it should also be envisaged the potential of multicomutation assemblies to develop flow-through optosensors. The evident advantages offered by these systems will surely replace the conventional FIA approaches used up to date for developing optosensors.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

# APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS OPTOSENSORES EN FLUJO CON DETECCIÓN FLUORESCENTE

**JUAN FRANCISCO GARCÍA REYES**

tesis doctoral

*Quiero expresar mi más profunda admiración y gratitud a mis mentores, los Dres. Antonio Molina Díaz y Pilar Ortega Barrales por su apoyo, amistad y dedicación durante estos años, haciendo que la nave llegue a buen puerto.*

*También quiero expresar mi agradecimiento a todos los miembros del Departamento de Química Física y Analítica que han contribuido a la realización de este trabajo, ya sea en el laboratorio o fuera del mismo. En particular, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a Paco Partal y Manuel Montejo, sin su apoyo y amistad, hubiese sido mucho más difícil para mí llegar a escribir estas líneas.*

*También quiero agradecer la hospitalidad y dedicación del profesor D. Amadeo Rodríguez Fernández-Alba, que hizo posible mi estancia en Almería, y también a la gente que allí encontré (Carmen, M<sup>a</sup> José, Paula, Octavio, ...).*

*Del mismo modo, también me gustaría expresar mi agradecimiento al Dr. Ryszard Lobinski, por hacer posible la estancia en Pau, y también a toda la gente que conocí allí (Pablo, María, Esther, Mihaly, ...) mientras escribía esta Memoria.*

*Para concluir, quiero agradecer a mis padres y a mis hermanos el apoyo que me han brindado durante estos años. A ellos va dedicado este trabajo.*

*Este trabajo ha sido posible gracias al Ministerio de Educación y Ciencia, a través de una beca predoctoral del Programa Nacional de Formación de Profesorado Universitario (FPU, Ref. AP2002-0894) y del proyecto de investigación «Aplicación de nuevas estrategias en el desarrollo de sensores espectroscópicos multiparámetro de flujo continuo» (BQU-2002-02872). También se ha llevado a cabo gracias al uso de instrumentación proporcionada por los Servicios Técnicos de Investigación de la Universidad de Jaén.*

*Quiero expresar mi agradecimiento a Eulogio Llorent, Ana Domínguez y Antonio Molina, por los estudios previos en el desarrollo de optosensores empleando multiconmutación, llevados a cabo con la colaboración del profesor Miguel De la Guardia, y que han sido la base sobre la que se han desarrollado los trabajos de multiconmutación descritos en esta Memoria. También, agradezco a Javier Molina Magaña el desarrollo del software empleado para controlar los sistemas de flujo empleando multiconmutación.*

*Por último, quisiera expresar mi gratitud al Grupo de Residuos de Plaguicidas de la Universidad de Almería, por el tiempo que dedicaron durante mi estancia en Almería a instruirme en el tratamiento de muestras y análisis de residuos de plaguicidas mediante cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.*

*A mis padres*

*A mis hermanos*

*A mi sobrino Alonso*

# Índice

|                                                                      |     |
|----------------------------------------------------------------------|-----|
| I. Justificación e Introducción .....                                | 7   |
| I.1. Sistemas automáticos de análisis en flujo .....                 | 9   |
| I.2. Análisis por inyección en flujo (FIA) .....                     | 11  |
| I.3. Otras metodologías de análisis por inyección en flujo .....     | 21  |
| I.4. Optosensores en flujo continuo .....                            | 28  |
| I.5. Los Analitos y su determinación .....                           | 46  |
| II. Objetivos .....                                                  | 62  |
| III. Antecedentes .....                                              | 65  |
| IV. Discusión conjunta de resultados .....                           | 74  |
| IV.1. Reactivos e instrumentación .....                              | 75  |
| IV.2. Estudios preliminares .....                                    | 82  |
| IV.3. Configuración del sistema .....                                | 99  |
| IV.4. Variables de la unidad de retención/separación/detección ..... | 110 |
| IV.5. Variables Químicas .....                                       | 115 |
| IV.6. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo .....            | 129 |
| IV.7. Calibración de los optosensores: parámetros analíticos .....   | 137 |
| IV.8. Estudio del efecto de posibles especies interferentes .....    | 147 |
| IV.9. Aplicaciones Analíticas .....                                  | 156 |
| V. Conclusiones .....                                                | 177 |

|                        |     |
|------------------------|-----|
| VI. Bibliografía ..... | 180 |
|------------------------|-----|

|                  |     |
|------------------|-----|
| VII. Anexo ..... | 210 |
|------------------|-----|

# I. Justificación e introducción

## JUSTIFICACIÓN

La memoria de investigación presentada se titula «APLICACIONES ANALÍTICAS DE LOS OPTOSENSORES EN FLUJO CON DETECCIÓN FLUORESCENTE».

Esta Memoria se enmarca dentro de una de las líneas de investigación desarrolladas por el Grupo de Investigación «Química Analítica de la Universidad de Jaén» (Grupo FQM 323 del Plan Andaluz de Investigación (PAI)) que está centrada en el desarrollo de nuevas metodologías de análisis por inyección en flujo continuo con detección espectroscópica en fase sólida.

Las investigaciones en esta línea van dirigidas a profundizar y desarrollar la espectroscopia en fase sólida (SPS) en modo automático, incluyendo el diseño de nuevas estrategias que permitan extender estos sistemas al análisis de varios componentes y a la resolución de problemas analíticos reales. Por ello, se aborda el desarrollo de optosensores mono-, bi- y multiparámetro.

Los optosensores espectroscópicos en flujo continuo surgen de la automatización de la espectrometría en fase sólida (practicada originariamente en modo discontinuo) cuando ésta se integra con los sistemas de análisis en flujo continuo (FIA).

En 1976, Yoshimura propuso combinar el uso de un soporte sólido para preconcentrar la especie de interés con la medida directa de la absorción de luz de dicha especie retenida sobre la fase sólida, surgiendo así la espectrometría en fase sólida («Solid-Phase Spectroscopy» (SPS)) [1]. Los primeros trabajos se dedicaron al análisis de traza metálicas y después se extendieron al de compuesto orgánicos [3,4].

Posteriormente la SPS se automatizó integrándose con el FIA, incorporando el sólido activo a una célula de flujo. Se tiene así una superficie sólida activa rodeada por una corriente que fluye a su través, combinada con la monitorización de la interacción entre dicho flujo y la superficie. Este dispositivo fue llamado por primera vez sensor óptico en flujo (flow-through optosensor) por Ruzicka y Hansen [5].

De forma general, un sensor químico o bioquímico es un dispositivo sencillo capaz de detectar y / o cuantificar en tiempo real una especie química concreta (analito)

en un medio complejo concreto (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva (idealmente específica). Un sensor químico ideal debería satisfacer una serie de especificaciones como son: elevada selectividad hacia la especie de interés, sensibilidad, portabilidad, bajo coste, mínimo mantenimiento, suministrar información espacial y temporal del analito en tiempo real o casi real. Sin embargo, muy pocos sensores cumplen estas especificaciones.

Básicamente, un sensor consta de:

- a) Una zona química o elemento de reconocimiento que interacciona selectivamente con el componente de interés
- b) Un elemento de transducción estrechamente asociado a la zona sensora
- c) Una unidad electrónica de procesamiento y medida de las señales

La presencia del soporte sensor en la célula de flujo introduce dos importantes mejoras:

- 1) Un notable incremento en la sensibilidad (y un descenso en los límites de detección)
- 2) Exalta muy significativamente la selectividad (al producir la separación), pues las especies no retenidas en el soporte no pueden desarrollar señal al verse forzadas a pasar a través de los intersticios que dejan las partículas del sólido, lo que ofrece un paso óptico efectivo muy bajo, con incremento notable de los límites de detección comparados con la respectiva metodología (FIA) en ausencia de soporte sólido. Por consiguiente, los procesos de separación/retención, concentración, reacción (cuando es necesaria) y detección ocurren en estos sistemas simultáneamente en el tiempo y en el espacio, es decir, de una manera integrada.

En los siguientes apartados, se describirán los fundamentos y el origen de los optosensores en flujo continuo. Además, se detallarán las claves de su funcionamiento así como las aplicaciones más reseñables que se han descrito en la literatura.

### **I.1. SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE ANÁLISIS EN FLUJO**

El creciente número de controles analíticos requeridos en áreas como la salud, medio ambiente o la alimentación hace surgir la necesidad de automatización de los procesos analíticos. La automatización permite reemplazar la actividad humana

en tareas laboriosas e incluso peligrosas para el operador, proporcionando una mayor reproducibilidad al minimizar la influencia del factor humano, además de incrementar la velocidad de análisis, ya que hace posible la realización de un mayor número de análisis en un menor tiempo. Todo ello, junto con la disponibilidad comercial de gran diversidad de instrumental y las ventajas económicas que reporta a medio y largo plazo su incorporación a la industria, son razones a las que atribuir el despegue de las técnicas automatizadas de análisis, que en las últimas décadas han cobrado un inusitado interés en una gran diversidad de campos (análisis clínico, medioambiental, control de calidad, etc.)

Por lo tanto, el desarrollo de la automatización ha sido y continúa siendo una tarea muy importante en Química Analítica. El desarrollo de estos métodos surgió de la necesidad de llevar a cabo ensayos analíticos con un menor coste de material y tiempo, a la vez que disminuye la participación humana, con la ventaja que ello implica de mayor comodidad, mejora en la productividad, así como disminución de errores, riesgos para empleados y medio ambiente. Básicamente, se considera que el uso de los Métodos Automáticos de Análisis va ligado al concepto de la sustitución de una operación o medida estática realizada manualmente, por una operación o medida continua o secuencial. Esta concepción fue introducida por Skeegs en 1957 al describir el primer sistema de análisis segmentado en flujo continuo, y que constituye el primer paso en el desarrollo de los métodos automáticos. En general en este tipo de sistemas de flujo se puede realizar una clasificación atendiendo a la forma de introducción de la muestra y a la introducción de burbujas (*flujo segmentado* o *no segmentado*).

Los sistemas de *flujo segmentado* se caracterizan porque se introducen las muestras de forma secuencial. Son aspiradas y espaciadas entre sí por medio de burbujas de aire, procurando en todo momento evitar el efecto de transporte, promoviendo la mezcla de muestras y reactivos, y limpiando las paredes del tubo.

Los sistemas de *flujo no segmentado* se caracterizan por la ausencia de burbujas de aire en el sistema. Las muestras se introducen de forma secuencial en el analizador, mediante inyección o inserción en una corriente de portador. Una diferencia muy importante de estos sistemas con los de flujo segmentado es que en el momento de llevar a cabo la detección, no se ha alcanzado ni el equilibrio físico (homogeneización del flujo) ni químico (desarrollo completo de la reacción analítica). De todos estos sistemas de flujo no segmentado, el más empleado hoy día es el Análisis por Inyección en Flujo (FIA).

## **I.2. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)**

De entre todas las metodologías analíticas existentes para la automatización, el análisis por Inyección en Flujo (Flow Injection Analysis (FIA)), ha experimentado un rápido desarrollo desde la introducción del concepto original por Ruzicka y Hansen [6] (Dinamarca) y Stewart [7] (E.E.U.U.) en la década de los setenta, abarcando en la actualidad casi todos los campos analíticos. Aunque resulta difícil formular una definición del FIA que englobe a las diversas modalidades que del mismo han ido surgiendo desde sus comienzos, se podría decir que se trata de un tipo de análisis automático en flujo continuo, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de disolución en una corriente continua de un portador, que lo transporta hasta el detector, donde se genera una señal transitoria en forma de pico, denominado diagrama. Presenta gran versatilidad, ya que las posibilidades y aplicaciones analíticas son muy numerosas, con un presupuesto reducido y gran sencillez en el manejo, proporcionando resultados de gran rapidez, exactitud y precisión [8]. El término *Flow Injection Analysis (FIA)* se mantiene por razones históricas, debido a que Ruzicka y Hansen [9] empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo, aunque, actualmente se realiza por inserción con válvulas rotatorias.

El FIA en su utilización más frecuente, pertenece a los métodos cinéticos de análisis de medida a tiempo fijo, ya que normalmente no espera que la muestra insertada alcance el equilibrio físico ni químico antes de ser detectada. Esto facilita la medida de intermedios de reacción de vida corta tales como radicales, frente a técnicas convencionales en estático, mostrándose muy eficaz también para automatizar métodos catalíticos al conseguir una gran repetitividad en la medida a un tiempo determinado.

Además de gozar de la versatilidad de los métodos en flujo continuo, esta metodología presenta dos ventajas que la hacen destacar sobre otros métodos: un diseño simple y económico, y suficiente robustez para soportar el tratamiento habitual en un laboratorio analítico de control.

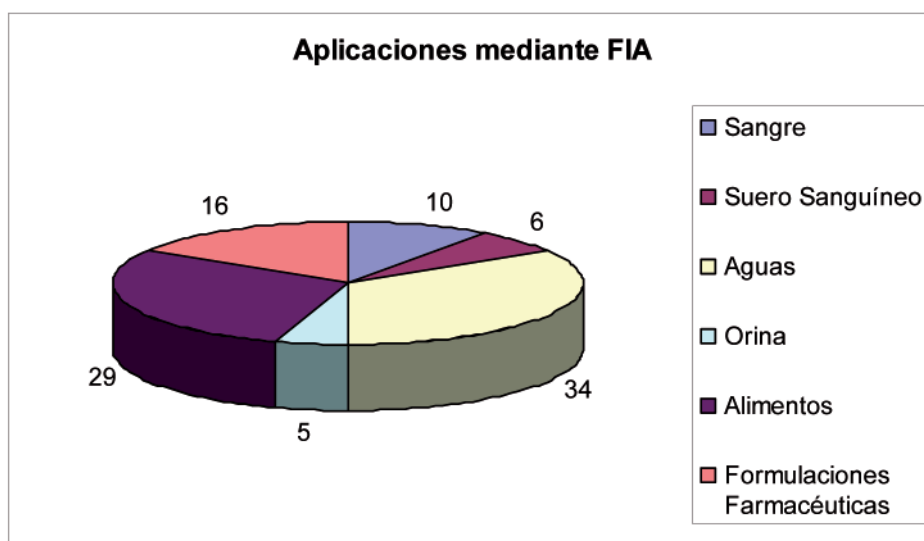
Existen numerosas publicaciones dedicadas a aspectos generales del análisis por inyección en flujo [10-12], o a parcelas concretas del análisis químico, como en el área farmacéutica [13], dado el gran número de aplicaciones que ha encontrado el FIA en este campo.

Para dar una visión global de las múltiples posibilidades de esta metodología, bastaría decir que todas las operaciones necesarias efectuadas en cualquier modalidad de análisis convencional: filtración y redisolución, extracciones líquido-líquido, reacciones

de formación y recogida de gases, utilización de reactivos sólidos o inmovilizados, se pueden realizar con facilidad en la modalidad FIA, mejorando de esta forma su reproducibilidad, tiempo de análisis y permitiendo el ahorro de reactivos.

Del mismo modo, esta metodología permite un amplio espectro de opciones analíticas, desde valoraciones a métodos en flujo detenido, así como el empleo de cualquier detector usual y conocido, con el único requisito que se pueda introducir la muestra en flujo.

En la Figura I.1, se comparan las proporciones de las distintas aplicaciones y muestras que se han descrito con la metodología FIA en los campos farmacéutico, biomédico, alimentario y medioambiental. El periodo en el que se ha realizado la búsqueda comprende desde el año 1980 hasta 2003. Ésta se ha llevado a cabo sobre el *Analytical Abstracts* efectuando rastreos a partir de las entradas «Flow injection» o «FIA» y las distintas aplicaciones que se muestran en dicha figura.



**Figura I.1.** Proporción en porcentaje (%) entre las muestras analizadas por inyección en flujo en las áreas farmacéutica, alimentaria, biomédica y medioambiental

### Características esenciales de la metodología FIA

Las características esenciales de la metodología FIA son [14]:

- Flujo no segmentado por burbujas de aire, diferenciándose en ello de los métodos de análisis en flujo segmentado.

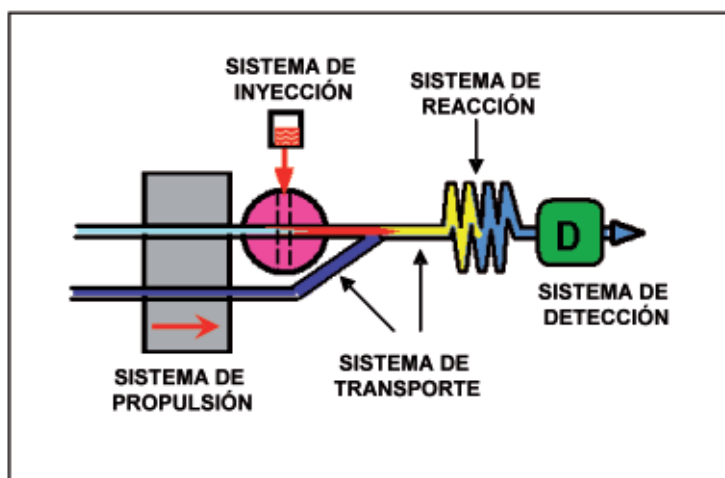
- Inserción o inyección directa de un volumen bien definido de muestra en el flujo, en lugar de aspiración.
- Se realiza un transporte del bolo de muestra inyectado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso químico y/o físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dispersión o dilución parcial del analito en ese transporte puede ser perfectamente controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada (fiagrama).
- En el momento de la detección de la señal, no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogenización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello la metodología FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- El tiempo de operación debe ser muy reproducible, pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad, y por tanto, pequeñas variaciones del mismo pueden producir grandes alteraciones de los resultados.

De entre todas las características, cabe destacar cuatro aspectos clave de la metodología FIA:

- Flujo no segmentado
- Inyección directa
- Dispersión parcial controlada
- Tiempo de operación reproducible

### **Componentes básicos de un sistema FIA**

Un sistema FIA elemental debe estar integrado por una serie de componentes básicos que proporcionen las condiciones ideales. A continuación se muestra un esquema de estos componentes y las características principales de cada uno.



**Figura I.2.** Elementos básicos de un sistema FIA

### Sistema de propulsión

Establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Debe suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de pulsos y perfectamente reproducible.

Pueden usarse como sistema de propulsión bombas, sistemas de presión o sistemas de gravedad. El más utilizado es la bomba peristáltica, basada en la presión ejercida por una serie de cilindros rotatorios sobre tubos de plástico flexible. El caudal suministrado por la bomba peristáltica vendrá determinado, entre otros factores, por el diámetro interno de los tubos. Una característica de la técnica FIA es la baja presión de trabajo necesaria para obtener caudales adecuados, que generalmente oscilan entre 0.5 y 4 ml/min. La situación del sistema de propulsión en un montaje FIA no es única. Si bien es normal encontrarla antes del sistema de inyección, existen autores que prefieren colocar este componente tras el sistema de detección, para minimizar el posible efecto de los pulsos.

### Sistema de inyección

Debe permitir la introducción o inserción de un volumen de muestra exactamente medido en la corriente portadora de forma completamente reproducible, sin crear perturbaciones en el flujo del portador. Estos dispositivos pueden controlarse mediante un motor eléctrico, y en cualquier caso, su utilización debe ser fácil,

cómoda y rápida. Los dispositivos más usados son las válvulas rotatorias (generalmente de 6 vías).

### **Sistema de transporte/reacción**

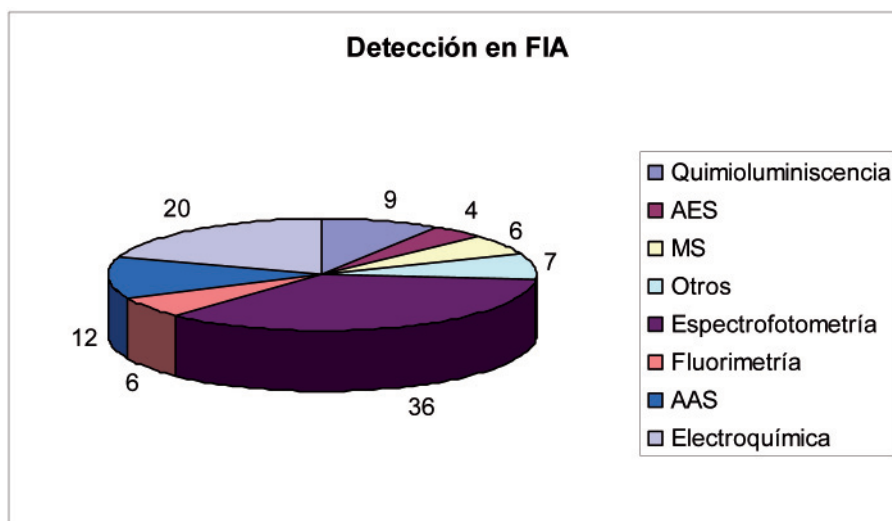
Tiene como misión fundamental conectar entre sí los diferentes elementos y conseguir en el transporte de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión de la muestra con la corriente portadora. Se utilizan tubos de pequeño diámetro (0.1-2 mm) de un material químicamente inerte y termoestable, los más usados son el teflón, polietileno y propileno. Dentro de este sistema, se suelen incorporar los reactores, que permiten que se den procesos adicionales (reacciones) simultáneamente con el transporte. Se suelen emplear tubos con forma de serpentín, relleno o no de bolitas inertes, o bien tener confluencias, cámaras de mezcla o reactores en «fase sólida» (un tubo relleno de un soporte sólido activo químicamente (redox, cambio iónico, enzimas inmovilizadas, etc.)).

### **Sistema de detección**

Debe permitir la medida continua de una propiedad de la muestra o de un producto de reacción de ésta, proporcionando información cuantitativa y cualitativa. Para que un detector sea adecuado como sistema de medida en la técnica de inyección en flujo, éste debe poseer algunos atributos claramente definidos, tales como: pequeño volumen, bajo ruido, respuesta rápida y lineal en un amplio rango de concentraciones y alta sensibilidad.

Los sistemas de detección FIA pueden clasificarse en dos tipos según que éstos midan directamente una propiedad de la especie disuelta en la muestra inyectada, o bien necesiten una reacción adicional que origina un producto de reacción detectable. De esta manera el FIA puede aplicarse a especies activas o inactivas según su comportamiento en relación con el sistema de detección.

Los sistemas de detección más usados en FIA abarcan los más variados tipos existentes dentro de los métodos analíticos, ópticos. En la Figura I.3 se muestran los resultados de una revisión efectuada para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores aplicados a sistemas FIA. El periodo en el que se ha realizado la búsqueda comprende desde el año 1980 hasta 2003. Ésta se ha llevado a cabo sobre el *Analytical Abstracts* efectuando rastreos a partir de las entradas «Flow injection» o «FIA» y los distintos detectores que se muestran en dicha figura.



**Figura I.3.** Proporción en porcentaje (%) entre los distintos tipos de detectores acoplados a los sistemas de análisis por inyección en flujo. AAS: espectrometría de absorción atómica (atomic absorption spectrometry); AES: espectrometría de emisión atómica (atomic emission spectrometry); MS: espectrometría de masas (mass spectrometry).

## Detectores ópticos

Son los sistemas de detección más usados en FIA, debido al gran número de especies que pueden determinarse por este tipo de técnicas, bien por sus propiedades intrínsecas o por las de un producto de reacción con un reactivo determinado. Los más usados son los detectores de absorción molecular, seguidos por los de fluorescencia molecular, siendo éstos últimos los que se han empleado en el desarrollo de esta Memoria.

Estos detectores ópticos se pueden clasificar en:

### (a) Espectrofotometría de absorción molecular UV-visible

Como ya se ha indicado anteriormente en la Figura I.3, la espectrofotometría de absorción molecular es el sistema de detección más empleado en FIA, debido a la existencia de un gran número de métodos basados en reacciones selectivas coloreadas [15-17] utilizables para todo tipo de compuestos y elementos, y a la gran cantidad de compuestos que presentan bandas representativas en la zona UV del espectro [18].

Para llevar a cabo este tipo de detección en un sistema de flujo continuo se requiere el empleo de una célula de flujo, que es el lugar donde se lleva a cabo la detección y medida de la señal analítica. En espectrofotometría, las células de flujo más empleadas suelen estar fabricadas de cuarzo o vidrio óptico especial, dependiendo de la zona del espectro donde se realice la medida (UV y visible respectivamente).

#### (b) Luminiscencia molecular

Como se puede apreciar en la Figura I.3, una de las técnicas más empleadas para el desarrollo de métodos FIA es la técnica espectroscópica de luminiscencia molecular. El fenómeno de la luminiscencia se basa en la emisión de energía en forma de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) por parte de moléculas, átomos o iones, como resultado de la transición desde un estado electrónicamente excitado a un estado de menor energía, normalmente el estado fundamental [19].

Las dos manifestaciones más conocidas de la luminiscencia producida por especies moleculares de utilidad analítica son la fluorescencia y la fosforescencia [20,21]. Otra manifestación que está adquiriendo cada vez una mayor importancia en analítica es la quimioluminiscencia, que en términos sencillos se puede definir como la producción química de radiación: el estado excitado se produce a expensas de la energía resultante de una reacción química. Cuando en este tipo de reacciones intervienen los seres vivos o sistemas biológicos, el fenómeno recibe el nombre de bioluminiscencia.

*(b.1). Espectrofluorimetría o fluorescencia molecular.* La espectrofluorimetría o fluorescencia molecular es la fotoluminiscencia de tiempo de vida corto procedente de un singlete excitado. La detección fluorescente presenta muchas ventajas, como alta selectividad, bajo límite de detección, capacidad para la miniaturización y bajo coste, por lo que ha sido ampliamente utilizada. Uno de los inconvenientes es el pequeño número de especies que manifiesta efecto fluorescente [22,23] aunque puede ampliarse el campo de aplicación mediante el uso de reacciones químicas sencillas [24] o de la fluorescencia fotoinducida [25].

Las células fluorimétricas de flujo, al igual que las fotométricas, existen en el mercado con un diseño común, apto para su uso en FIA y responden a las características y materiales adecuadas a la técnica. La diferencia fundamental con aquellas se desprende de las características intrínsecas de la técnica: presentan tres ventanas en tres caras de la célula, mientras que la cuarta es opaca.

(b.2.) *Fosforescencia*. La fosforescencia es otra técnica espectroscópica de emisión molecular, que ha sido estudiada como detección en sistemas FIA [21]. Se caracteriza por ser una fotoluminiscencia de tiempo de vida largo procedente de un triplete excitado, formado por la absorción de radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana. Aunque se ha aplicado a sistemas FIA, su empleo no está tan generalizado como la fluorescencia o la quimioluminiscencia, ya que se requieren algunas características determinadas para que se registre una señal fosforescente razonable (soportes sólidos, medios organizados, entornos de metales pesados, lantánidos, etc.)

(b.3.) *Quimioluminiscencia*. La quimioluminiscencia se define como la producción de radiación electromagnética como resultado de una reacción química, de forma que alguno de los productos de reacción se obtiene en el estado excitado y emite luz al volver a su estado fundamental. El que se produzca este fenómeno no suele ser muy común, ya que si la energía liberada en la reacción química no es lo suficientemente elevada para provocar la excitación, se disipa en forma de calor u ocurre la combinación de ambos. El proceso por el que se produce la quimioluminiscencia es el mismo que para la fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) excepto que no se necesita ninguna fuente de excitación luminosa. Las aplicaciones de la quimioluminiscencia como detección en sistemas de flujo continuo (principalmente FIA) son muy numerosas [26-29]. Existe un gran número de aplicaciones y de revisiones de aplicaciones de quimioluminiscencia en clínica, medioambiente, productos farmacéuticos, etc.

### (c) Técnicas espectroscópicas atómicas

En las técnicas atómicas generalmente se utiliza un volumen de muestra de 0.5 a 2 ml, pero para el análisis de muestras de menor volumen se puede conjugar con el FIA para resolver este problema. Una característica fundamental del uso en FIA de un instrumento de absorción atómica (cualquiera de sus modalidades) [30,31], fotómetro de llama [32], ICP [33,34] o fluorescencia atómica [35], es el hecho de no precisar célula de flujo. En estos sistemas, el portador, continuamente bombeado, se aspira hasta el nebulizador, y la inserción de la muestra en el mismo da lugar a su aparición en el nebulizador, atomización o ionización sin ser necesaria la célula de flujo. Otra característica es la baja dispersión, factor adicional para una mayor sensibilidad. Actualmente la utilización del ICP (ICP-MS y ICP-AES («óptico»)) como sistema de detección ha alcanzado un notable desarrollo, habida cuenta de la gran sensibilidad, frecuencia de muestreo y versatilidad que proporciona esta unidad de emisión.

#### (d) Espectrometría de masas

Con la aparición del Electrospray (fuentes de ionización API (ESI y APCI)), se ha avanzado mucho en la ionización y detección de compuestos orgánicos en caudales de líquido de alrededor de entre 0.1 y 1 ml/min. La aparición de ésta técnica de ionización de disoluciones líquidas (acuosas) no solo ha promovido el desarrollo de las técnicas acopladas (principalmente HPLC-MS), sino que ha permitido el desarrollo de aplicaciones «FIA-ESI-MS». Estas técnicas permiten unos niveles de selectividad y sensibilidad muy altos, con un grado de confirmación muy elevado [36,37].

#### (e) Detectores Electroquímicos

Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos debido a su selectividad, sensibilidad y linealidad de respuesta en un amplio rango de concentración. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en el seno de la disolución, los hace muy atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. Las propiedades de detección sobre superficies de la mayoría de los métodos electroquímicos, requieren que se desarrollen células de detección especiales en función del tipo de detección que se emplee. Se debe procurar que haya un transporte de masa a través de la superficie del electrodo que sea eficiente y reproducible, de forma que los volúmenes muertos en la célula de detección sean lo más bajos posibles. Hay un gran número de diseños diferentes de células de flujo en función de las necesidades requeridas de la técnica electroquímica empleada [38,39].

### **Características analíticas de los métodos FIA**

Los métodos FIA muestran una serie de características analíticas destacables:

#### ***Sensibilidad***

En general los métodos FIA son algo menos sensibles que las técnicas manuales por dos razones: cuando se hacen reacciones derivatizadoras, al ser el tiempo de reacción corto, se consiguen rendimientos parciales de reacción; y la segunda razón radica en el hecho de que al existir una dispersión física o dilución de la muestra en el portador, no se alcanza la máxima señal posible (bolo sin diluir). Son muchas las modificaciones que pueden hacerse en los montajes FIA para paliar esta característica nada ventajosa:

- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración del analito a partir del bolo de muestra.
- El empleo de sistemas continuos de separación incorporados al FIA puede mejorar indirectamente la sensibilidad de la determinación.
- La interrupción del flujo cuando el bolo (donde se lleva a cabo la reacción) se encuentra en el reactor, permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.
- Para conseguir una mezcla más eficiente entre el bolo de muestra y el reactivo, se utiliza un punto de confluencia entre un canal de disolvente puro, que recibe al bolo de muestra, y el canal de reactivo.

### **Selectividad**

La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera automática por FIA conlleva, en general, una reducción más o menos notable tanto del número de especies interferentes, como del nivel de perturbación. Este hecho se ha constatado en numerosas determinaciones FIA al establecer la comparación con el respectivo método manual.

El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida (tiempo de residencia en FIA).

### **Precisión**

A pesar de que en la metodología FIA concurren aspectos cinéticos, físicos y químicos, que a priori pueden hacer suponer que los resultados no han de caracterizarse por su buena precisión, de hecho se alcanzan niveles de reproducibilidad notables y perfectamente comparables con los conseguidos con las metodologías manuales. A pesar de que son varias las causas que pueden ocasionar fluctuaciones en la señal FIA (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, etc.), es sin duda la constancia en el caudal el factor más crítico. Es importante elegir un tipo de bomba que origine caudales constantes.

### **Rapidez**

La rapidez de la metodología FIA tiene su mayor incidencia en la frecuencia o velocidad de muestreo, siendo superior respecto a las técnicas manuales. Esta mayor velocidad de muestreo en FIA puede atribuirse a las existencias de fuerzas de difusión radiales, de gran significación con relación a las de difusión axial y de

convección, que ejercen un efecto de lavado evitando la contaminación mutua entre las muestras al limitar el ancho de banda.

Es indudable que factores como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo. Deben elegirse en cada caso las condiciones adecuadas a las necesidades.

### ***Sencillez***

La técnica FIA se caracteriza por su gran simplicidad debido a:

- Montajes no sofisticados compuestos por tubos de teflón, conexiones, bifurcaciones, etc., de fácil ensamblaje, en contraste con las nuevas metodologías analíticas surgidas en los últimos años, que se basan en instrumentos complicados difíciles de adquirir, poner a punto y mantener.
- Fácil manejo. No solo es tarea sencilla el uso de un montaje FIA para análisis de rutina, sino que es muy fácil también manipular su diseño para conseguir los resultados deseados. Así, es fácil sustituir algún componente, alargar un reactor, modificar la temperatura, etc., para adaptar el mismo montaje a la determinación de diversos analitos en diferentes matrices.

### ***Economía y versatilidad***

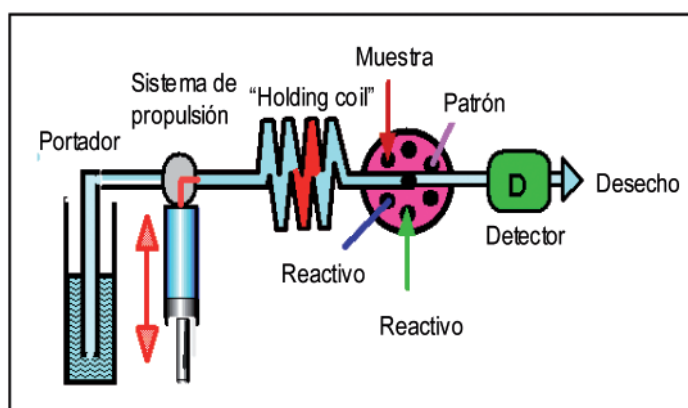
Al ser el FIA una técnica sencilla y simple, se caracteriza por su bajo coste, en claro contraste con otras metodologías automáticas, tanto continuas segmentadas, como discontinuas. Además, el carácter modular de un sistema FIA permite su adaptación a las diferentes necesidades. La sustitución de cualquiera de sus componentes y la incorporación de otros es tarea sencilla si se tiene en cuenta la ausencia de altas presiones que complicarían estas operaciones. La optimización de un nuevo montaje preparado en pocos minutos es fácil de llevar a cabo a diferencia de otros sistemas automáticos de análisis.

## **I.3. OTRAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO**

### **I.3.1. Análisis por inyección secuencial**

Ruzicka y Marshall en 1990 introdujeron otro tipo de sistemas de flujo no segmentado, el Análisis por Inyección Secuencial [40] (SIA), considerado como la segunda generación de las técnicas de flujo. Esta técnica está basada (Figura I.4.) en la aspiración secuencial de muestra y reactivo hasta un reactor (holding coil) mediante

una válvula múltiple de selección, impulsando a continuación la mezcla, mediante un cambio en el sentido del flujo, hacia el detector. Presenta algunas ventajas, como un menor gasto de reactivos, disminución de los desechos y un control automático y preciso de la manipulación de muestras y reactivos.



**Figura I.4.** Esquema general del Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

### I.3.2. Multiconmutación

Desde la introducción del análisis por inyección en flujo (FIA) se han desarrollado diferentes procedimientos para la manipulación de disoluciones y el control de la dispersión de las mismas. Para la ejecución de estas tareas, se han diseñado ingeniosos montajes y dispositivos que permiten la introducción de manera reproducible de la disolución de muestra en el sistema en flujo. Estos dispositivos han evolucionado desde la jeringa hipodérmica en los orígenes del FIA, pasando por el inyector proporcional, hasta culminar en la válvula rotatoria de seis puertos, actualmente el sistema de inyección más extendido en la metodología FIA.

Con estas válvulas de seis puertos los procesos de carga e inyección de muestra se efectúan por desplazamiento de un elemento móvil entre dos posiciones fijas, quedando definido el volumen de muestra a inyectar por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria. Sin embargo, la válvula de inyección de seis puertos es un dispositivo que condiciona el diseño del montaje FIA, exige un consumo extra de muestra y además presenta dificultades en cuanto a su automatización. Estas y otras limitaciones pueden paliarse mediante el diseño de un sistema en flujo, consistente en un conjunto de válvulas solenoide de tres puertos, actuando cada una de ellas como un conmutador independiente [41].

### ***Limitaciones de la válvula rotatoria de seis puertos***

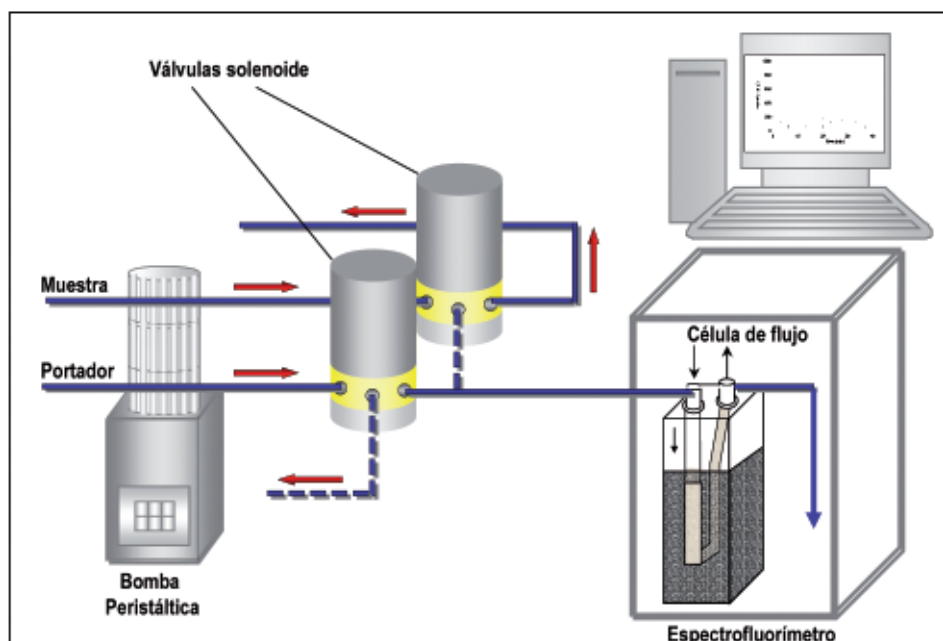
Con la válvula rotatoria de seis puertos sólo es posible introducir el volumen de muestra correspondiente al bucle, la introducción de un volumen distinto exige reemplazar la longitud del mismo con la consiguiente interrupción del flujo y consumo de tiempo [42,43]. Los volúmenes de muestra a inyectar en FIA están estrictamente limitados; los volúmenes más pequeños insertables corresponden al volumen interno de la válvula que suele ser de aproximadamente decenas de  $\mu\text{l}$ ; para volúmenes grandes el perfil de dispersión impone restricciones, ya que, la muestra se dispersa en el medio portador sólo a través de los extremos frente y cola. Por tanto, volúmenes grandes no permitirán un mezclado eficiente de la zona central del bolo de muestra con el portador a menos que se prolonguen los tiempos de residencia mediante caudales bajos y reactores de gran longitud, siendo necesario un lavado del bucle después de cada inyección con un volumen adicional de muestra para limpiar las paredes del mismo que han sido bañadas con la disolución portadora.

### ***Empleo de válvulas solenoide***

En el modo de multiconmutación [44] con válvulas solenoide de tres vías, el volumen de muestra a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Con respecto a los sistemas FIA, se sustituye la medida de los *volúmenes* de inserción por la de *tiempos* de inserción, lo que permite desarrollar métodos de muestreo basados en el tiempo y conseguir un sistema en flujo activo, versátil y de fácil reconfiguración. Por tanto, la incertidumbre asociada a las alícuotas de volúmenes de muestra está relacionada principalmente con la precisión en el control del tiempo de muestreo, siendo máxima la reproducibilidad si se emplean dispositivos electrónicos.

Las válvulas solenoide han sido utilizadas en cromatografía para la inserción de muestra y disolventes; para controlar la salida y la entrada de aire en cromatografía de gases; en espectrometría de masas para la introducción de disoluciones y en los montajes FIA se han incluido una o más válvulas solenoide, con el propósito de evitar las oscilaciones del flujo durante la inserción de la muestra [45] y en el análisis por inyección secuencial SIA, se han utilizado un conjunto de tres válvulas solenoide como interfase entre el horno microondas para la digestión de la muestra y el montaje para la determinación de hierro [46].

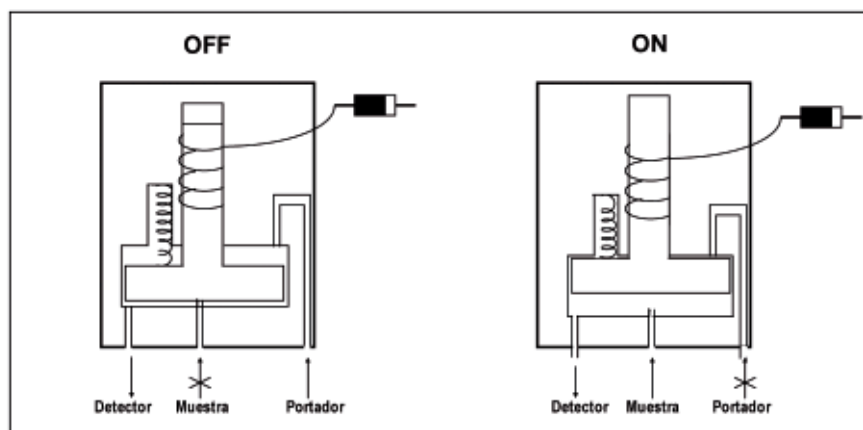
El dispositivo fundamental en multiconmutación es la válvula solenoide de tres vías. La implementación de una válvula solenoide de tres vías en un sistema en flujo presenta una estructura funcional controlada por el ordenador, como se muestra en la Figura I.5.



**Figura I.5.** Esquema de un sistema de flujo empleando dos válvulas solenoide.

Los montajes por multiconmutación con válvulas solenoide comprenden un número variable de válvulas que actúan cada una de ellas como un conmutador independiente controlado por un ordenador. Esta red, se podría asimilar a un circuito electrónico que presentase un número variable de nodos activos que podrían adoptar, de forma independiente en el tiempo, dos estados posibles "OFF y ON". De este modo, la dispersión de la muestra y de los reactivos puede ser controlada eficazmente, abriendo nuevos caminos para el desarrollo del análisis en flujo.

En la Figura I.6, se describe el funcionamiento de la válvula solenoide en las dos posiciones de OFF y ON.



**Figura I.6.** Funcionamiento de la válvula solenoide de tres puertos

En posición ON, al solenoide que está conectado al generador se le transmite una cierta cantidad de energía proporcional al pulso eléctrico y la armadura (en forma de T) es atraída hacia arriba, de esta forma se bloquea la entrada del portador permitiendo exclusivamente el paso de la muestra hacia el detector. Mientras que en posición OFF, el solenoide que está conectado al generador se relaja y la armadura es empujada hacia abajo, se bloquea la entrada de la muestra y únicamente circula el portador hacia el detector.

### ***Perfil de inserción en multiconmutación***

Las válvulas solenoide de tres vías, se comportan como un conmutador o interruptor entre dos posiciones distintas OFF y ON, permaneciendo en todo momento dos de los tres orificios de la válvula comunicados. Mientras la válvula se encuentra inactiva (OFF) la disolución de portador es aspirada hacia el detector; en posición ON un pulso electrónico de duración programable permite la inserción de la muestra en el portador. El volumen de muestra insertado es proporcional a la duración del pulso y puede modificarse alterando el perfil de la secuencia de inserción, siendo posible la inserción de un sólo segmento de muestra o de varios segmentos idénticos o de distintas longitudes alternados con disolución portadora. La muestra consumida es la aspirada durante el tiempo que la válvula permanece activa (ON).

Las microinserciones de pequeños segmentos de muestra “emparedados” entre microsegmentos de portador favorecen un mezclado íntimo de las disoluciones de muestra y portador incluso cuando el volumen inyectado es grande pues bastará con aumentar el número de microinserciones de muestra.

Se trata pues, de un sistema versátil que permite la inserción de volúmenes variables de muestra a través del "software" y garantiza la inserción reproducible de volúmenes muestra de unos pocos microlitros mediante el control electrónico de la duración de los pulsos.

### ***Ventajas y desventajas de la multiconmutación frente a FIA***

El empleo de pequeñas redes con nodos en forma de válvulas solenoide actuando como conmutadores y controladas por un ordenador a través de un sencillo "software", permite modificar la configuración del montaje (ciclos de apertura y cierre) sin necesidad de alterarlo físicamente y manipularlo, ampliando enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo, revolucionado en los últimos años por la metodología FIA. Las principales ventajas de la multiconmutación frente al análisis por inyección en flujo son:

- (1) *Miniaturización de los montajes en flujo.* El reducido tamaño de las válvulas solenoide y de las interfases electrónicas permite el desarrollo de equipos integrados de reducido tamaño y de instrumentación portátil para efectuar análisis "in situ".
- (2) *Disminución del consumo de muestra y reactivos.* Las configuraciones en multiconmutación permiten que tanto la muestra como los reactivos sean microdispensados de forma muy precisa; volúmenes de unos pocos  $\mu\text{l}$ , correspondientes a fracciones de segundo de tiempos de inserción, pueden obtenerse de forma muy reproducible.
- (3) *Aumento de la reproducibilidad.* La intervención del operador es mínima (principal fuente de irreproducibilidad), ya que, el proceso de inserción está controlado por un ordenador vía "software". Por tanto, la multiconmutación favorece el diseño de métodos de análisis completamente automáticos.
- (4) *Economía y sencillez.* El precio de una válvula solenoide de tres puertos es inferior al de una válvula rotatoria convencional de las empleadas en FIA. Además, el dispositivo para los ciclos de apertura y cierre de las válvulas solenoide sólo necesita un impulso eléctrico (12 V y 100 mA como valores de referencia).
- (5) *Versatilidad.* A diferencia de la metodología FIA, la multiconmutación permite alterar todas las variables que inciden directamente en los perfiles de dispersión, sin necesidad de modificar físicamente el montaje (volúmenes de muestra

insertados, tiempos de reacción, etc). La reconfiguración del mismo se lleva a cabo más fácilmente que en los sistemas FIA, basta únicamente con reprogramar la duración de los impulsos eléctricos que controlan la apertura y cierre de las válvulas, o modificar la secuencia de conmutación de las mismas.

(6) *Ampliación de las modalidades de análisis en flujo.* El "control electrónico" de la dispersión (mejor control espacio-temporal de la dispersión frente al FIA) y la mayor versatilidad asociada a la multiconmutación han permitido la implementación de modalidades de gradiente (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas), de procedimientos automáticos para determinaciones multiparamétricas y de montajes multicanales complejos que pueden ser manipulados de forma simple y eficaz.

Sin embargo, frente a estas importantes ventajas, hay que mencionar algunas limitaciones o desventajas:

(1) *Aspiración de muestra y reactivos.* Debido a que las válvulas solenoide actúan como un conmutador entre las posiciones ON-OFF, una de las dos posiciones de entrada o salida de las válvulas queda cegada, quedando interrumpido el flujo por ese canal, ello obliga a emplazar en algunas ocasiones la unidad de bombeo después de las válvulas y a aspirar muestra y reactivos en vez de ser bombeados, aumentando de esta manera la irreproducibilidad del caudal. No obstante, una sencilla combinación de las válvulas solenoide permite el emplazamiento clásico de la bomba antes de los puntos de inserción.

(2) *Comercialización de equipos.* La no disponibilidad comercial de los equipos (interfases electrónicas y "software" para el control de las válvulas solenoide) se pone de manifiesto en el hecho de que prácticamente la totalidad de los trabajos publicados relacionados con multiconmutación hacen uso de "hardware y software" de fabricación propia. No obstante, ambos elementos son muy sencillos, de ahí que hasta ahora sean de fabricación propia.

### **Modalidades FIA y multiconmutación**

La versatilidad y aplicaciones de la multiconmutación surgen como consecuencia de la mayor simplicidad y eficacia en el control de la dispersión de muestra y reactivos en comparación con la metodología FIA. La multiconmutación no es una manera más elegante y automatizada de reproducir las estrategias que el análisis por inyección en flujo ha desarrollado desde 1975, sino que, bajo esta denominación

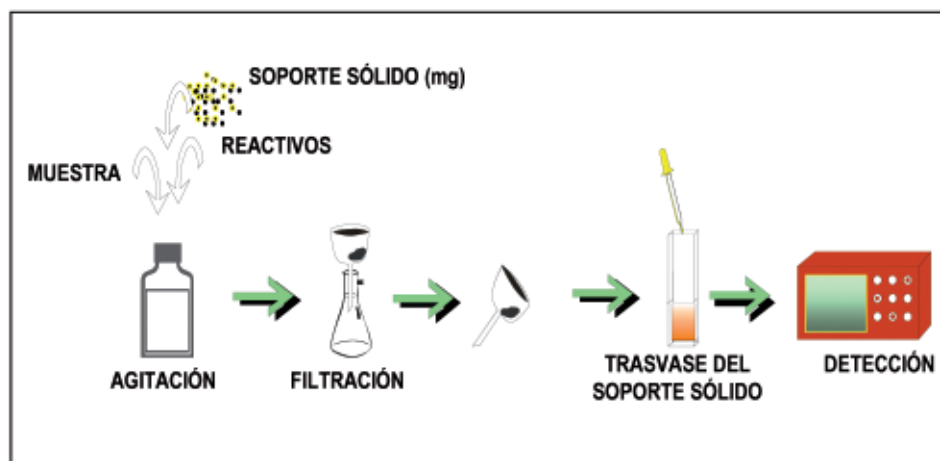
se esconde un nuevo concepto del análisis en flujo, el cual engloba y amplía al FIA como precursor. Es interesante destacar que mediante la combinación de válvulas solenoide y el diseño de redes eficaces y versátiles, se pueden reproducir y llevar a cabo las siguientes operaciones:

- 1) Reproducir el mecanismo de inserción del bolo de muestra en FIA.
- 2) Dispensar de manera controlada muestra y reactivos para llevar a cabo una determinación multiparamétrica basada en la discriminación espacial y temporal de los segmentos de disolución insertados.
- 3) Producir perfiles y gradientes de concentración adecuados, indispensables en procesos de dilución o en el diseño de métodos automáticos volumétricos.
- 4) Trabajar bajo modalidades en flujo (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas) que exigen una sincronización perfecta de los ciclos de apertura y cierre de las válvulas, lo cual es difícil de lograr con sistemas de inserción "clásicos".
- 5) Imitar las metodologías de flujo más recientes, como es el análisis secuencial en flujo (SIA).

## **I.4. OPTOSENSORES EN FLUJO CONTINUO**

### **I.4.1. Introducción. Integración de la espectroscopia en fase sólida y el análisis por inyección en flujo**

Podemos considerar la espectroscopia en fase sólida, practicada originariamente en modo batch o manual, como precursora de los optosensores en flujo continuo cuando se combina con la metodología FIA. En 1976 Yoshimura propuso el uso combinado de un soporte sólido para preconcentrar el analito (o su producto de reacción con un reactivo cromogénico) con la medida directa de la absorción de luz de la especie de interés retenida sobre la fase sólida (Figura I.7) [1]. A partir de entonces, se prestó atención a esta metodología (que Yoshimura denominó primeramente colorimetría de cambio iónico, pues los primeros soportes empleados eran cambiadores iónicos) y más propiamente debería llamarse espectrofotometría de cambio iónico y, desde un punto de vista más genérico, espectroscopía en fase sólida (SPS). Los primeros trabajos se dedicaron al análisis de traza metálicas, utilizando un reactivo cromogénico para desarrollar un producto coloreado. Posteriormente se aplicó a la determinación de compuestos orgánicos (generalmente principios activos de fármacos).



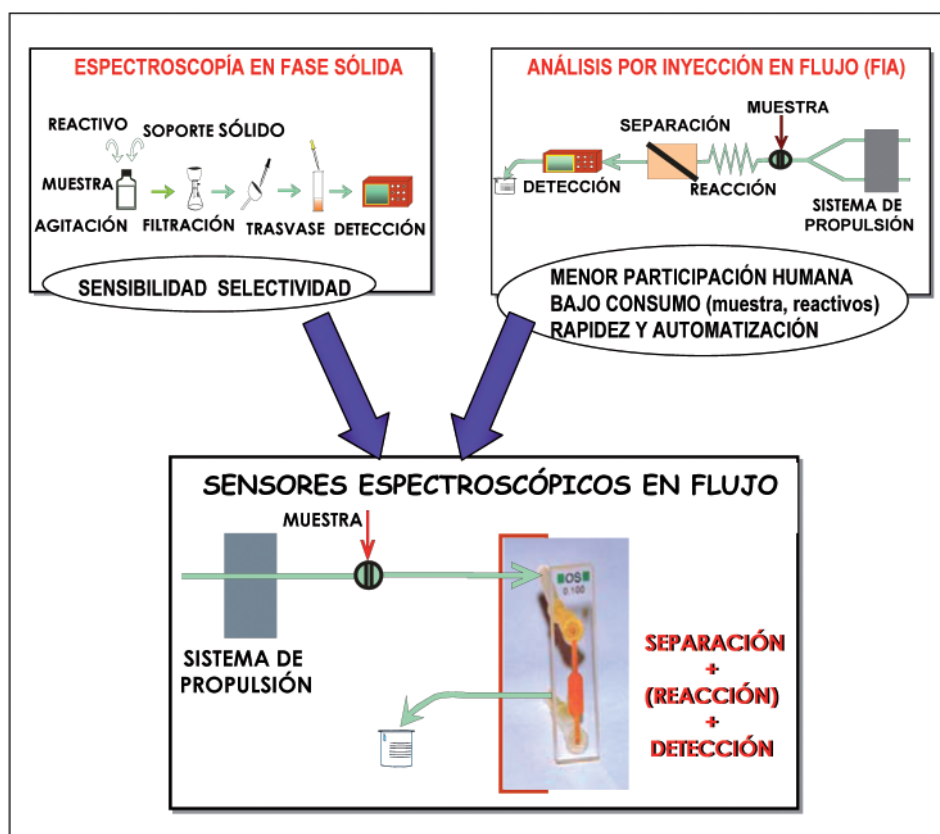
**Figura I.7.** Esquema de la espectroscopia en fase sólida (SPS)

La espectroscopía en fase sólida es una metodología que ha sido aplicada a una gran variedad de analitos orgánicos [47,48] e inorgánicos [2] y los métodos basados en ella ofrecen una alta sensibilidad y selectividad [4,49] utilizando una instrumentación barata y sencilla, mostrando además una gran aplicabilidad al análisis de muestras reales. El analito, al que generalmente se ha sometido a un proceso de derivatización, es previamente fijado por equilibración en un soporte sólido adecuado, que posteriormente se introduce en el interior de una cubeta (1 mm de paso de luz) donde se produce la detección directa del mismo.

Una gran ventaja de la SPS respecto a la espectroscopía convencional radica en el notable incremento de sensibilidad que ofrece, pues la misma es función del volumen de muestra a analizar, pudiendo cuantificarse niveles de concentración inferiores a  $0.1 \text{ ng ml}^{-1}$ . Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos traza por espectroscopía sin que sea obligado el empleo de una preconcentración del analito, seguida de una indeseable elución, tal como se requiere en la espectroscopía convencional. Otras ventajas de la SPS son la buena selectividad que se alcanza (al combinar la naturaleza de los reactivos y la fijación sobre un soporte sólido) y el bajo costo de la técnica. Mediante SPS se han determinado un amplio conjunto de elementos y compuestos [50-52]. Más tarde también se usó la espectrofluorimetría para la determinación directa de especies retenidas sobre el soporte sólido, ampliándose así las posibilidades de la SPS [53,54].

Posteriormente la SPS se combinó con el FIA incorporando el sólido activo a una célula de flujo. Una superficie sólida activa rodeada por una corriente que fluye a su través, combinada con la monitorización de la interacción entre dicho flujo y la superficie fue llamada por primera vez sensor óptico en flujo (flow-through sensor)

por Ruzicka y Hansen [5]. Estos sistemas también denominados optosensores en flujo, pueden realizar simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la misma célula de medida.



**Figura I.8.** Implementación de la SPS con el análisis por inyección en flujo: sensores espectroscópicos en flujo

#### I.4.2. Fundamentos de los optosensores espectroscópicos en flujo continuo

Los optosensores en flujo continuo son compatibles con detectores espectroscópicos moleculares. El bolo de muestra es insertado en la corriente de portador y la radiación interacciona directamente con la zona sensora integrada en el área de detección. Estos dispositivos proporcionan una respuesta rápida, reversible y continua que es transducida vía un detector espectroscópico molecular no destructivo.

##### I.4.2.1. Sensores espectrofotométricos

La señal analítica medida en los optosensores en flujo continuo está directamente relacionada con la concentración de analito de la muestra inyectada. La absorbancia

(en realidad atenuación)  $\mathbf{A}$ , medida sobre el soporte sólido consta de varios componentes [55]:

$$\mathbf{A} = \mathbf{A}_A + \mathbf{A}_R + \mathbf{A}_S \quad (1)$$

donde,

$\mathbf{A}_A$  es la absorbancia del analito o su derivado retenido en el sólido.

$\mathbf{A}_R$  es la absorbancia del sólido (soporte sólido + reactivo, si lo hay).

$\mathbf{A}_S$  es la absorbancia de la solución intersticial entre las partículas del sólido (puede ser despreciada, generalmente, frente a los otros términos).

El empaquetamiento de las partículas del sólido activo afecta a los valores de los términos del segundo miembro de la ecuación (1). Sin embargo, cuando el flujo está circulando unos cuantos segundos, el empaquetamiento es fijo (constante) y la línea base muestra un valor constante, igual a  $\mathbf{A}_R + \mathbf{A}_S \approx \mathbf{A}_R$ . Por tanto el pico obtenido al paso del analito  $\mathbf{A}_A$  corresponde a la diferencia entre el valor experimental medido  $\mathbf{A}$  y  $\mathbf{A}_R + \mathbf{A}_S$ . De esta forma, la señal analítica de estos sistemas puede obtenerse directamente midiendo a una sola longitud de onda, y pueden llevarse a cabo reiteradas medidas sobre el mismo empaquetamiento del sólido. Sin embargo, en SPS en modo discontinuo, cada medida se efectúa sobre diferentes lotes de sólido empaquetado en la célula, con lo que el empaquetamiento es diferente en cada caso, lo que origina valores de  $\mathbf{A}_A$  no reproducibles si se mide a una sola longitud de onda. Por ello, en SPS manual se necesita efectuar las medidas a dos longitudes de onda (una en el máximo de absorción y otra donde sólo el soporte sólido absorbe luz) para eliminar el efecto de la variabilidad en el empaquetamiento.

La absorbancia neta del analito viene dada por

$$\mathbf{A}_A = \varepsilon_R I_R C_R$$

donde

$\varepsilon_R$  = absortividad molar aparente del analito en la fase sólida tal como se observa en el sistema de flujo ( $\text{kg mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ )

$I_R$  = longitud media de paso óptico

$C_R$  = concentración de analito en la fase sólida ( $\text{mol kg}^{-1}$ )

Cuando se inyectan en el sistema **V** l de una muestra conteniendo una concentración **C<sub>0</sub>** mol l<sup>-1</sup> de analito, la concentración sobre la fase sólida (**C<sub>R</sub>**, mol kg<sup>-1</sup>) será:

$$C_R = C_0 V / m_r$$

(**m<sub>r</sub>** = masa de sólido, kg) suponiendo un valor alto del coeficiente de distribución (como suele ser lo habitual). Por tanto,

$$A_A = \epsilon_R I_R V C_0 / m_r$$

Por consiguiente, manteniendo **V** constante, existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración inicial, **C<sub>0</sub>** del analito en la solución de muestra inyectada, siendo  $\epsilon_R I_R V / m_r$  la pendiente de la recta de calibración.

De esta ecuación se desprende una importante característica de estos optosensores en flujo: manteniendo **C<sub>0</sub>** constante, **A<sub>A</sub>** crece conforme crece **V**. Por tanto, cabe esperar una relación lineal entre **A<sub>A</sub>** y el volumen de muestra inyectado, es decir, la sensibilidad es proporcional al volumen de muestra usado para el análisis y, por tanto, puede incrementarse aumentando éste. Esto se cumple en un intervalo de valores de **V** (hasta, generalmente, unos 1500-2000 µl), por encima del cual la señal tiende a estabilizarse.

#### **1.4.2.2. Sensores (foto)luminiscentes**

En sensores fluorimétricos puede encontrarse una relación similar entre la señal analítica y la concentración de analito en la solución problema. La señal de fluorescencia de la especie de interés retenida en el soporte sólido viene dada por la siguiente expresión [55]:

$$I = 2,303[1/(1+Sb)]\phi_F I_0 \epsilon_R I_R C_R$$

$\phi_F$  = rendimiento cuántico de fluorescencia

**I<sub>0</sub>** = intensidad del haz de excitación

$\epsilon_R, I_R, C_R$  igual que en sensores espectrofotométricos

**S** = coeficiente de dispersión (fracción de radiación dispersada por unidad de espesor del soporte sólido)

**b** = espesor del soporte

Por tanto,

$$I = 2,303[(1/1+Sb)]\phi_F I_0 \epsilon_R l_R V C_0 / m_r$$

De esta ecuación, se puede deducir que la señal de fluorescencia y la concentración de la especie de interés también están directamente relacionadas y el efecto del volumen de muestra es similar al caso de los sensores espectrofotométricos. Además, la cantidad a usar,  $m_r$ , debe ser la mínima posible que permita la geometría de la célula y el diseño del haz del detector, pues la señal, de acuerdo con las ecuaciones anteriores, es inversamente proporcional a la cantidad de soporte sólido empleado.

Relaciones similares de proporcionalidad entre la señal y la concentración de la especie de interés pueden encontrarse para sensores fosforescentes y quimioluminiscentes.

### **I.4.3. Componentes de los optosensores en flujo continuo**

Como se ha mencionado anteriormente, los optosensores en flujo surgen de la combinación del FIA con la SPS, por tanto los elementos de estos dispositivos son los propios de un sistema FIA (sistemas de propulsión, transporte, inyección y detección). La única diferencia, en principio, con respecto a un sistema FIA, es la presencia de soporte sólido en la célula de flujo, donde se llevan a cabo las medidas espectroscópicas.

#### **I.4.3.1. Soportes sólidos**

El soporte sólido es el elemento más importante de este tipo de sensores. La elección del soporte entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse, constituye una parte esencial del diseño del sensor, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la integración de reacción y/o retención y la detección espectroscópica. El soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos:

- (a) El tamaño de las partículas debe ser adecuado (entre 40 y 120  $\mu$ m generalmente), ya que tamaños de partícula menores podrían generar sobrepresiones en el sistema.
- (b) El material escogido debe ser químicamente inerte a los componentes de las soluciones del flujo y resistente al flujo continuo, garantizando reproducibilidad en la respuesta del sensor.

- (c) Compatible con el sistema de detección usado (por ejemplo, en los sensores fotométricos, la absorción de fondo debe ser suficientemente baja para permitir realizar las medidas sin saturar el detector).

Dos son los grupos principales de soportes empleados:

(a) Polímeros de intercambio iónico

Polímeros de matriz aromática hidrofóbica (estireno/divinilbenceno) y polímeros de povidexano suelen ser los más utilizados. Los segundos son más transparentes y permiten medir en la región ultravioleta, mientras los de matriz aromática poseen fondos de absorción muy altos en la región ultravioleta y sólo pueden usarse en la región visible. Las resinas Dowex son las más representativas de los primeros y los geles Sephadex (QAE A-25, CMC-25 y SPC-25) de los segundos. El proceso de retención es por intercambio iónico.

(b) Sólidos adsorbentes no polares

De este grupo, conocido también como resinas macroporosas, las resinas XAD son bastante empleadas. Generalmente, se emplea en los sensores luminiscentes, dada su alta absorción de fondo tanto en el visible como en el ultravioleta. La retención es por adsorción. También se usa como soporte sólido gel de sílice  $C_{18}$ , que también presenta un mecanismo de naturaleza adsorptiva.

Los cuatro tipos de materiales más usados son:

1. Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno.
2. Cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano.
3. Resinas adsorbentes sin grupos funcionales.
4. Sílice con fases enlazadas.

#### CAMBIADORES IÓNICOS DERIVADOS DE POLÍMEROS DE ESTIRENO.

Éstos polímeros de cambio iónico están constituidos por una matriz hidrófoba formada por cadenas lineales de poliestireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex 1, Dowex 50W, etc.). Unidos al anillo aromático, se hallan los grupos

cambiadores, que pueden ser de ácido fuerte o débil para los cambiadores catiónicos (tipo Dowex 50) y de base fuerte o débil para los aniónicos (tipo Dowex 1).

Desde el punto de vista de su empleo en el desarrollo de optosensores, hay que destacar que son muy útiles para la retención/elución de complejos inorgánicos o en el caso de cambiadores catiónicos para la retención irreversible de reactivos orgánicos que formen complejos con cationes. Los cambiadores aniónicos son menos útiles para la retención irreversible de reactivos, pues si al pH óptimo de la reacción éstos están cargados negativamente el anclaje sobre el cambiador se produce a través de los grupos quelantes, inactivándolos.

La utilización de estos soportes en sistemas que emplean reactivos aromáticos que forman complejos muy estables con cationes o aniones inorgánicos, plantea también numerosos inconvenientes, pues la elución del complejo resulta enormemente difícil.

#### CAMBIADORES IÓNICOS DERIVADOS DE POLÍMEROS DE DEXTRANO

Las resinas derivadas de polímeros de dextrano están formadas por polisacáridos que se obtienen entrecruzando dextrano con epiclorhidrina, son por tanto, cambiadores de naturaleza polar, debido a los numerosos grupos hidroxilo existentes en los anillos de la estructura. Son adsorbentes polares con grupos no iónicos.

Pueden introducirse grupos funcionales iónicos obteniéndose cambiadores iónicos con carácter ácido fuerte (Sephadex SE y SP) y ácido débil (Sephadex CM), base fuerte (Sephadex GE, TEAE, QAE) y base débil (Sephadex DEAE, AE). Estos soportes pueden ser utilizados para la retención de complejos con ligandos tanto orgánicos como inorgánicos, ya que la naturaleza no aromática del cambiador, hace que la retención se produzca mediante interacciones casi exclusivamente electroestáticas, o en cualquier caso, débiles, facilitándose mucho la elución con respecto a los cambiadores mencionados en el apartado anterior. También son muy útiles para la determinación de especies orgánicas por medida de su absorbancia intrínseca en la zona UV, lo que resulta imposible con cambiadores de naturaleza aromática debido a la intensa absorción que presentan.

#### RESINAS ADSORBENTES SIN GRUPOS FUNCIONALES.

Son resinas adsorbentes constituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de divinilbenceno (al igual que las resinas tipo Dowex), pero

carentes de grupos funcionales cambiadores de iones (otro tipo, menos frecuente, está fabricado a partir de acrilato). Bien conocidas son las resinas macroporosas tipo Amberlita XAD, que son materiales porosos por lo que, al igual que las tipo Dowex, se afectan por las características del medio de reacción, aunque no tanto como aquéllas.

Las resinas adsorbentes son capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por adsorción, de este modo los grupos activos de dichos reactivos quedan libres y éstos no pierden su capacidad de complejación. No obstante, su alta opacidad en toda la región del Visible (y UV) limita fuertemente su uso en SPS.

Su obtención se lleva a cabo realizando la polimerización estireno-DVB en presencia de un disolvente orgánico como el tolueno, apropiado para disolver los monómeros pero no para el polímero. Estas resinas macroporosas son muy útiles para su uso en disolventes no polares, en los que las resinas de cambio iónico ordinarias apenas se hinchan y el cambio iónico es por tanto lento. Su uso es frecuente en la industria, debido a que son fácilmente regenerables.

## SÍLICE CON FASES ENLAZADAS

Se trata de soportes constituidos por microesferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena suele ser de 2, 8 ó 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos, por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio.

Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos, aromáticos o no (ya sean reactivos formadores de complejos o analitos de naturaleza orgánica), ya que retienen débilmente a estos compuestos, en medio acuoso o hidro-orgánico y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos.

## OTRAS FASES SENSORAS

Además de estos soportes sólidos, se han descrito optosensores con otro tipo de fases sensoras como ciclodextrinas [56], vidrio de tamaño de poro controlado (CPG) [57], materiales de procesos sol-gel [58] y polímeros de impresión molecular [59].

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son materiales macroporosos con puntos de unión selectivos capaces de reconocer a una determinada molécula. Son diversos los usos que se han dado hasta ahora a estos polímeros. Estos materiales son capaces de simular, en términos de afinidad y selectividad, los anticuerpos y/o enzimas sintetizados por los sistemas biológicos. El uso de MIPs en sensores ópticos está aun en su infancia a pesar de la creciente atención que viene recibiendo en los últimos años [60]. La incorporación de MIPs como soportes activos en sistemas de flujo aportará importantes condiciones de selectividad a estos sistemas, particularmente en la determinación de especies orgánicas, donde los soportes tradicionalmente usados en optosensores (resinas de intercambio iónico,  $C_{18}$ -gel de sílice) ejercen con estas moléculas interacciones (electrostáticas, adsorción) de carácter inespecífico.

Los MIPs ofrecen un extraordinario potencial analítico para la determinación selectiva y altamente sensible de especies, tanto iónicas como moleculares. La investigación en el campo de polímeros impresos se halla en pleno desarrollo, precisándose un enorme esfuerzo investigador no sólo desde el punto de vista básico, ensayando nuevas vías de preparación, sino de nuevas aplicaciones prácticas especialmente en el campo de sensores ópticos, donde esta tecnología esta en sus comienzos.

Estos nuevos materiales que presentan estabilidad química a largo plazo, resistencia mecánica y química elevada, ofrecen la posibilidad de diseñar receptores para un elevado número de sustratos. Las excelentes características analíticas de los sensores ópticos basados en el empleo de MIPs pueden extenderse a un gran número de aplicaciones de interés medioambiental e industrial. Nuevos mecanismos de transducción óptica y polímeros de diversa composición y/o configuración son hitos a desarrollar en esta tecnología.

#### ***1.4.3.2. Células de flujo***

Las células de flujo son otro elemento clave en el diseño de optosensores en flujo. Una célula de flujo ideal para un sensor en flujo debe reunir dos requisitos:

- Conseguir la concentración del producto de interés sobre el soporte en un área de la célula tan pequeña como sea posible.
- El haz de radiación debe incidir sobre esta área (sin irradiar las proximidades de la zona citada).

El nivel de sólido en la célula es una variable clave: debe llenarse hasta una altura tal que el haz de luz incida completamente sobre el soporte sólido y sin que éste

apenas llegue a exceder el límite superior del haz de luz, pues alturas crecientes a partir de este límite originan la fijación de la especie de interés por encima del haz (fuera de la zona de detección) o bien una dispersión del bolo de muestra a lo largo de una mayor cantidad de sólido, con pérdida de sensibilidad y disminución de frecuencia de muestreo. Niveles más bajos del indicado, producen, por su parte, también, una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de solución. En definitiva, la parte superior del sólido debe mantenerse tan próxima al límite superior del haz como sea posible, pero por encima de él.

#### ***1.4.3.3. Técnicas de detección***

En los optosensores en flujo o sensores espectrocópicos en flujo, se han empleado distintas técnicas de detección. A continuación, se enumeran algunas de las más empleadas.

#### **ESPECTROFOTOMETRÍA DE ABSORCIÓN MOLECULAR**

La espectroscopía de absorción molecular es, sin duda, la técnica de detección más frecuentemente usada en los laboratorios analíticos dada su facilidad de adaptación a una amplia variedad de problemas analíticos. Fue la técnica con la que Ruzicka y Hansen [5] describieron en 1985 el concepto de optosensor en flujo ("flow-through optosensor"). La espectrofotometría es una de las técnicas más empleadas para el desarrollo de optosensores. Los primeros descritos fueron los basados en espectrofotometría visible para la determinación de metales mediante la formación y retención de complejos coloreados.

Por otra parte, aunque la espectrofotometría de absorción UV adolece de escasa selectividad para poder usarse en análisis espectrofotométrico convencional, el empleo de soporte sólido activo en los sensores espectrofotométricos mejora sensiblemente la selectividad. Existen un gran número de ejemplos de aplicaciones de optosensores UV especialmente para el análisis de principios activos en productos farmacéuticos [55].

#### **LUMINISCENCIA MOLECULAR**

*Espectroscopía de fotoluminiscencia molecular.* La fluorescencia también ha sido aplicada al desarrollo de optosensores [55, 61,62]. Esta técnica de detección ofrece

alta sensibilidad, buena selectividad y excelentes límites de detección. El inconveniente de la misma respecto de la fotometría es el menor número de sustancias que presentan fluorescencia nativa. Por consiguiente, a menudo es necesario el empleo de reactivos derivatizadores. Otra alternativa empleada recientemente para extender las posibilidades de los optosensores fluorescentes es el empleo de fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF) [63]. Esta técnica está basada en la conversión de analitos no fluorescentes en fotoproductos fuertemente fluorescentes. La principal ventaja que presenta frente a la derivatización química es el empleo de fotones para la derivatización del analito en lugar de un reactivo químico, no siendo necesario un sistema de mezcla y por tanto el sistema de inyección en flujo se simplifica, ya que el montaje que se requiere para desarrollar este tipo de reacciones es muy sencillo.

Por otra parte, también se han descrito optosensores que emplean detección fosforescente para una gran variedad de analitos (contaminantes orgánicos, iones metálicos, sensores de humedad y pH, etc) [64].

La luminiscencia sensibilizada por lantánidos está basada en las propiedades luminiscentes de iones lantánidos (terbio (Tb (III)) y europio (Eu (III))), que se ven incrementadas, cuando interaccionan con distintas especies químicas orgánicas (fármacos, pesticidas, etc.). Esta mejora de la intensidad luminiscente que se consigue al formar este tipo de quelatos, permite el desarrollo de métodos muy sensibles, ya que la selectividad de este tipo de medidas luminiscentes es mayor que la de las medidas fluorimétricas convencionales. Son bastante escasos los optosensores de este tipo encontrados en bibliografía, habiéndose puesto a punto sensores para la determinación de fármacos como tetraciclinas y antraciclinas monitorizando la emisión luminiscentes de sus complejos con Eu(III) [65-67]. También se ha descrito recientemente un optosensor para la determinación de norfloxacin empleando Tb(III) [68].

*Quimioluminiscencia.* El uso analítico de la quimioluminiscencia (CL) está experimentando un creciente interés, gracias a su elevada sensibilidad y selectividad, bajos límites de detección e intervalos dinámicos amplios. Además, la instrumentación necesaria para llevar a cabo medidas de quimioluminiscencia es muy sencilla. En 1985, fue descrito el primer sensor en flujo con detección quimioluminiscente [57]. Empleaba luminol inmovilizado en un soporte sólido de vidrio de tamaño de poro controlado. A partir de entonces, se han desarrollado varios optosensores de este tipo principalmente para el análisis de fármacos [69].

## ESPECTROSCOPIA VIBRACIONAL

La espectroscopia vibracional es otra de las técnicas que se han implementado en el desarrollo de optosensores en flujo. Las características que aporta la espectroscopia vibracional es información específica relacionada con grupos estructurales. El desarrollo de optosensores en flujo que empleen espectroscopia vibracional con fines analíticos (cuantitativos) es muy escaso. Solamente hay algunos ejemplos en la literatura que describen el empleo de espectroscopia NIR [70], MIR [71-73] y espectroscopia Raman sensibilizada por superficies (SERS) [74,75]. Estas técnicas de detección pueden aportar información estructural de grupos específicos y característicos de los compuestos estudiados, y esto ha sido ya explorado en el estudio de azúcares, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, etc. También se han desarrollado recientemente un optosensor con detección por espectroscopia Raman para el análisis de antibióticos del grupo de las sulfonamidas [76].

### **I.4.4. Desarrollo de los optosensores en flujo: variables experimentales.**

En este apartado se describirán las distintas etapas y los distintos factores y variables que se tienen en cuenta a la hora de estudiar y desarrollar un optosensor espectroscópico en flujo. Los aspectos más relevantes que se estudian son:

- (a) Selección del soporte sólido: variables de la unidad de retención / detección
- (b) Estudio de las variables químicas
- (c) estudio de las variables FIA
- (d) regeneración del soporte sensor

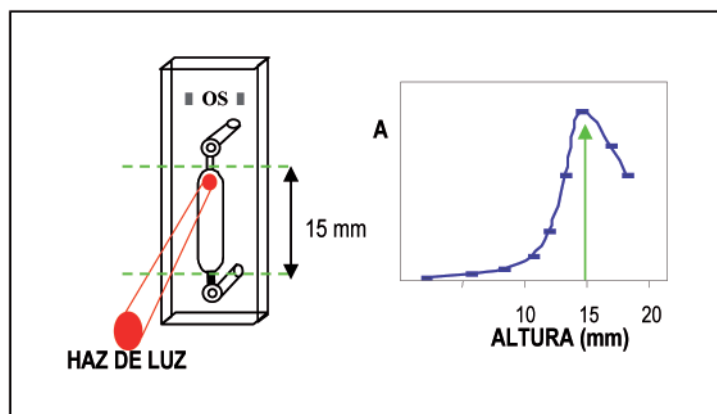
#### **(a) Selección del soporte sólido: variables de la unidad de retención / detección.**

La selección del soporte sólido es una de las etapas más importantes en el desarrollo de un optosensor en flujo. Para llevar a cabo la selección se tienen en cuenta propiedades físicas y químicas de la especie a retener. En general, se suelen usar resinas de intercambio iónico, cuando el analito presenta un equilibrio ácido-base, que permita que pueda estar cargado en un intervalo de pH determinado en función del valor de los  $pK_a$ . No obstante, cuando la molécula es apolar o no presenta grupos funcionales que permitan su retención en un intercambiador de iones, se

puede recurrir al empleo de soportes sólidos sin grupos funcionales, o que permitan la retención de la especie de interés mediante un mecanismo principalmente de adsorción. Por tanto, a la hora de seleccionar el soporte sólido es necesario prestar especial atención a variables químicas como el pH de la muestra o del portador, ya que pueden tener gran influencia en el comportamiento del analito en la fase sólida.

Una vez seleccionado el soporte sólido, otro factor muy importante es la cantidad o nivel de soporte sólido en la célula. El soporte debe cubrir completamente el área irradiada del detector, pues de lo contrario las medidas se harían total o parcialmente en fase líquida, perdiendo tanto selectividad como sensibilidad. Un exceso de soporte sólido es, en general, perjudicial, pues contribuye a una mayor dispersión del bolo de muestra y a una pérdida de velocidad de muestreo. Por tanto, lo ideal es cubrir hasta unos milímetros (1.5 – 2 mm.) por encima del límite del haz de radiación. No obstante, esta cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo, puede proporcionar en ciertos casos un grado de discriminación entre especies de la muestra (permitiendo el desarrollo de optosensores para la determinación de varios analitos de forma simultánea) o bien separar parte de la matriz del analito, de forma que se incrementa la selectividad en detrimento de una pequeña disminución de sensibilidad.

En la siguiente figura, se muestra como afecta el nivel de soporte sólido en la célula de flujo en una medida espectroscópica.



**Figura I.9.** Efecto del nivel de soporte sólido en la célula de flujo en una medida espectrofotométrica

### **(b) Variables químicas**

El pH y la naturaleza de la solución portadora es la primera de las variables a estudiar. Es una variable especialmente crítica, sobre todo cuando se trabaja con resinas de intercambio iónico. Cuando dicha disolución sólo hace la función de

portador y no actúa, además, como eluyente de la especie retenida, debe escogerse de forma que origine la máxima señal del analito por permitir su retención en la zona irradiada, normalmente en la parte superior de la zona sensora. El pH tiene influencia especialmente en las especies que poseen comportamiento ácido – base, careciendo de efecto significativo, generalmente, cuando el analito no sufre equilibrios protolíticos.

Cuando, además, actúa de eluyente de la especie a determinar, tanto el pH como su concentración ejercen un efecto decisivo principalmente cuando se usan cambiadores iónicos. En este caso es preferible esta situación, pues el empleo de una solución eluyente adicional conduce a cambios alternantes en la posición de la línea base y al acortamiento de la vida del soporte. La concentración creciente de la solución eluyente suele actuar rebajando la respuesta analítica del sensor, pues los iones del eluyente compiten con la especie de interés por su fijación en la zona sensora.

Generalmente se usan como eluyentes adicionales disoluciones ácidas, básicas, salinas, agentes complejantes, oxidantes, etc. Para gel de sílice- $C_{18}$  suelen ser soluciones metanólicas las más adecuadas. Cuando se usa el reactivo inmovilizado en el soporte, otra variable adicional a considerar es la cantidad de reactivo por gramo de soporte. Si, por otro lado, la reacción se efectúa antes de que el analito llegue al detector, el proceso de optimización del reactivo es similar al de un sistema FIA convencional.

El pH de la muestra inyectada también debe ser investigado. Puede influir en la señal en sentido similar al del pH del portador.

### **(c) Variables FIA**

**Caudal.** La influencia del caudal es dependiente de la rapidez del proceso de retención en la zona sensora. Cinéticas de retención muy rápidas dan señales apenas afectadas por el caudal dentro de los valores permitidos para éste. En cambio, las cinéticas de retención lentas dan señales analíticas cada vez menores al aumentar el caudal, lo que conlleva una disminución de sensibilidad, aunque por otro lado aumenta la frecuencia de muestreo. Por lo tanto, hay que adoptar una solución de compromiso entre sensibilidad y velocidad de análisis.

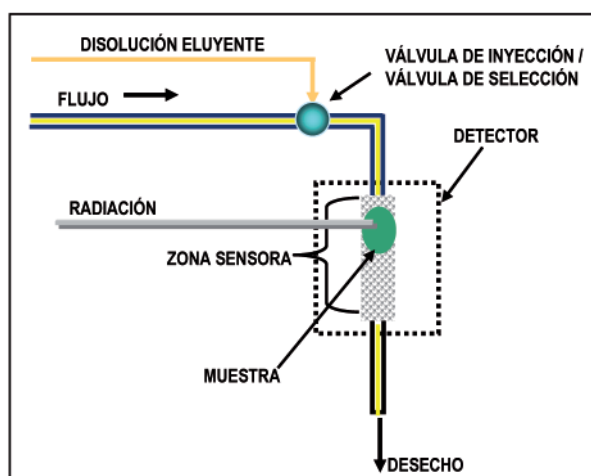
**Volumen de muestra.** Una de las características más destacables de los sensores en flujo continuo es la posibilidad de incrementar sustancialmente la sensibilidad incrementando el volumen de muestra inyectado, como consecuencia del incremento

de la cantidad de analito retenido en la zona de detección. Cuando el coeficiente de distribución es alto, la dependencia de la señal con el volumen de muestra es lineal. Esto dota a estos sensores de una gran versatilidad para trabajar en un amplio rango de concentraciones, simplemente cambiando el volumen de muestra inyectado.

#### **(d) Regeneración del soporte**

La etapa de regeneración es crucial en este tipo de sensores ya que va a determinar la rapidez, sencillez del montaje, reproducibilidad, vida media del soporte sólido, etc. Dependiendo del tipo de analito y de sus propiedades físicas y químicas (polaridad, equilibrios ácido-base, grupos funcionales característicos, mecanismo de retención del soporte sólido elegido, etc.) se optará por una determinada estrategia para llevar a cabo la elución del analito y proceder a otra nueva inyección.

Tras la medida, la zona sensora tiene que ser regenerada para quedar lista para la siguiente determinación haciendo que el sensor sea reusable. Llevar a cabo este paso de regeneración es un requerimiento clave e importante. Se puede conseguir de dos formas, que se encuentran esquematizadas en la Figura I.10.



**Figura I.10.** Esquema de la retención de la especie de interés en el soporte sensor y procedimiento de regeneración

- a) El procedimiento más simple de regeneración se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente. Entonces, el proceso de regeneración comienza justo en el momento en el que el extremo posterior del bolo alcanza el soporte sólido. En este caso se obtendrá una señal transitoria. Es el procedimiento más sencillo y permite frecuencias de

muestreo altas y asegura una mayor duración del soporte cuando éste es una resina de intercambio iónico.

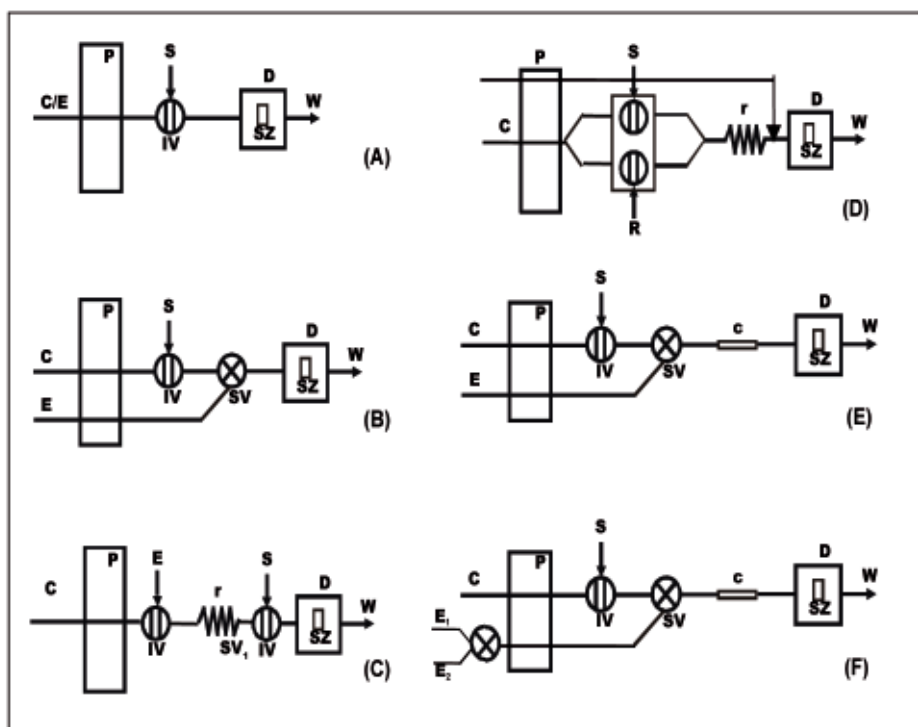
- b) En los casos en los que no es posible la regeneración del sensor con el propio portador se emplea una solución eluyente adicional, que se hace llegar a la zona sensora mediante inyección de un volumen definido en el sistema, o usando una válvula de selección. Permite mayor sensibilidad pues al no haber elución simultánea al proceso de retención, la preconcentración es más efectiva pero ofrece menor frecuencia de muestreo y suele acortar la vida del sensor si el soporte es una resina de intercambio iónico.

Los agentes utilizados en la regeneración de sensores varían en función de la naturaleza de las especies retenidas y del tipo de interacción entre dichas especies y el soporte sólido. Pueden utilizarse, entre otros, agentes oxidantes o reductores, tensioactivos, agentes complejantes, disolventes orgánicos e incluso simplemente cambios de pH o de fuerza iónica del medio. Por otro lado, la desactivación de la superficie sensora con el uso es un inconveniente, pues se ven limitados los requerimientos esperados de longevidad y uso repetido del sensor.

Si la retención del analito es muy fuerte, se han de emplear soluciones salinas, ácidas o básicas muy concentradas para conseguir la elución del mismo en un tiempo adecuado, lo cual conlleva que el soporte experimente hinchamientos y deshinchamientos que además de alterar la línea base acortan sustancialmente su vida. Además no siempre es posible la elución de este analito o su producto de reacción. En estos casos se justifica el uso de la renovación de la superficie sensora mediante inyección en flujo, que evita la necesidad de un mecanismo de funcionamiento reversible del sensor. Esta metodología está basada en el concepto de espectroscopía con inyección de partículas o microesferas (*"Bead Injection Spectroscopy"*) [77].

#### **I.4.5. Configuraciones FIA típicas en los optosensores en flujo**

En función del tipo de optosensor, de la regeneración, de la separación de analitos, de si es necesario derivatizar, las configuraciones FIA usuales difieren. Como ejemplo, en la siguiente figura están representadas algunas de las configuraciones FIA más habituales en el desarrollo de optosensores en flujo continuo:



**Figura I.11.** Algunas de las configuraciones típicas más empleadas en optosensores en flujo. P: Bomba peristáltica; C: disolución portadora; E: disolución eluyente; C/E: disolución portadora-eluyente; S: muestra; IV: válvula de inyección; SV: válvula de selección; D: detector; SZ: zona sensora; W: desecho; r: reactor; R: reactivo; c: pre-columna de separación de analitos.

La configuración más sencilla de un optosensor en flujo es una configuración monocanal en la que la solución portadora actúa también como solución eluyente. El analito es eluido en cuanto el extremo del bolo alcanza el sensor, por lo que se origina una señal transitoria (Figura I.11.A). En el caso de que la especie sea retenida tan fuertemente que el portador no puede eluirla, es necesario el empleo de una disolución eluyente adicional. En este caso, se requiere el empleo de una válvula adicional, bien de selección (Figura I.11.B) o de inyección (Figura I.11.C). Esta configuración incorporando el uso de una solución eluyente suele acortar la vida del sensor si la zona sensora es una resina intercambiadora.

Cuando se requiere una reacción de derivatización previa se realiza una inyección doble sincronizada de muestra y reactivos. También se suele emplear un reactor para completar la reacción antes de que el bolo alcance la microzona sensora (Figura I.11.D).

El uso de una minicolumna colocada "on-line" delante de la zona sensora amplía el potencial de las configuraciones monocanal (Figura I.11.E y Figura I.11.F). Esto permite la determinación de más de un analito con una simple inyección (multisensor). Un analito pasa a través de ella hacia la zona sensora mientras el (los) otro(s) es (son) retenido(s) en la minicolumna. El primero es eluido por el propio portador. La elución del (los) analito(s) retenido(s) en la minicolumna con la(s) solución(es) adecuada(s) seleccionada(s) con SV permite determinar simultáneamente dos (Figura I.11.E) y hasta tres (Figura I.11.F) analitos haciéndolos llegar secuencial y sucesivamente a la zona de detección.

## I.5. LOS ANALITOS Y SU DETERMINACIÓN

Los analitos seleccionados para desarrollar las metodologías descritas en esta Memoria son de interés en el campo medioambiental, alimentario y farmacéutico. A continuación se incluye una introducción de cada uno de ellos así como los principales métodos de análisis descritos en la literatura para su determinación.

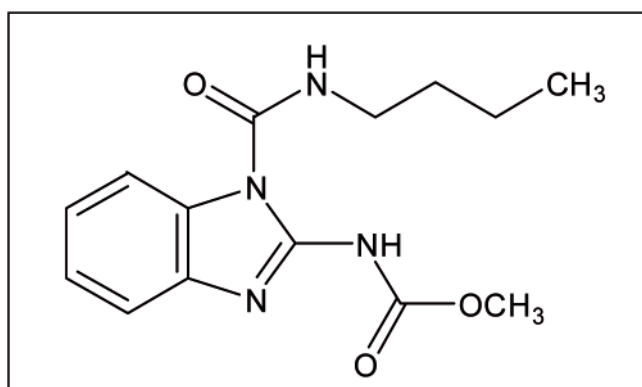
### I.5.1. Pesticidas

Durante los últimos treinta años la lista de pesticidas en la agricultura, ha crecido rápidamente debido al desarrollo de la química orgánica de síntesis y la urgente necesidad por el empleo de la agricultura intensiva. El uso masivo de estos compuestos para la producción, almacenamiento, manipulación y transporte de alimentos tiene como principal consecuencia la presencia de los mismos tanto en el medio ambiente como en el producto final (alimentos). La necesidad de controlar los niveles de residuos de plaguicidas presentes tanto en los alimentos que tomamos como en el medio ambiente es la causa principal por la que el análisis de pesticidas es uno de los campos de interés de la Química Analítica.

La denominación de pesticidas incluye todas aquellas sustancias que se utilizan para proteger los cultivos y los productos vegetales contra las enfermedades, el ataque de los insectos, los parásitos, las malas hierbas y los microorganismos dañinos. Los grupos más importantes de pesticidas son: *herbicidas*, que protegen a las plantas de las malas hierbas; *fungicidas*, que impiden el crecimiento de hongos o mohos perjudiciales en semillas y cultivos maduros, e *insecticidas*, para proteger a las plantas y a sus frutos de las lesiones causadas por los insectos. Además de estos grupos principales, se encuentran otros como acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas y los reguladores de crecimiento.

### **Benomilo**

El **Benomilo** [1-(butilcarbamoil)bencimidazol 2-il carbamato de metilo] (Figura I.12) es un fungicida empleado en una gran variedad de cultivos. Presenta actividad preventiva y curativa sobre numerosas enfermedades de los cultivos y plantaciones agrícolas ocasionadas por hongos [78]. Su campo de actividad incluye ecto y endoparásitos; en cuyo control se recomienda tanto en tratamientos preventivos como curativos. Se consideran enfermedades controlables: entre otras la antracnosis de los cítricos, cercospora de la remolacha, chancro del manzano y de los frutales de hueso, fialófora, mal del esclerocio de diversas hortalizas, podredumbre del pie de los cereales, podredumbre gris de la uva, repilo y otras enfermedades fúngicas. Recomendado en cereales, cítricos, champiñón, florales, fresa, frutales, hortalizas, ornamentales, platanera, remolacha y vid.



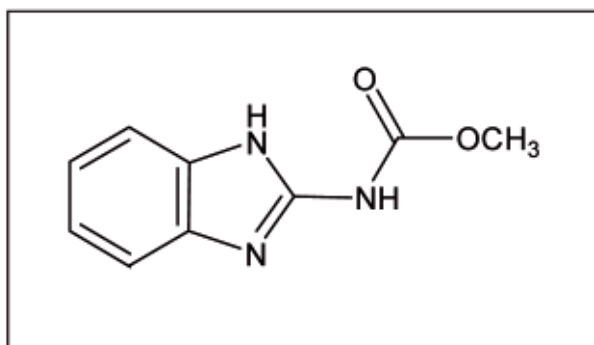
**Figura I.12.** Estructura del benomilo

### **Carbendazima**

La **carbendazima** [(Bencimidazol 2-il carbamato de metilo)] es un fungicida del grupo de los benzimidazoles, que es ampliamente usado en una gran variedad de cultivos. Es el principal producto de degradación del benomilo, ya que en disoluciones orgánicas o acuosas a pH no ácidos, el benomilo se convierte en carbendazima [79].

La carbendazima posee efecto preventivo y curativo sobre enfermedades fúngicas producidas por endo y ectoparásitos. Su uso se recomienda para el control de antracnosis de la judía y del plátano, añublo del trigo, chancro del almendro y melocotonero, moteados o roñas del manzano y peral, oídio de la vid, oídio del

albaricoquero, almendro, melocotonero, rosal, cerezo, ciruelo, espino blanco, manzano, cereales, etc., podredumbre gris de la uva, etc. en apio, arbustos ornamentales, cereales de invierno, fresa, frutales, leguminosas grano, lúpulo, ornamentales leñosas, ornamentales herbáceas, pepino, piña, platanera, remolacha azucarera, tomate, vid para vinificación y en la desinfección de semillas. Se le reconoce actividad secundaria sobre huevos de ácaros. Se aconseja alternar con otros fungicidas de distinto grupo químico.



**Figura I.13.** Estructura de la carbendazima

### **Métodos para la determinación de benomilo y carbendazima**

*Benomilo.* Debido a la inestabilidad del benomilo en disoluciones acuosas, los métodos de análisis desarrollados están basados en la medida de su principal producto de degradación, la carbendazima [80]. Hay escasos métodos que hayan determinado benomilo de forma directa. No obstante, Singh describió mediante una serie de experiencias con distintos medios ácidos, unas condiciones en las que el benomilo permanecía estable [81]. Esto permitía la posibilidad de analizarlo individualmente (sin previa degradación a carbendazima) y/o en presencia de carbendazima.

La mayoría de los métodos fluorimétricos descritos para la determinación de benomilo se han centrado básicamente en la determinación de benomilo como carbendazima [82]. Se han desarrollado varios métodos espectrofluorimétricos para la determinación de este pesticida [83-86]. La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de benomilo en muestras de agua están basados en HPLC en fase reversa [87], con detección fluorescente [88], y/o UV [89-92] o por espectrometría de masas [93].

Se ha descrito un método para la determinación de benomilo en aguas naturales basado en espectrofluorimetría en fase sólida, desarrollado por Vélchez y col [94].

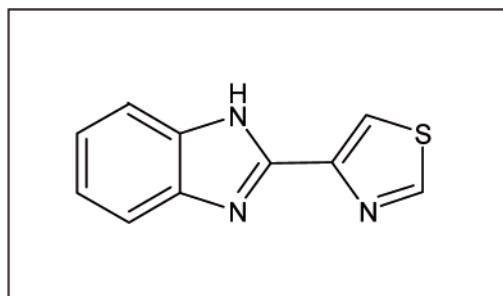
Este método ofrece una gran sensibilidad y límites de detección por debajo de 0.5 ng/ml.

**Carbendazima.** La carbendazima presenta fluorescencia nativa [85]. Esta característica ha sido empleada para el desarrollo de un gran número de métodos analíticos. Se ha usado fluorescencia nativa en disolución [95], fluorescencia sensibilizada con micelas [96] y la combinación de micelas y ciclodextrinas [97]. También se han desarrollado métodos para la determinación de carbendazima basados en quimioluminiscencia [98], técnicas electroquímicas [99-101], inmunoensayos [102] y espectroscopia vibracional [103]. También se ha empleado cromatografía de líquidos en fase reversa [104,105] (RP-HPLC) con detección UV o fluorescencia [106], cromatografía de líquidos con detección mediante espectrometría de masas en tandem [93] y cromatografía capilar electrocinética micelar [107] (MEKC) para la determinación de residuos de carbendazima en aguas.

Teniendo en cuenta que la carbendazima es el producto de degradación del benomilo, la dificultad de desarrollar métodos para la determinación simultánea de ambos compuestos es bastante elevada. Existen pocos métodos descritos para la determinación simultánea de estos dos compuestos. Todos están basados en métodos cromatográficos y el uso de reacciones de derivatización [89].

### **Tiabendazol**

El **tiabendazol** [2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol] es un fungicida del grupo de los imidazólicos, empleado ampliamente desde 1968 en el control de enfermedades de vegetales y frutas, principalmente cítricos, tales como mohos, plagas, manchas y podredumbres. Es un sólido blanco, insoluble en agua y soluble en disolventes orgánicos. Es un fungicida de amplio espectro y baja toxicidad.



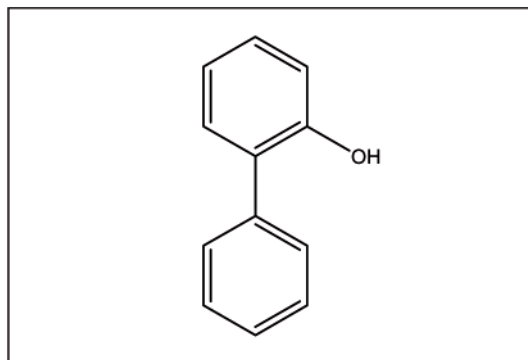
**Figura I.14.** Estructura del tiabendazol

El tiabendazol es en la actualidad el fungicida “post-cosecha” más utilizado en Europa junto con el imazalil. Se emplea en la protección preventiva de pudriciones de almacén producidas por *Botrytis* sp., *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, etc.; también actúa sobre las producidas por *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Gloeosporium* sp y otros hongos. Son muy frecuentes las asociaciones de tiabendazol con imazalil y otros fungicidas. Estas asociaciones de fungicidas se caracterizan por conseguir un campo de actividad más amplio que el de sus componentes individuales a la vez que reducen la posibilidad de que aparezcan razas resistentes. Los formulados existentes en el mercado son de aplicación directa, en pulverización sobre la rulada por la que pasan los frutos antes del tren de cepillado. Así, la presencia de tiabendazol e imazalil consigue un amplio espectro de actividad sobre los hongos productores de podredumbres de almacén en frutos cítricos, incluso sobre *Alternaria* sp. y *Botrytis* sp.

Las formulaciones de tiabendazol con ortofenilfenol consiguen mayor protección frente al ataque de *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Botrytis* sp., *Gibberella baccata*, *Gloeosporium* sp., *Penicillium digitatum*, *Penicillium expansum*, *Verticillium* sp y otros hongos causantes de podredumbres de almacén en frutos cítricos, que la conseguida actuando cada componente por separado. Las formulaciones que contienen ceras o resinas, de cumarona indeno o de norsolene, consiguen ejercer un cierto control sobre la respiración y transpiración, retrasando el envejecimiento y reduciendo las pérdidas de peso; mejoran el aspecto del fruto al mantener la turgencia y aumentar el brillo, y potencian su resistencia a la acción del frío, con todo ello se consigue una mejor conservación de los frutos en cámara y un mejor aspecto de los mismos. El tiabendazol también se utiliza como antihelmíntico, para eliminar, en los humanos o en animales, las infecciones producidas por parásitos helmintos: cestodos (tenias), nematodos (áscaris, oxiuriasis o enterobiasis, triquiuros), triquinosis, etc.

### **Ortofenilfenol**

El **ortofenilfenol** es otro fungicida muy usado para tratamiento post-recolección de cítricos y otras frutas. Su uso está centrado en el control preventivo de podredumbres de almacén de origen fúngico. Son frecuentes las formulaciones que contienen la sal sódica (ortofenilfenolato sódico) asociada a imazalil o tiabendazol junto con «ceras» o resina de cumarona indeno, formando líquidos solubles, soluciones detergentes, emulsiones cera-agua o emulsiones cera-disolvente.



**Figura I.15.** Estructura del ortofenilfenol

Las asociaciones de ortofenilfenol con «ceras» y/o resinas (de coníferas, cumarona indeno, etc.), han sido desarrolladas para su empleo en el tratamiento post-recolección de frutos cítricos con el fin de protegerlos de las podredumbres de almacén de origen fúngico (aspergilliosis, diplodiosis, peniciliosis, etc.), retrasar su envejecimiento, evitar pérdidas de peso por reducción de la respiración y transpiración y mejorar su aspecto por aumento del brillo. Las emulsiones cera-agua y cera-disolvente son de aplicación directa, mediante aparatos pulverizadores adecuados seguidos de máquina de cepillos, mientras que los líquidos solubles están indicados en el sistema de inmersión en balsa; los formulados que contienen detergentes pueden ser aplicados mediante máquinas de espuma y por inmersión en balsa.

### ***Métodos para la determinación de tiabendazol y ortofenilfenol***

**Tiabendazol.** Para la determinación de tiabendazol, se han desarrollado diversos métodos analíticos tanto espectrofluorimétricos [110-112] como fosforimétricos [113-117], aprovechando sus propiedades luminiscentes intrínsecas, que permiten el desarrollo de métodos sensibles y bastante selectivos. El tiabendazol suele determinarse tanto en alimentos como en muestras medioambientales (principalmente agua). El empleo de tiabendazol en cítricos como tratamiento post-recolección es muy frecuente. Su uso en este cultivo está permitido con unos niveles de tolerancia relativamente elevados (Límite máximo de residuos de entre 5 y 10 mg/kg) dependiendo del país (Japón, EE.UU o Europa) [118-121]. Por este motivo, el desarrollo de métodos rápidos para la determinación de este fungicida en cítricos es de gran interés. Los principales métodos de análisis de residuos de tiabendazol en alimentos están basados en técnicas cromatográficas.

Los métodos más empleados son los basados en cromatografía de líquidos (HPLC) generalmente con detección fluorescente o UV, aunque en los últimos años se ha extendido mayoritariamente la detección por espectrometría de masas [122-124]. También ha sido descrito el uso de electroforesis capilar para la determinación de tiabendazol [125,126] así como el acoplamiento electroforesis capilar/espectrometría de masas [127,128].

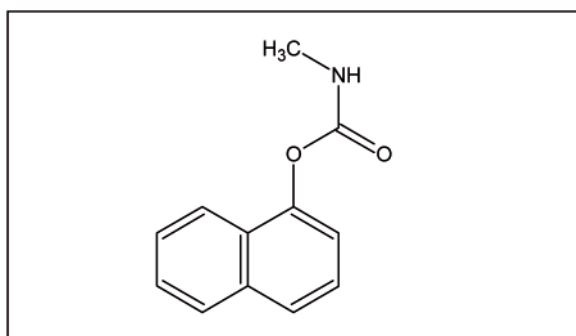
La metodología de análisis por inyección en flujo (FIA) y análisis por inyección secuencial (SIA) con detección fluorescente han sido desarrolladas para la determinación de este pesticida [129,130]. Por último, hay que destacar un método descrito para la determinación de tiabendazol en aguas basado en espectrofluorimetría en fase sólida [3]. Con este método, se aumenta la sensibilidad obtenida en las técnicas luminiscentes anteriores, pero presenta como principal inconveniente, la falta de automatización y baja capacidad de análisis debido a la laboriosidad de la técnica.

*Ortofenilfenol.* El ortofenilfenol también presenta fluorescencia nativa. Se han descrito varios métodos para la determinación de ortofenilfenol [131], basados en HPLC con detección UV [132] y detección electroquímica [133], fosforimetría en papel [134], espectrofluorimetría en fase sólida [135,136] y espectrofotometría [137,138].

Los métodos desarrollados para el análisis simultáneo de tiabendazol y ortofenilfenol están basados en cromatografía de líquidos con detección UV o fluorescente [139-141], HPLC-MS [122] y cromatografía capilar electrocinética micelar [142]. También se ha empleado un sistema FIA acoplado a un espectrómetro de masas con fuente de ionización a presión atmosférica para el análisis de estos dos fungicidas [143].

### **Carbarilo**

El **carbarilo** (N-metilcarbamato de 1-naftilo) es un insecticida de la familia de los N-metil carbamatos. Es un insecticida de amplio campo de acción. Frecuentemente se le formula con otros insecticidas que complementan su campo de actividad o su forma de acción. Se formula con azufre micronizado, clorpirifos y malation. Los insecticidas de carbamato de N-metilo son muy utilizados en el hogar, jardines y agricultura. Éstos comparten con los organofosforados, la capacidad de inhibir las enzimas colinesterásicas y por lo tanto comparten una sintomatología similar durante las exposiciones agudas y crónicas.



**Figura I.16.** Estructura del carbarilo

Su uso está recomendado en el control de una gran cantidad de insectos (langostas, chiches, polillas, gusanos, orugas...) en un gran número de cultivos (trigo, tomate, arroz, ciruelas, melocotones, naranjas, alfalfa, patatas, etc).

### **Métodos para la determinación de carbarilo**

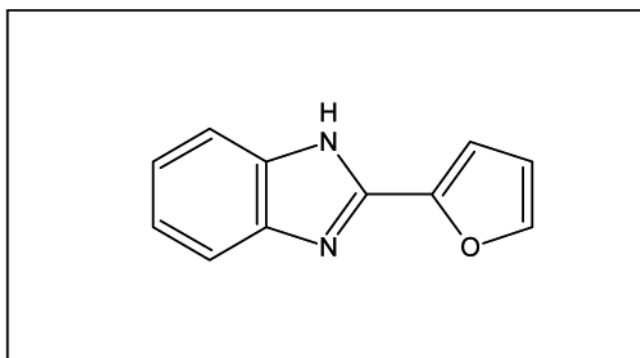
Se han empleado la fosforescencia [144,145], fluorescencia [146-150], técnicas de inmunoensayo [151,152] y biosensores [153] para la determinación de carbarilo. También se han descrito métodos espectrofotométricos para la determinación de carbarilo, mediante reacciones de derivatización [154,155].

Dentro de los métodos automatizados, se ha empleado análisis por inyección en flujo con distintas técnicas de detección: espectrofotometría [156,157], fluorescencia [158], fluorescencia sensibilizada con micelas [159-161], fosforescencia [116], quimioluminiscencia [162-164], espectroscopia vibracional [165], espectrometría de masas (electrospray) [166]. También se ha empleado cromatografía de líquidos con detección fluorescente mediante reacción de derivatización [167] y HPLC-MS [168].

### **Fuberidazol**

El **fuberidazol** (2-(2-furil)-bencimidazol) es otro fungicida de la familia de los bencimidazoles (Figura I.17). Presenta una estructura muy parecida al tiabendazol. Es un fungicida de amplio espectro con actividad frente a una gran variedad de hongos. Se usa para el tratamiento de semillas contra enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium* (*Fusarium nivale* en centeno y *F. culmorum* en

guisante). Se suele comercializar en productos que también contienen bitertanol e imidacloprid.



**Figura I.17.** Estructura del fuberidazol

### ***Métodos para la determinación de fuberidazol***

Para la determinación de fuberidazol se han desarrollado métodos espectrofotométricos empleado espectrofotometría de absorción [169], fluorescencia [129,170-172] y fosforescencia inducida por "átomos pesados" [173].

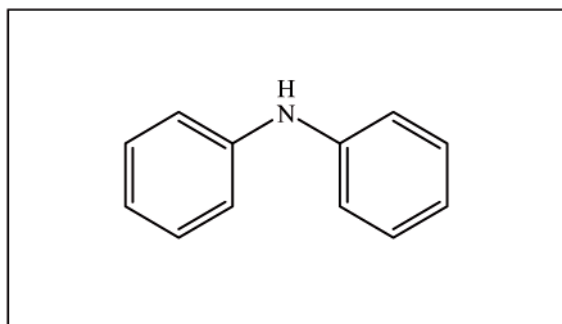
### ***Métodos para la determinación de carbarilo, benomilo y fuberidazole***

Para la determinación y resolución de mezclas que contengan estos pesticidas se han descrito varios métodos basados en fluorescencia [174], fluorescencia sincrónica de ángulo variable [175] y HPLC con detección por UV [90] o mediante fluorescencia [106,176].

### ***Difenilamina***

La **difenilamina** es un producto antioxidante que se emplea como tratamiento post-recolección en manzanas y peras, con el fin de evitar el escaldado de las frutas. El escaldado superficial, que se caracteriza por manchas de color pardo sobre la piel de los frutos, representa uno de los desórdenes fisiológicos más comunes en post-cosecha de manzanas. El síntoma aparece generalmente, después de períodos prolongados de almacenaje (sobre 4 meses), atribuyéndose la alteración a la oxidación del "alfa-farneseno" en "trienos conjugados" (presentes en la piel de la fruta), los cuales poseen un efecto tóxico sobre las células hipodermales de las

manzanas. La difenilamina se emplea para el control preventivo, mediante la aplicación del antioxidante como ducha prealmacenaje lo que otorga un adecuado grado de control. Su uso está autorizado en varias frutas con unos niveles máximos autorizados entre 5 y 10 mg kg<sup>-1</sup> de fruta [118].



**Figura I.18.** Estructura de la difenilamina

### ***Métodos para la determinación de la difenilamina***

En la actualidad, hay muy pocos métodos descritos para el análisis de difenilamina en alimentos. Principalmente, se ha empleado cromatografía de líquidos de alta resolución con detección electroquímica [177], por fluorescencia [131] o mediante espectrometría de masas (Electrospray) [178]. También se ha empleado cromatografía de gases/espectrometría de masas para el análisis de difenilamina en frutas y vegetales [179,180].

### **I.5.2. Iones metálicos: cadmio y aluminio**

#### ***Aluminio***

El **aluminio** es el tercer elemento más abundante en la corteza terrestre (8,23% en peso) y el metal más abundante, pero no se encuentra libre. Se encuentra fundamentalmente combinado con el oxígeno formando los feldespatos, micas y arcillas. También forma parte de la composición de muchas piedras preciosas, como el zafiro y el rubí.

El aluminio puro es un metal blanco-plateado, blando y frágil, con muy buenas propiedades: ligero, no magnético y maleable, por lo que se aplica a utensilios de cocina, decoración y cientos de aplicaciones industriales donde se necesita resistencia,

ligereza y facilidad de fabricación. Es un buen conductor por lo que se usa en transmisión de la corriente eléctrica. Aleado con otros elementos adquiere buenas propiedades para la construcción de aviones, cohetes, bicicletas, etc. Es muy estable a la corrosión porque forma rápidamente una fina capa, densa, dura y translúcida de su óxido que impide el ataque posterior por el oxígeno.

El aluminio no es una sustancia necesaria para el organismo y en grandes cantidades puede ser peligroso. La ingesta de aluminio se produce a través de la comida, el aire y la piel. La toma de concentraciones significantes de aluminio puede causar efectos serios como daño al sistema nervioso central, demencia, pérdida de la memoria, apatía, temblores severos y trastornos respiratorios como tos y asma. El aluminio puede causar problemas en los riñones de los pacientes, cuando entra en el cuerpo durante el proceso de diálisis.

Algunos estudios han demostrado la relación entre la enfermedad de Alzheimer y la cantidad de aluminio en el cerebro, aunque no se conoce con precisión si el aluminio causa esta enfermedad o si la acumulación de aluminio se desarrolla en personas que ya presentan la enfermedad.

El aluminio en el medioambiente puede acumularse en las plantas y causar problemas de salud a animales que consumen esas plantas. Las concentraciones de aluminio parecen ser muy altas en lagos acidificados, y en éstos, un gran número de peces y anfibios se ven afectados. Elevadas concentraciones de aluminio también causan efectos sobre los pájaros y otros animales que consumen peces contaminados y sobre animales que respiran el aluminio a través del aire, produciendo problemas de pulmones, pérdida de peso y declinación de la actividad. Otro efecto negativo en el medioambiente es que sus iones pueden reaccionar con los fosfatos, lo que origina que el fosfato no esté disponible para los organismos acuáticos. También se pueden encontrar altas concentraciones de aluminio en aguas subterráneas y suelos ácidos, pudiendo dañar las raíces de los árboles.

### ***Métodos para la determinación de Aluminio (III)***

Se han descrito un gran número de métodos y técnicas analíticas tanto atómicas como moleculares para la determinación de Al (III). Absorción atómica de llama y de horno de grafito y emisión atómica mediante plasma acoplado inductivamente (ICP) e ICP-MS son las principales técnicas atómicas para la determinación de Al(III) [181,182]. Por otra parte, se han descrito también un gran número de métodos mediante el uso de técnicas moleculares basadas en la formación de quelatos con

propiedades luminiscentes. Se ha empleado fluorescencia [183-185], fosforescencia [186] y quimioluminiscencia [187] para la determinación de Al(III). También se han descrito métodos espectrofotométricos [51].

Los principales reactivos fluorogénicos descritos para la determinación de Al (III) han sido: Rojo de Eriocromo B [188,189], hidroxiflavonas (quercetina [190], morina [191-194], y purpurina [195]), lumogalion [196,197], oxinas (ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico [198-200], 8- hidroxiquinolina [201]), salicilhidrazonas [202,204], etc. El empleo de ácido cromotrópico (ácido 4,5-dihidroxinaftalen-2,7 disulfónico) como reactivo para la determinación fluorimétrica de Al (III) ha sido descrito recientemente [205,206]. En esta memoria se ha desarrollado un método fluorimétrico para la determinación de Al(III) empleando ácido cromotrópico.

### **Cadmio**

El **cadmio** es un metal dúctil, de color blanco con un ligero matiz azulado. Es más blando y maleable que el zinc, pero poco más duro que el estaño. Presenta ocho isótopos estables en la naturaleza y se han descrito once radioisótopos inestables de tipo artificial.

El cadmio no se encuentra en estado libre en la naturaleza, y la greenockita (sulfuro de cadmio), único mineral de este metal, no es una fuente comercial del mismo. Casi todo el que se produce es obtenido como subproducto de la fundición y refinamiento de los minerales de zinc, los cuales por lo general contienen de 0.2 a 0.4% de cadmio. Estados Unidos, Canadá, México, Australia, Bélgica, Luxemburgo y República de Corea son fuentes importantes, aunque no todos son productores.

### **Efectos ambientales del Cadmio**

De forma natural grandes cantidades de cadmio son liberadas al ambiente, sobre 25.000 toneladas al año. La mitad de este cadmio es liberado en los ríos a través de la descomposición de rocas y algún cadmio es liberado al aire a través de fuegos forestales y volcanes. El resto del Cadmio es liberado por las actividades humanas, como es la manufacturación.

Las aguas residuales con cadmio procedentes de las industrias mayoritariamente terminan en suelos. Las causas de estas corrientes de residuos son por ejemplo la producción de Zinc, minerales de fosfato y las bioindustrias del estiércol. El cadmio

de las corrientes residuales puede también entrar en el aire a través de la combustión de residuos urbanos y combustibles fósiles. Debido a las regulaciones, sólo una pequeña cantidad de cadmio entra ahora en el agua a través del vertido de aguas residuales de casas o industrias.

El cadmio es fuertemente adsorbido por la materia orgánica del suelo. Cuando el cadmio está presente en el suelo este puede ser extremadamente peligroso. Los suelos que son ácidos aumentan la absorción de cadmio por las plantas. Esto es un daño potencial para los animales que dependen de las plantas para sobrevivir.

### ***Toxicidad del cadmio***

El cadmio es un metal pesado que produce efectos tóxicos en los organismos vivos, aun en concentraciones muy pequeñas. La exposición al cadmio en los humanos se produce generalmente a través de dos fuentes principales: la primera es la vía oral (por agua e ingestión de alimentos contaminados). La segunda vía es por inhalación. La población fumadora es la más expuesta al cadmio, porque los cigarrillos lo contienen.

Algunos órganos vitales son blanco de la toxicidad del cadmio. En organismos sobreexpuestos, el cadmio ocasiona graves enfermedades al actuar sobre dichos órganos. Existen actualmente algunas descripciones de posibles mecanismos de toxicidad del cadmio. Sin embargo, la implicación real que este elemento tiene como agente tóxico ha sido poco estudiada, por lo que se considera que debe ser controlado. Es de gran importancia llevar a cabo estudios para profundizar en los factores de riesgo y así realizar medidas preventivas en la población.

A pesar de que son claras las evidencias de la toxicidad del cadmio, aún no se realizan estudios formales acerca de las consecuencias reales que tiene la acción de este metal sobre los organismos vivos, especialmente en el humano. Es importante tomar medidas preventivas para regular las descargas de cadmio al ambiente. Asimismo, se debe proteger a las personas que por una otra causa se encuentren sobreexpuestas a este metal. Debe también considerarse aumentar la información acerca del cadmio a la población en general.

### ***Métodos para la determinación de Cadmio (II)***

Se han descrito un gran número de métodos y técnicas analíticas para la determinación de cadmio (II). Emisión atómica mediante plasma acoplado

inductivamente (ICP) [207] e ICP-MS [208,209], junto con la fluorescencia atómica [210] y la absorción atómica de llama o con horno de grafito [211-216] son las principales técnicas atómicas para la determinación de Cd (II). Además de las técnicas atómicas, se han descritos varios métodos para la determinación de cadmio basados en técnicas electroquímicas [217-225], cromatografía iónica [226], espectrofotometría [227-229] y fluorescencia molecular [230-234] mediante la formación de complejos con Cd (II).

### **I.5.3. Principios activos de fármacos: naproxeno y ácido salicílico.**

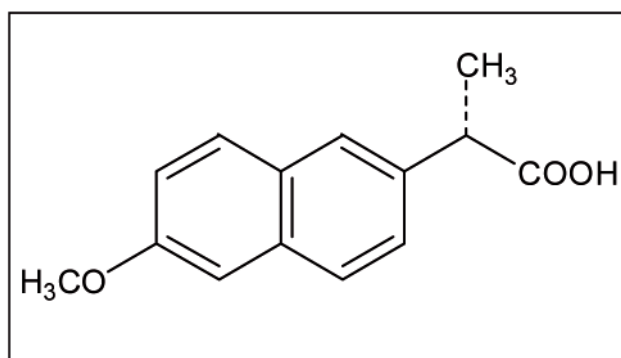
Los fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) (NSAIDs) son un grupo de fármacos que actúan bloqueando la síntesis de Prostaglandinas, presentando actividad antiinflamatoria, analgésica (disminuye el dolor) y antipirética (baja la fiebre).

La aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos bloquean la enzima cicloxigenasa, que es crucial para la creación de prostaglandinas. Las prostaglandinas son sustancias similares a las hormonas que alteran el diámetro de los vasos sanguíneos, elevan la temperatura corporal como respuesta a la infección y desempeñan un papel crucial en la coagulación de la sangre, además de otros efectos. La liberación en el organismo de prostaglandinas como respuesta a una lesión (quemadura, rotura, torcedura o distensión muscular) produce inflamación, enrojecimiento e hinchazón.

Dado que las prostaglandinas desempeñan un papel protector del aparato digestivo contra el ácido gástrico, tomar aspirina o un fármaco similar puede causar trastornos gastrointestinales, úlceras y hemorragias. Todos los fármacos antiinflamatorios no esteroideos pueden causar acidez, indigestión y úlceras pépticas.

#### ***Naproxeno***

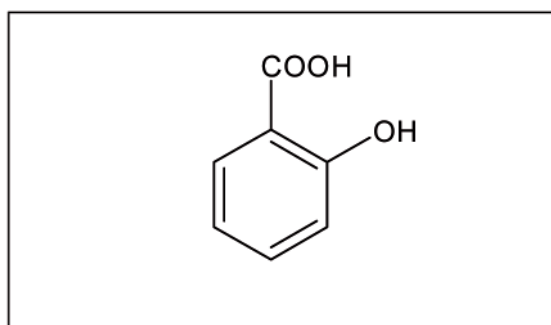
El **naproxeno** es un fármaco anti-inflamatorio no esteroideo que también posee propiedades analgésicas y antipiréticas. Pertenecce a la familia de los ácidos aril-propiónicos como el ketoprofen, ibuprofen y flurbiprofen. Desde el punto de vista farmacológico, el naproxeno es semejante a la aspirina y a la indometacina pero muestra una menor incidencia de efectos secundarios. El naproxeno se utiliza en el tratamiento de la artritis reumatoide y otros desórdenes inflamatorios y dolorosos. En algunos países como España, el naproxeno puede ser adquirido sin prescripción médica.



**Figura I.19** Estructura del naproxeno

### Ácido salicílico

El efecto medicinal de la corteza del sauce y otras plantas se conoce desde hace siglos en varias culturas. El ingrediente activo de la corteza de sauce es un glucósido amargo llamado salicilina, aislado por primera vez en forma pura por Leroux en 1829. Por hidrólisis, la salicilina libera glucosa y alcohol salicílico; este último puede ser convertido en ácido salicílico tanto in vivo como por manipulación química y también se preparó con aceite de gaulteria y de extractos de otras plantas, incluso *Spiraea ulmaria*.



**Figura I.20.** Estructura del ácido salicílico

El enorme éxito de este compuesto llegó de la mano de Hoffman, un químico empleado por Bayer, que sintetizó ácido acetilsalicílico basado en el trabajo previo de Gerhardt de 1853, en olvido. La demostración de sus efectos antiinflamatorios, le valieron para ser introducido en medicina por Dreser en 1899 bajo el nombre de aspirina, motivado por la especie vegetal *Spirea* de la cual se preparó por primera vez el ácido salicílico. Los salicilatos sintéticos desplazaron rápidamente a los de origen natural, más costosos. A pesar de la introducción de muchas drogas nuevas,

la aspirina (ácido acetilsalicílico) sigue siendo probablemente el agente analgésico-antipirético y antiinflamatorio más empleado, y es la norma de comparación y evaluación de los demás.

El **ácido salicílico** (ácido ortohidroxibenzoico) es tan irritante que sólo puede usarse externamente, y por ello varios derivados de este ácido se han sintetizado para el uso sistémico, que son los Salicilatos. Estos forman dos grandes clases que son los ésteres del ácido salicílico, obtenidos por sustitución en el grupo carboxilo, y los ésteres de salicilato de ácidos orgánicos, en los que el grupo carboxilo del ácido salicílico se conserva y la sustitución se hace en el grupo OH. Por ejemplo, la aspirina es un éster del ácido acético. Los salicilatos actúan normalmente en virtud de su contenido en ácido salicílico.

### ***Métodos para la determinación de naproxeno y ácido salicílico***

La determinación de ácido salicílico y/o ácido acetilsalicílico tiene un notable interés, dada la importancia clínica y farmacológica que presenta dicho principio activo como así lo demuestran el gran número de trabajos aplicados a fluidos biológicos y fármacos que hacen uso de una gran variedad de técnicas analíticas, siendo esto indicativo del gran interés por encontrar un método que presente buena sensibilidad, selectividad y simplicidad para su determinación. En la bibliografía consultada destacan las técnicas espectrofotométricas [235] así como las técnicas basadas en la fluorescencia nativa del ácido salicílico [236-238]. También se ha empleado electroforesis capilar [239] y cromatografía de líquidos [240] para la determinación de ácido salicílico.

Las principales técnicas descritas para el análisis de naproxeno han sido cromatografía de líquidos, electroforesis capilar [241,242] y métodos basados en técnicas luminiscentes (fluorescencia [243,244], fosforescencia [245,246]).

Para la resolución y determinación de mezclas de ácido salicílico y naproxeno se han empleado una serie de estrategias basadas en fluorescencia molecular. Las derivadas (primera y segunda) del espectro sincrónico de fluorescencia [247,248] junto con calibración multivariante [249,250], empleando PLS [251] y el empleo de un soporte sólido para llevar a cabo la separación [252] han sido las principales técnicas descritas para la resolución de mezclas de naproxeno y ácido salicílico.

## II. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es el desarrollo y aplicación de nuevos enfoques y estrategias tendentes a incrementar la potencialidad, versatilidad, y aplicabilidad de los optosensores fluorimétricos basados en el empleo de soportes sensores comerciales (fundamentalmente de tipo hidrofóbico) ubicados en el interior de una célula de flujo convencional para fluorimetría. Se prestará especial atención al diseño de nuevas estrategias aplicables al desarrollo de sensores capaces de responder a más de un analito en una misma muestra (multisensores). Además, en aras de una mayor simplicidad, economía y respeto medioambiental, se pretende compatibilizar lo anterior con la necesidad de generar el mínimo volumen de residuos y el empleo del menor número posible de reactivos. De ahí que la mayor parte de los optosensores se diseñarán basándose en la medida de la fluorescencia intrínseca de los analitos, siempre que éstos exhiban dicha propiedad.

Por otra parte se pretende explorar la potencialidad de la implementación del principio de los optosensores con el de la multiconmutación, que aportará mayor automatización, reproducibilidad y menor consumo de reactivos y muestra, en concordancia con lo anteriormente apuntado.

Este trabajo, por tanto, pretende contribuir al desarrollo de sencillos métodos analíticos, aplicables a muestras reales en diversos campos (tales como control ambiental, industrial, alimentario, clínico), y que usando detección fluorimétrica, ofrezcan características analíticas atractivas en términos de sensibilidad, selectividad, reproducibilidad, etc. y a su vez resulten rápidos, económicos y versátiles.

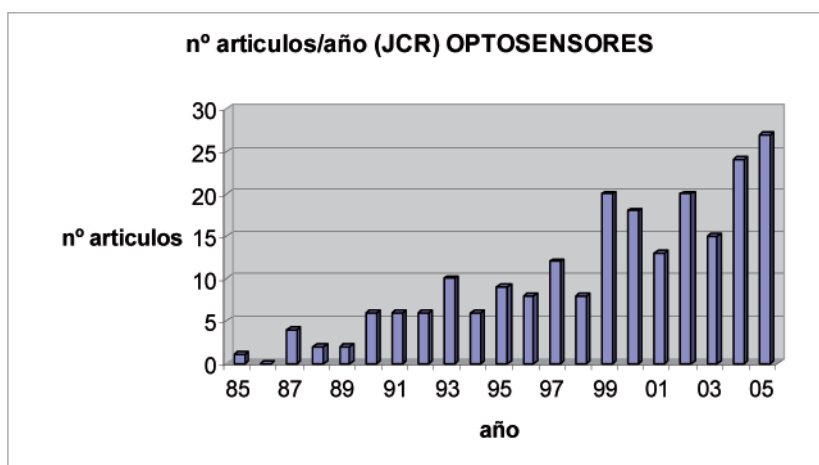
Parte del trabajo de esta Memoria se enmarca dentro de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, *«Aplicación de nuevas estrategias en el desarrollo de sensores espectroscópicos multiparámetro en flujo continuo»* (BQU-2002-02872; periodo de ejecución Noviembre 2002 – Abril 2006). El objetivo principal de dicho proyecto es el desarrollo y aplicación de nuevas estrategias y enfoques que permitan el desarrollo de sensores espectroscópicos en flujo continuo, que sean capaces de responder a más de un analito (sensores multiparámetro), y que permitan incrementar la potencialidad, versatilidad y aplicabilidad de este tipo

de sensores a diversos campos tales como: análisis de pesticidas, contaminantes orgánicos e inorgánicos, fármacos, compuestos de interés alimentario y compuestos de interés bioquímico

### III. Antecedentes

Los primeros optosensores en flujo descritos datan de mediados de los años ochenta. Estas primeras aplicaciones de los sistemas FIA-SPS estaban dirigidas a analitos inorgánicos [253,254]. Después fueron desarrollados sensores de este tipo para analitos orgánicos, mayoritariamente principios activos de fármacos [55]. Los primeros requerían una reacción derivatizadora, siendo los más sencillos aquellos sensores basados en la medida de una propiedad intrínseca del analito (absorbancia o fluorescencia), que evitan la necesidad de reacciones derivatizadoras.

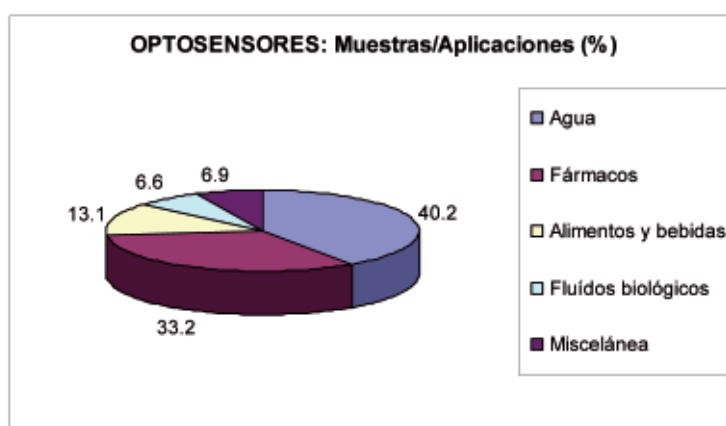
El desarrollo de optosensores en flujo es un área de investigación muy prometedora que conduce a métodos analíticos muy simples y baratos con características analíticas muy destacadas en relación con los respectivos métodos espectroscópicos convencionales (principalmente sensibilidad y selectividad). El creciente número de trabajos publicados en las últimas décadas sobre desarrollo y aplicaciones de este tipo de sensores en flujo es un claro índice de la vitalidad de esta área. Prueba del gran desarrollo de esta área de investigación es el número de publicaciones recientes de este tipo de sistemas. Más de 100 artículos de desarrollo de metodología y aplicaciones de optosensores en flujo continuo han sido publicados en los últimos 5 años (2001-2005). Esto ilustra la vitalidad de este campo de la Química Analítica. En la siguiente figura, se muestra el número de publicaciones dedicadas a optosensores en flujo en revistas JCR. Como se puede observar en la figura, cada vez se desarrollan más métodos basados en estos principios.



**Figura III.1.** Publicaciones de optosensores en flujo continuo en revistas incluidas en el «Journal Citation Report» en el periodo 1985-2005.

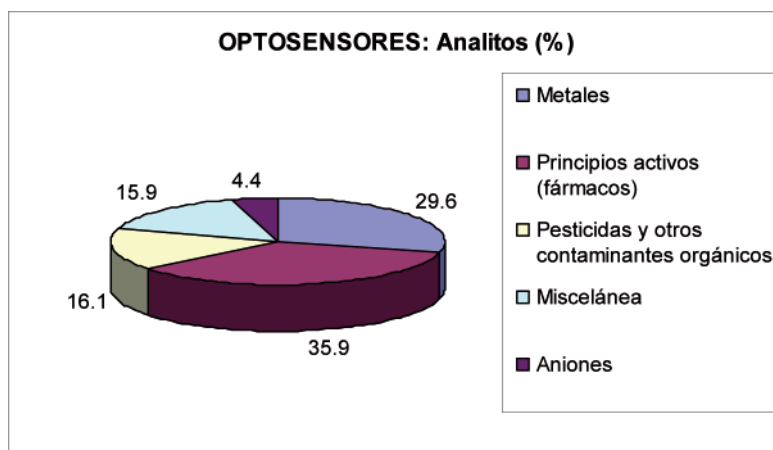
Otra prueba de la vitalidad de este campo es el número de equipos de investigación que se dedican a él. Entre los principales grupos están los de la Universidad de Oviedo (Sanz Medel y Díaz García), Universidad de Córdoba (Valcárcel), Universidad de Granada (Capitán-Vallvey y Fernández Gutiérrez), Universidad Federal de Bahía (Bahia, Brasil) (Teixeira), Palma de Mallorca (Cerdá), Universidad Shaanxi (Xian, China) (Zhang), Universidad Técnica de Viena (Lendl), Universidad Técnica de Berlin (Frenzel), Universidad Técnica de Dinamarca (Hansen), Universidad de Washington (Seattle, EE.UU) (Christian y Ruzicka), etc.

Como se muestra en la Figura III. 2, las aplicaciones descritas en los métodos basados en optosensores en flujo son muy diversas. Se han descrito aplicaciones en muestras medioambientales [255], alimentos [256] y bebidas [257], fármacos [258], fluidos biológicos [62], aleaciones [192], etc.



**Figura III.2.** Proporción (%) entre los distintos tipos de aplicaciones y muestras desarrolladas con los métodos basados en optosensores en flujo continuo.

Los principales analitos estudiados mediante este tipo de sistemas analíticos han sido: iones metálicos [259], principios activos de fármacos [260], pesticidas [261], contaminantes orgánicos [262], antibióticos [263], aniones [264], antioxidantes [265], ácidos orgánicos [73], colorantes [266], etc.

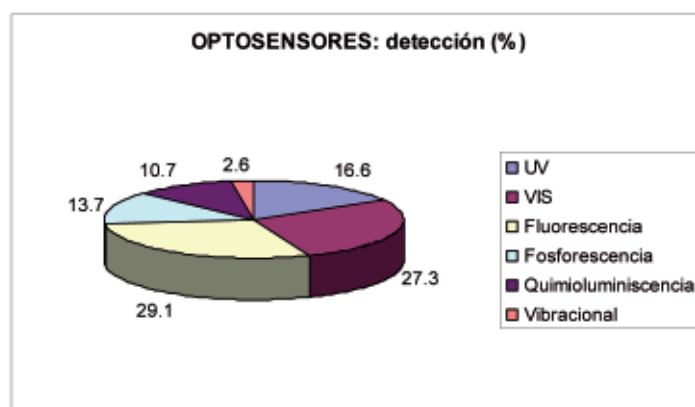


**Figura III.3.** Proporción (%) entre los distintos tipos de analitos de los métodos basados en optosensores en flujo continuo.

De los diferentes tipos de sensores en flujo que se encuentran descritos [267], los optosensores son objeto de investigación del Grupo de Investigación «Química Analítica de la Universidad de Jaén» (grupo FQM 323 del Plan Andaluz de Investigación). Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación de dicho Grupo sobre sensores espectroscópicos en flujo continuo. Cuando se inició la parte experimental de esta Tesis Doctoral se habían desarrollado en nuestro grupo principalmente sensores monoparámetro [268-271], es decir, aquellos que responden solo a un analito en cada inyección. Los métodos desarrollados eran principalmente para el análisis de principios activos de fármacos.

### Sistemas de detección empleados en el desarrollo de optosensores

En los optosensores en flujo continuo se han empleado distintas técnicas de detección. En la siguiente figura se muestran los resultados de una revisión efectuada para conocer la frecuencia de utilización de diversos detectores utilizados para el uso de optosensores en flujo. El periodo en el que se ha realizado la búsqueda comprende desde el año 1985 hasta diciembre de 2005. Se muestra el porcentaje de utilización de cada uno de las distintas detecciones que se han empleado.



**Figura III.4.** Proporción (%) entre los distintos tipos de detección empleados en los métodos basados en optosensores en flujo continuo.

La espectrofotometría de absorción molecular (UV-visible) es probablemente la técnica de detección más usada en los laboratorios analíticos. También es la técnica de detección más empleada en los optosensores en flujo. Aunque, la región UV es poco selectiva en análisis espectrofotométrico convencional, gracias al empleo de un soporte sólido activo en la zona de detección, ésta se incrementa notablemente, ya que se excluyen del área de detección las especies no retenidas en las condiciones de trabajo, permitiendo la utilización de la región UV en un buen número de sensores para análisis orgánico [55] con resultados plenamente satisfactorios.

La fluorescencia molecular sigue en importancia a la espectrofotometría como técnica de detección para sensores en flujo en cuanto al número de sensores desarrollados, permitiendo el desarrollo de optosensores que ofrecen alta sensibilidad, buena selectividad y excelentes límites de detección.

Los sensores espectroscópicos basados en fenómenos de fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) son más escasos [75,272], dadas las exigencias intrínsecas de esta técnica de detección. También debe mencionarse la escasez, de sensores quimioluminiscentes [69,273] y de los que emplean la espectroscopía vibracional [70, 76, 274,275] como técnica de detección.

### Desarrollo de optosensores multiparámetro

Los optosensores multiparámetro, también llamados «multisensores» son aquellos que permiten la detección de más de un analito. Su desarrollo es de mayor complejidad que el de los sensores monoparámetro. Una multi-determinación consiste en la determinación de dos o más analitos sobre una muestra, pudiendo

ser secuencial (varias inyecciones de muestra) o simultánea (una sola inyección). En el caso de una sola inyección se puede usar un detector que permita multi-detección simultánea (detector de diodo array) [276] o separar los analitos previamente a la detección, usando un soporte sólido adicional antes del detector [277]. Otros multisensores realizan determinaciones secuenciales de los analitos en los que, para cada determinación, se realizan tantas inyecciones de muestra como analitos se quieren determinar [278-281].

Hasta la fecha, el número de optosensores multiparámetro es bastante reducido [55]. Dentro de los optosensores multiparámetro simultáneos existen dos clases en función del tipo de estrategia empleada para llevar a cabo la discriminación entre analitos. Según se emplee o no una separación de los analitos previa a la determinación, los multisensores se pueden clasificar en:

#### **(1) «Multisensores» sin secuenciación temporal.**

Esta estrategia se emplea cuando los analitos no pueden separarse o diferenciarse mediante un dispositivo de separación en línea, antes de alcanzar la zona sensora. En este caso, el bolo de muestra avanza por la zona sensora haciéndose la adquisición espectral periódica a su paso por el detector. Se emplea un sistema de ecuaciones a partir de los datos registrados a distintas longitudes de onda o bien, calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Con esta estrategia han sido desarrollados recientemente varios métodos para la determinación de fármacos [282] y pesticidas [283].

El primero de este tipo de multisensores fue descrito por Fernández Band *et al* en 1990, y permitía la resolución de mezclas de aminos mediante la inyección de la muestra en una configuración monocanal, produciéndose la retención transitoria de los analitos sobre gel de sílice  $C_{18}$ , empaquetado en la célula de flujo de un detector diodo «array», que registra la absorbancia intrínseca de los mismos, a nueve longitudes de onda, en la zona entre 300-460 nm. La resolución del sistema de nueve ecuaciones generado a partir de medidas a nueve longitudes de onda permite la resolución de la mezcla [284].

En otros multisensores de este tipo puede o no tener lugar una reacción química, y se ha empleado detección fotométrica o fluorimétrica. La reacción puede tener lugar previamente a la retención-detección [285,286] o sobre la misma microzona sensora.

Estos sensores utilizan bien técnicas de calibración multivariante (PLS) [287] o bien el empleo de la primera o segunda derivada de los espectros de fluorescencia o bien de los espectros síncronicos de fluorescencia o combinando ambos principios [288-290]. En los últimos años se han desarrollado multisensores que utilizan técnicas fotométricas y fluorimétricas sin necesidad de reacciones derivatizadoras. Estos, generalmente, conllevan el tratamiento posterior de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). En este tipo de optosensores multiparámetro se aplicaba un tratamiento quimiométrico mediante regresión por PLS a los espectros UV adquiridos mediante un espectrofotómetro de diodo array, o a los espectros de emisión obtenidos con un espectrofluorímetro, mientras los analitos avanzan a través de la zona sensora con un comportamiento diferencial respecto a su cinética de retención-elución en dicha zona.

## **(2) «Multisensores» con secuenciación temporal.**

Esta modalidad se basa en la separación sucesiva en línea de los analitos: uno alcanza directamente el detector y desarrolla una señal transitoria, mientras la(s) otra(s) especie(s) son retenidas fuertemente en una precolumna. Después se hacen pasar sucesivamente un (o dos) eluyente(s) adicional(es) a través de la precolumna mediante el uso de una (dos) válvula(s) de selección. Cada uno de los análisis se eluye selectivamente con uno de los eluyentes y todos desarrollan una señal transitoria a partir de la medida de una propiedad intrínseca (absorbancia o fluorescencia). Obviamente, la optimización de la longitud de la columna es fundamental para conseguir la adecuada separación. Con esta estrategia, se han desarrollado varios optosensores en flujo para la determinación simultánea de fármacos [277,291,292] y también para pesticidas [293] usando detección UV y fluorescente respectivamente. Estos optosensores se basan en la diferencia de la cinética de retención de los analitos en un soporte sólido (precolumna) colocado antes de la célula de medida, con lo que la determinación de los analitos se realiza secuencialmente en el tiempo a partir de una única inyección de muestra.

## **Multiconmutación para el desarrollo de optosensores**

Las características fundamentales de los sistemas basados en multiconmutación han sido apuntadas en el Capítulo II de esta memoria. El empleo de multiconmutación para el desarrollo de métodos automáticos con detección en disolución mediante técnicas espectroscópicas está descrito en la literatura [41-43]. En cambio, el

desarrollo de optosensores en flujo empleando multiconmutación ha sido descrito en un trabajo de nuestro grupo en colaboración con el grupo del Prof. De la Guardia de la Universidad de Valencia [294]. En esta memoria, se ha continuado con esa línea de trabajo y se han desarrollado tres nuevos métodos basados en optosensores en flujo empleando multiconmutación.

### **Contribuciones de esta Memoria al campo de los Optosensores en flujo**

En esta Memoria se han desarrollado y aplicado nuevas estrategias y enfoques que han permitido nuevos diseños de sensores espectroscópicos en flujo continuo. Se han descrito nuevas estrategias en el desarrollo de métodos que fuesen capaces de responder a más de un analito (sensores multiparámetro). Los métodos que se han desarrollado mediante el uso de optosensores en flujo han permitido su aplicación directa a diversos campos tales como: análisis de pesticidas en alimentos, análisis de pesticidas en aguas superficiales, análisis de iones metálicos en agua de consumo humano y análisis de principios activos (fármacos) en productos farmacéuticos y fluidos biológicos.

Con respecto al desarrollo de optosensores multiparámetro, se han descrito dos estrategias en el empleo de dispositivos «on-line» basados en principios cromatográficos, con detección fluorescente. Una de ellas estaba basada en el uso de una «precolumna», empaquetada con el mismo soporte sólido empleado en la zona sensora (célula de flujo), que retiene temporalmente los analitos, permitiendo la discriminación y separación de los mismos, basada en la diferente interacción de cada analito con la precolumna. Esto permite la separación y llegada secuencial de los analitos a la zona de detección y su posterior medida. Con este dispositivo se ha desarrollado el sensor triparámetro para la determinación simultánea de tres pesticidas (benomilo, carbarilo y fuberidazol). Con una sola inserción de muestra, se analizan los tres compuestos, aunque su detección esté secuenciada en el tiempo.

La otra estrategia desarrollada en esta memoria es el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido en la cubeta de flujo para realizar la separación de las especies de interés. En este caso, la separación de los analitos se efectúa debido a la diferencia de comportamiento de los mismos (debido a la distinta polaridad) al interaccionar con el soporte sólido empleado ( $C_{18}$  sílica gel), pero esta vez la separación ocurre en la misma célula de flujo, justo por encima del área de detección. Para llevar a cabo esta separación con una cantidad adicional de soporte sólido es necesario que la diferencia de polaridad entre los analitos a separar sea muy elevada. Mediante el empleo de esta estrategia se han desarrollado tres sensores biparámetro:

dos para el análisis de mezclas de pesticidas (benomilo/ carbendazima y tiabendazol/ ortofenilfenol) y uno para el análisis de principios activos en fármacos (naproxeno/ ácido salicílico).

Además de estos cuatro optosensores multiparámetro, se han descrito otros cuatro optosensores monoparámetro para la determinación de pesticidas en frutas (tiabendazol en cítricos y difenilamina en peras y manzanas) y para el análisis de iones metálicos en agua de consumo humano (Cd (II) y Al (III)).

## IV. Discusión conjunta de resultados

En este apartado de la Memoria se resume el instrumental empleado, los estudios de puesta a punto y desarrollo de los optosensores propuestos y las aplicaciones y resultados más relevantes de los ocho métodos propuestos para la determinación de analitos de interés medioambiental, alimentario y farmacológico.

#### **IV.1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN**

##### **IV.1.1. Reactivos**

Para todos los experimentos realizados en esta Memoria se usaron reactivos de calidad "para análisis", disolventes puros y agua desionizada. Las disoluciones estándar de los analitos fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada en metanol, etanol o agua desionizada según las características concretas de cada analito.

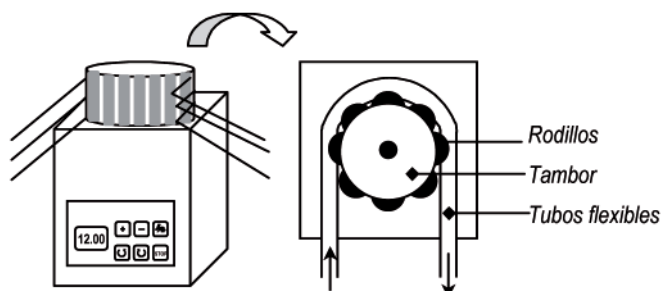
##### **IV.1.2. Instrumentación**

La instrumentación utilizada en los trabajos propuestos es la típica que se requiere para el desarrollo de métodos de análisis basados en sistemas de flujo continuo (FIA y multiconmutación):

- (a) Sistema de propulsión
- (b) Sistema de inserción de muestra y selección/manipulación de reactivos
- (c) Sistema de transporte (y reacción)
- (d) Sistema de detección

**(a) Sistema de propulsión**

En todos los métodos se empleó una bomba peristáltica de cuatro canales "Gilson Minipuls 3" (Villiers Le Bel (Francia)), que consta de un tambor y una serie de rodillos que comprimen unos tubos flexibles a través de los cuales circula el flujo del sistema. Esta bomba tiene control de velocidad para seleccionar el flujo de los canales y proporciona un flujo libre de pulsos.



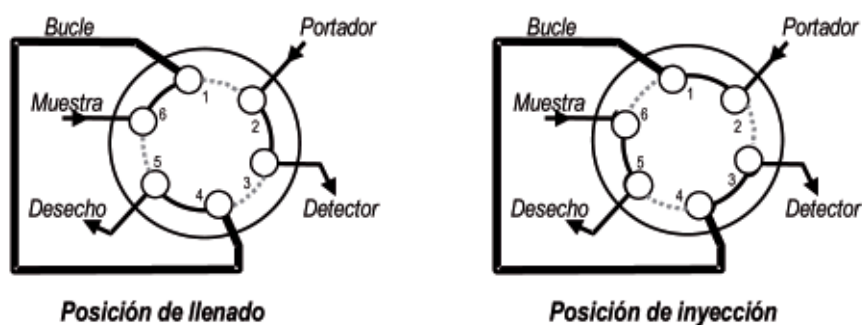
**Figura IV.1.** Esquema de una bomba peristáltica; detalle del tambor con los rodillos

**(b) Sistemas de inserción de muestra y selección/manipulación de reactivos**

En este caso, dependiendo de que el sistema de flujo continuo empleado fuese FIA convencional o "multiconmutado", se utilizan elementos diferentes:

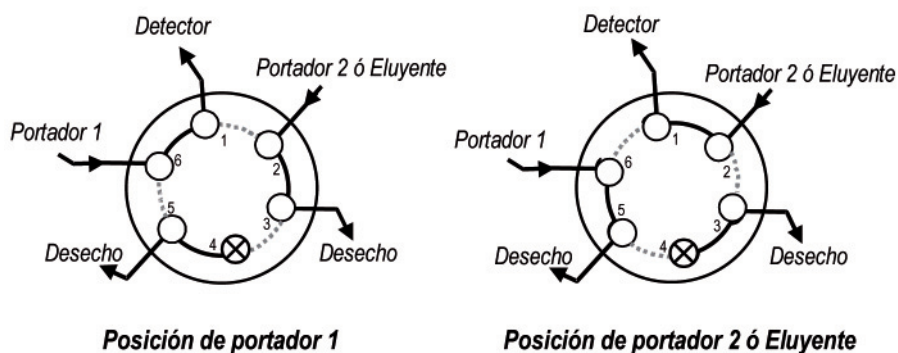
Para el montaje de los sistemas de flujo continuo FIA convencionales se usaron válvulas rotatorias de seis vías "Rheodyne 50" (Cotati, EE.UU) (5041 y 5020). Las válvulas van conectadas de diferente forma según actúen como sistema de inserción de muestra o permitiendo la selección entre dos disoluciones (portador y eluyente).

La válvula de inyección tiene dos posiciones, llenado e inyección. En la primera se llena el bucle de muestra y en la segunda posición lo inserta en el seno de la corriente de portador.



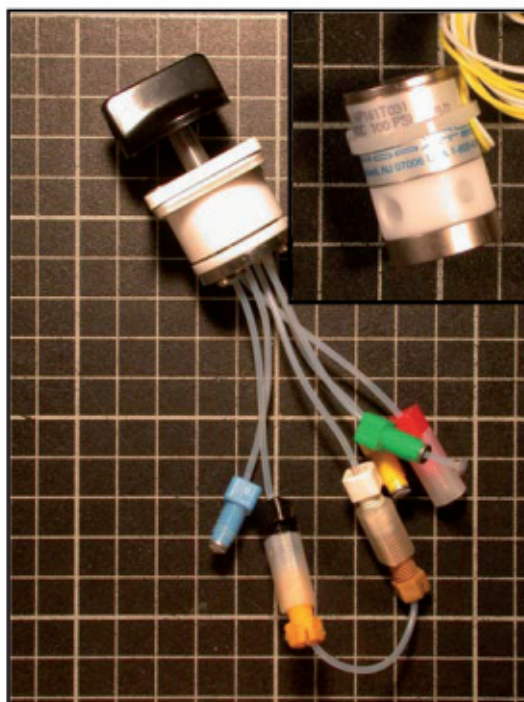
**Figura IV.2.** Esquema de una válvula rotatoria de seis vías conectada como válvula de inyección

La válvula rotatoria conectada como válvula de selección permite elegir generalmente entre las corrientes de portador y eluyente.



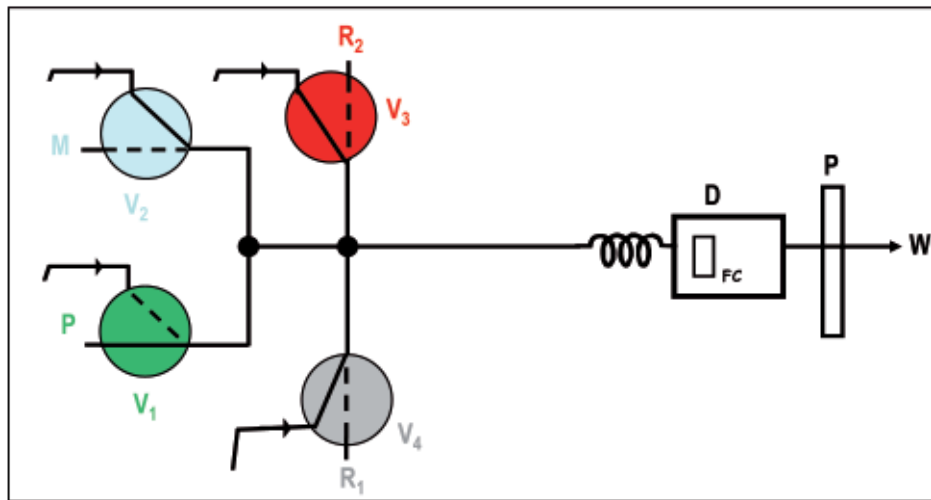
**Figura IV.3.** Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de selección

En el caso de los sistemas basados en "multiconmutación", la inserción de muestra y manipulación de reactivos se lleva a cabo mediante el empleo de válvulas solenoide de tres vías (Neptune Research HP161T031 Standard 3w), que están conectadas de forma apropiada para llevar a cabo las distintas etapas (inserción de muestra, elución de la especie de interés, re-acondicionamiento de la zona sensora, etc) establecidas en el método. En la figura siguiente (Figura IV.4) se puede observar una fotografía de una válvula solenoide de tres vías y la comparación de tamaño con respecto a una válvula rotatoria de seis vías.



**Figura IV.4.** Fotografía de una válvula rotaria de seis vías y de una válvula solenoide.

Estas válvulas de tres vías, tienen una entrada y dos salidas, como se puede observar en la Figura IV.5. Pueden presentar dos posiciones: "ON" y "OFF". En la Figura IV.5 se puede observar un esquema de un montaje típico de válvulas de multiconmutación. Las válvulas se controlan mediante el software a través de una interfase RS232 vía puerto paralelo. Dicha interfase permite el control de hasta 8 válvulas, merced a un circuito integrado ULN 2803. La corriente de alimentación de cada válvula (100 mA) es proporcionada por una pequeña fuente de alimentación de corriente continua de 12 V. y 1 A.



**Figura IV.5.** Esquema típico de un montaje de multiconmutación. La línea continua en el interior de cada válvula corresponde a la posición "OFF". Al activar la válvula (posición "ON"), el fluido de entrada es conducido a través de la línea discontinua.

El ciclo de apertura y cierre de las válvulas solenoide que se emplean en cada sistema es programado a través de un software elaborado por nuestro grupo de investigación en colaboración con D. Javier Molina Magaña. En la siguiente figura se observa el tipo de entrada de datos que se requiere en este software.

**Nueva programación**

Abrir válvula  a los  segundos y mantenerla abierta  segundos

| Apertura | Válvula | Duración |
|----------|---------|----------|
| 0.0      | 1       | 80.0     |
| 0.0      | 3       | 80.0     |
| 220.0    | 1       | 60.0     |
| 220.0    | 4       | 60.0     |

**Transcurso del tiempo...**

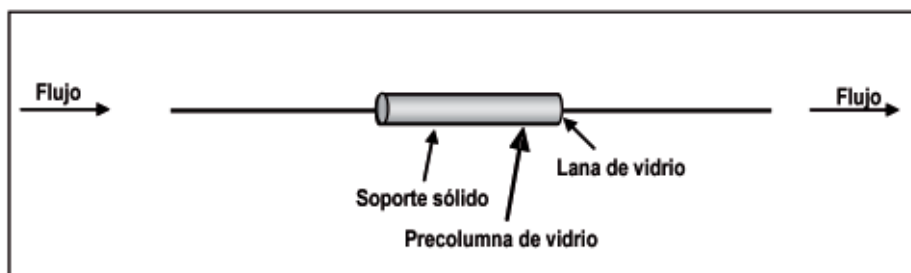
Tiempo transcurrido: **00:00**      Tiempo restante: **04:40**

**Figura IV.6.** Interfaz de usuario utilizado para controlar la apertura y cierre de las válvulas solenoide.

### **(c) Sistema de transporte (separación/reacción)**

En todas las configuraciones se usaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno como sistema de transporte. Las uniones se realizaron con conectores tipo OMNIFIT. Los tubos de bomba de silicona utilizados son de dos tipos, dependiendo del tipo de disolución portadora empleada. En los casos en los que los portadores eran disoluciones acuosas, se utilizaron tubos (Kendall) de diámetro interno 0.051 pulgadas. En cambio, cuando se emplearon disolventes orgánicos (metanol) como portador se utilizaron tubos de teflón (Elkay) de mismo diámetro interno. Al igual que en el sistema de transporte, cuando se ha requerido el empleo de un reactor, éste se ha preparado con tubo de teflón de 0.8 mm de diámetro enrollado en forma helicoidal.

En el sensor para la determinación de una mezcla de tres pesticidas (benomilo, carbarilo y fuberidazol) se empleó una precolumna empaquetada con un soporte sólido, que permitiese la separación de los tres analitos en función de su cinética de retención/elución. Es una columna de vidrio, de 1.5 mm de diámetro interno y 5 cm de longitud, rellena de 55 mg de soporte sólido para llevar a cabo la separación ( $C_{18}$  silica gel).



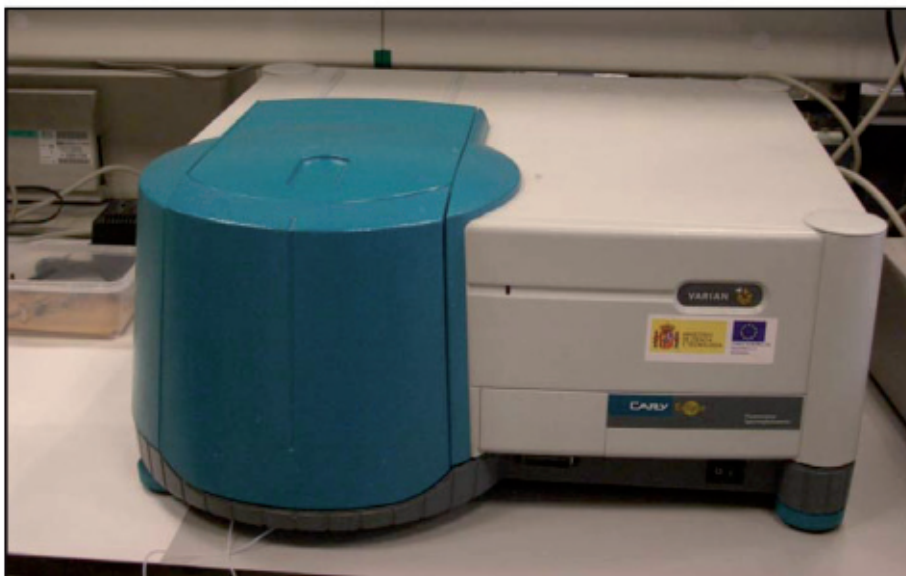
**Figura IV.7.** Esquema de una precolumna para la separación de mezclas de analitos

#### **(d) Sistema de detección**

Los ocho sensores de esta Memoria utilizan detección espectrofluorimétrica. La cubeta empleada fue una célula de flujo "Hellma 176.052-QS" para espectrofluorimetría. Estas cubetas se colocan dentro del compartimento de medida del sistema de detección correspondiente. Las características de esta célula se describen más adelante (Capítulo V, apartado 4).

Para todos los optosensores fluorescentes se empleó un espectrofluorímetro "Varian Eclipse" (Mulgrave, Australia) con lámpara de descarga de Xenón de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner, tubo fotomultiplicador R-928. El equipo estaba controlado mediante software "Cary Eclipse" para sistemas Windows 95/98/NT. El espectrofluorímetro empleado se caracteriza por poseer una velocidad de barrido espectral muy elevada (hasta  $24000 \text{ nm min}^{-1}$ ). Esto permite llevar a cabo medidas de fluorescencia con gran rapidez, e incluso monitorizar hasta 5 pares de longitudes de onda de excitación/emisión de forma "cuasi" simultánea, en el modo "multi- $\lambda$ ". Para la adquisición de espectros en disolución y fase sólida se empleó una velocidad de barrido de  $240 \text{ nm min}^{-1}$ .

En la Figura IV.8, se puede observar una fotografía del Espectrómetro de Luminiscencia empleado.



**Figura IV.8.** Fotografía del Espectrofluorímetro empleado para llevar a cabo las medidas de fluorescencia de los métodos desarrollados en esta Memoria.

## **IV.2. ESTUDIOS PRELIMINARES.**

### **IV.2.1. Características espectrales**

Para comenzar el desarrollo de cada sensor es necesario estudiar las características espectrales de los analitos o de los productos de reacción a los que se debe la señal analítica. Se realizaron los espectros de luminiscencia en disolución y en fase sólida, para estudiar las condiciones más adecuadas para la detección de las especies de interés tanto para los sensores monoparámetro como para los multiparámetro. Para estudiar el espectro de fluorescencia en fase sólida, en un sistema de flujo continuo se inserta la muestra conteniendo el analito, y una vez que la señal de fluorescencia de éste es máxima, se detiene el sistema de flujo (modo "stopped-flow") para poder registrar los espectros tanto de excitación como de emisión.

#### ***IV.2.1.1. Sensores multiparámetro para la determinación de pesticidas***

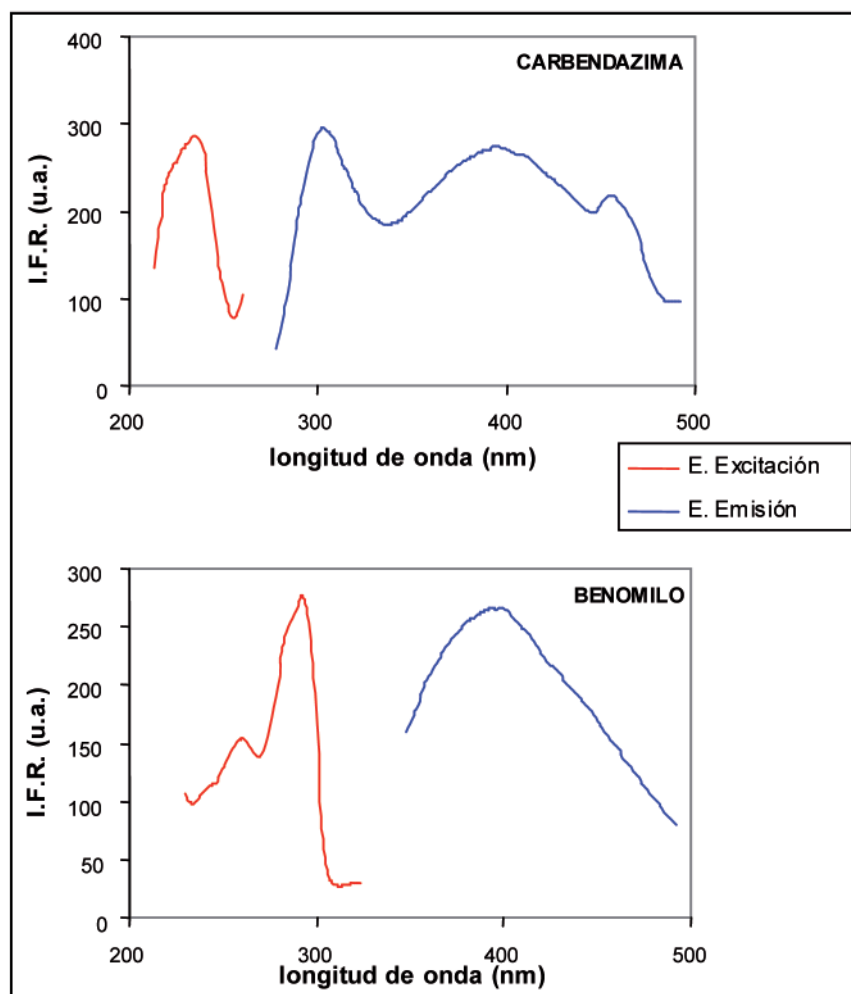
Se desarrollaron tres sensores multiparámetro para la determinación de los pesticidas: benomilo, carbendazima, tiabendazol, orto-fenilfenol, carbarilo y fuberidazole. En todos los casos el método desarrollado estaba basado en la medida de la señal de fluorescencia nativa de cada uno de los compuestos estudiados, por lo que se procedió al estudio y caracterización de los espectros de excitación y emisión de cada uno de los analitos estudiados.

#### IV.2.1.1.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE BENOMILO Y CARBENDAZIMA

Para la puesta a punto del optosensor en flujo para la determinación simultánea de benomilo y carbendazima se registraron los espectros de excitación y de emisión, tanto en disolución como en fase sólida en medio ácido, empleando una disolución acuosa de HCl 1.5 M para evitar la degradación del benomilo, ya que este compuesto es inestable en medios con pH mayores de 1 y en disolventes orgánicos. En estas condiciones, el benomilo, permanecía intacto sin descomponer en carbendazima, su producto de degradación mayoritario. La discusión de la estabilidad del benomilo se realiza en el apartado IV.5.1.

En estas condiciones las longitudes de onda de excitación y emisión máximas en disolución acuosa para el benomilo fueron 280 y 400 nm (hombro) respectivamente. Para el caso de la carbendazima, fueron 228 y 306 nm respectivamente.

Debido a la anchura de las bandas de los espectros de fluorescencia de ambos compuestos, hay un solapamiento de los mismos. En concreto, la banda de emisión de la carbendazima está completamente solapada con la banda del espectro de excitación del benomilo, por lo que no se puede realizar la determinación simultánea de una mezcla de ambos compuestos sin que sus señales interfieran mutuamente, mediante medidas de fluorescencia puntuales. Si midiésemos la fluorescencia de la carbendazima en presencia de benomilo, parte de la radiación emitida por la carbendazima sería absorbida como radiación de excitación por el benomilo. Los espectros también se registraron en fase sólida ( $C_{18}$  silica gel), en modo "stopped-flow", usando disoluciones portadoras de MeOH 15 % (v/v) y 65 % para la carbendazima y el benomilo respectivamente. En este caso, las longitudes de onda de excitación y emisión para el benomilo y la carbendazima fueron 293/398 nm y 235/206 nm respectivamente. Comparando la posición de los espectros de excitación y de emisión en disolución y en fase sólida se observan ligeras diferencias en la posición de las longitudes de onda tanto de excitación como de emisión correspondientes a los máximos. Este hecho puede atribuirse a la diferencia en el ambiente químico que rodea a los analitos cuando están fijos en el soporte sólido en relación a cuando están en disolución.



**Figura IV.9.** Espectros de fluorescencia de excitación y emisión en fase sólida ( $C_{18}$  silicagel) obtenidos para el benomilo y la carbendazima.

El aumento de sensibilidad que se produce al pasar de espectrofluorimetría convencional a espectrofluorimetría en fase sólida, es del orden de unas 40 veces para el caso del benomilo y unas 15 veces para la carbendazima. Esto se debe a la preconcentración de los analitos en el soporte sensor. Ésta preconcentración es aún más efectiva en el caso del benomilo con respecto a la carbendazima debido probablemente a la diferente polaridad. Al ser más apolar, el benomilo se retiene y concentra en el soporte sólido ( $C_{18}$  silica gel) de forma más eficiente. Para el desarrollo del método se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión que proporcionan un máximo en la intensidad de fluorescencia relativa en fase sólida (235/306 nm y 293/398 nm para la carbendazima y el benomilo respectivamente) con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible. El equipo que se empleó permitía la adquisición de la señal fluorescente a múltiples longitudes de excitación y emisión por lo que se pudieron registrar simultáneamente las señales

correspondientes a las parejas de longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y emisión para cada analito.

#### IV.2.1.1.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL Y ORTOFENILFENOL

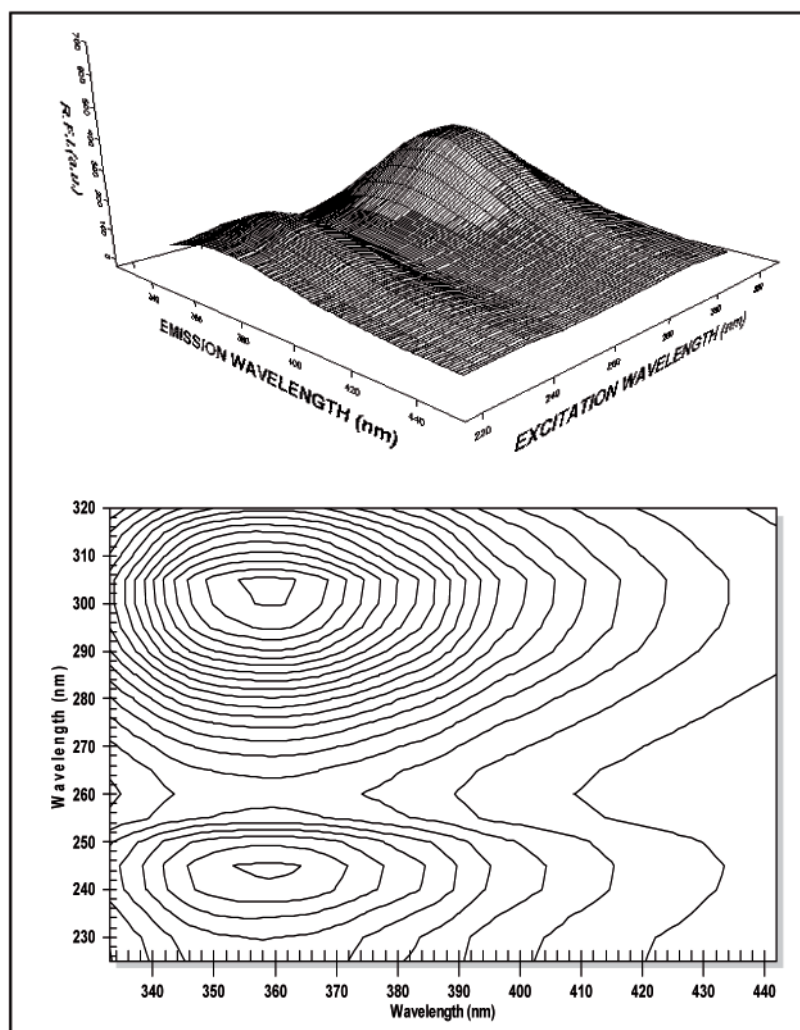
El segundo sensor biparámetro con detección espectrofluorimétrica permite la determinación simultánea (mediante una única inserción de muestra) de dos fungicidas post-cosecha: el tiabendazol y el ortofenilfenol.

Se registraron los espectros de fluorescencia tanto de excitación como de emisión para el tiabendazol y el ortofenilfenol. Para el tiabendazol, las longitudes de onda de excitación y emisión máximas en disolución acuosa fueron 301 y 360 nm respectivamente. Para el ortofenilfenol, las  $\lambda_{exc}/\lambda_{em}$  fueron 250 y 345 nm respectivamente.

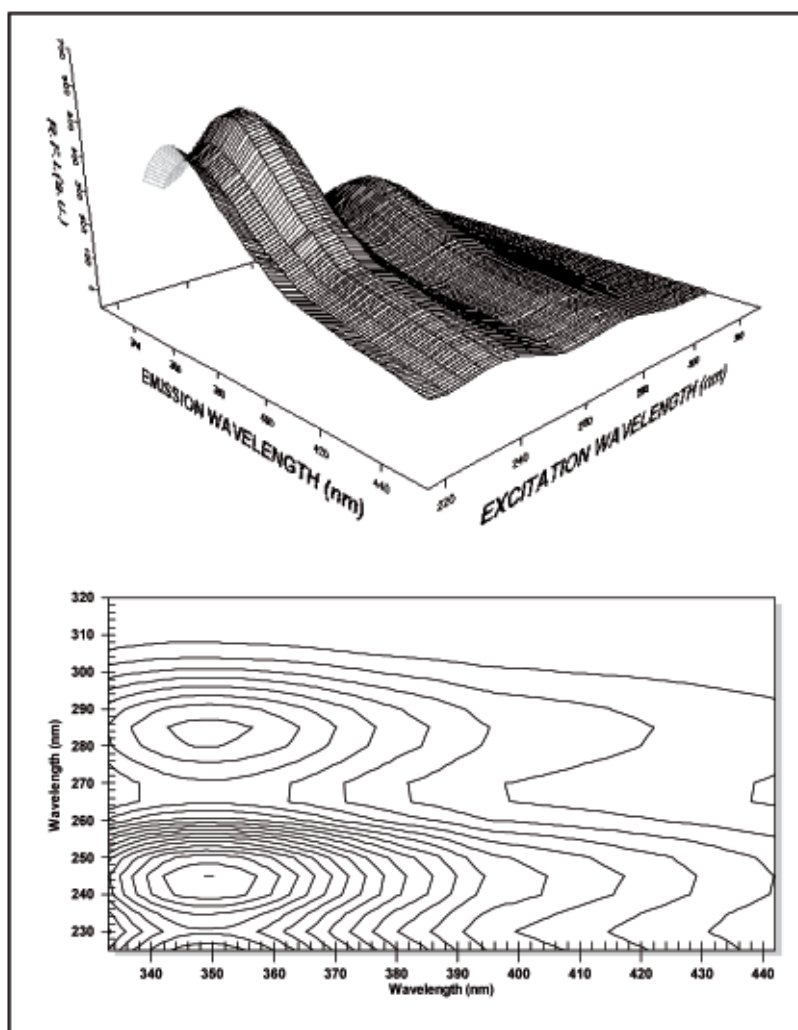
Los espectros también se registraron en fase sólida ( $C_{18}$  silica gel), en modo "stopped-flow", usando disoluciones portadoras de MeOH 20 % (v/v) y 50 % para el tiabendazol y el ortofenilfenol respectivamente. En este caso, los máximos de excitación y emisión para el tiabendazol y el ortofenilfenol fueron 305/358 nm y 250/345 nm respectivamente.

Comparando la posición de los máximos de los espectros de excitación y de emisión en disolución y en fase sólida, en este caso también se observan ligeras variaciones en las longitudes de onda para los dos compuestos.

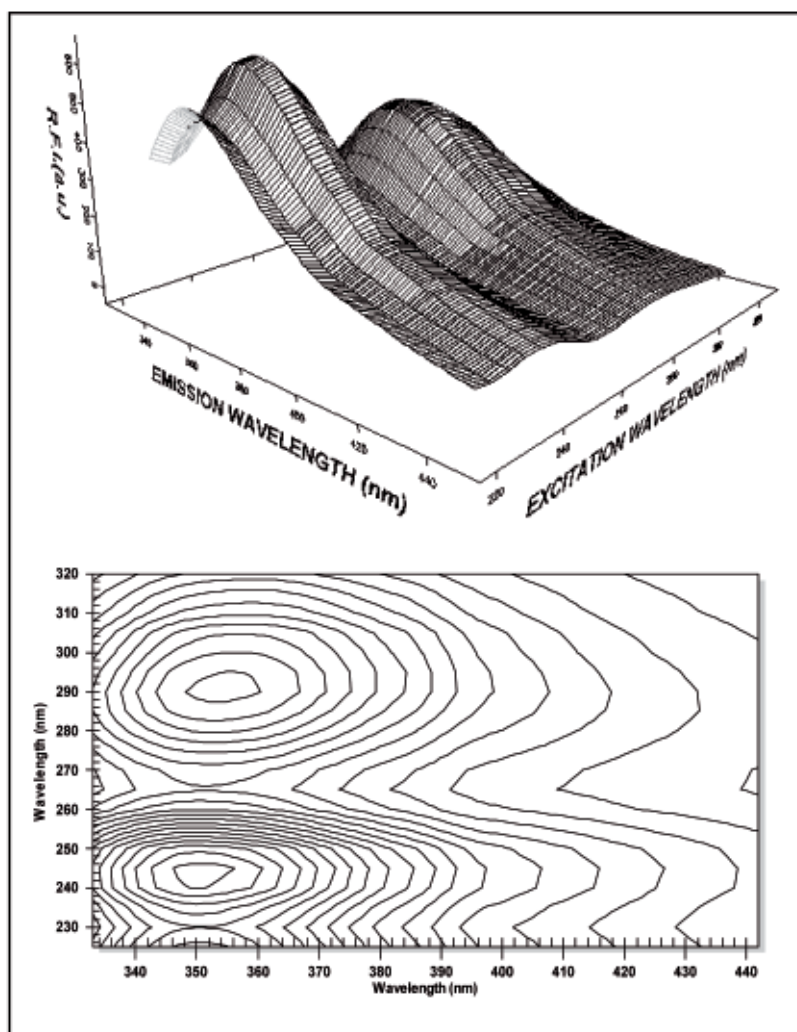
Debido a la anchura de las bandas de los espectros de fluorescencia de ambos compuestos, hay un solapamiento de los mismos. Esto se puede observar en las figuras IV.10, IV.11 y IV.12, donde se muestran los espectros tridimensionales de luminiscencia total para el tiabendazol, el ortofenilfenol y la mezcla de ambos, junto con los mapas de contorno en los tres casos. Por este motivo, no se podría llevar a cabo la determinación simultánea de una mezcla de ambos compuestos mediante espectrofluorimetría convencional sin que sus señales interfiriesen.



**Figura IV.10.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno del tiabendazol.



**Figura IV.11.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno del ortofenilfenol.



**Figura IV.12.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno de la mezcla de tiabendazol y o-fenilfenol.

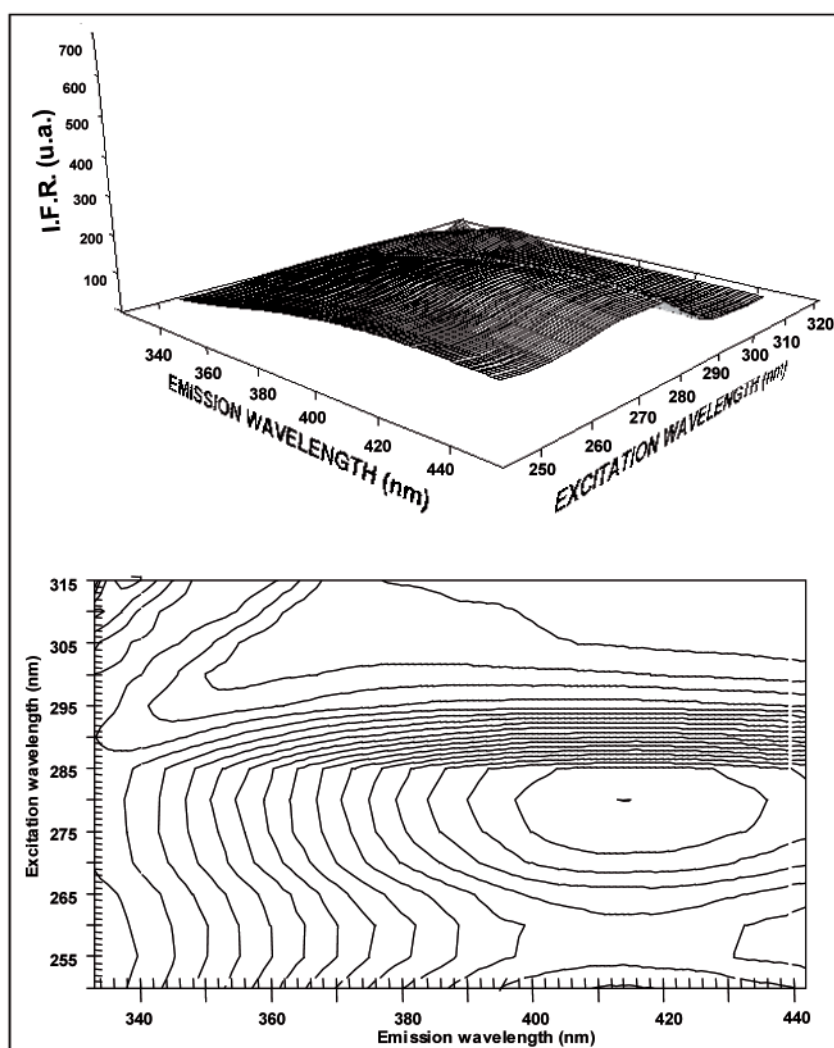
El aumento de sensibilidad que se produce al pasar de espectrofluorimetría convencional a espectrofluorimetría en fase sólida es del orden de unas 25 veces para el tiabendazol y unas 15 veces para ortofenilfenol. Esto se debe a la preconcentración de los analitos en la propia zona de detección. Para el desarrollo del método se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión que proporcionan un máximo en la intensidad de fluorescencia relativa en fase sólida (305/358 nm y 250/345 nm para tiabendazol y ortofenilfenol respectivamente) y se empleó el modo de adquisición "multi- $\lambda$ ".

#### IV.2.1.1.3. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FUBERIDAZOL, CARBARILO Y BENOMILO

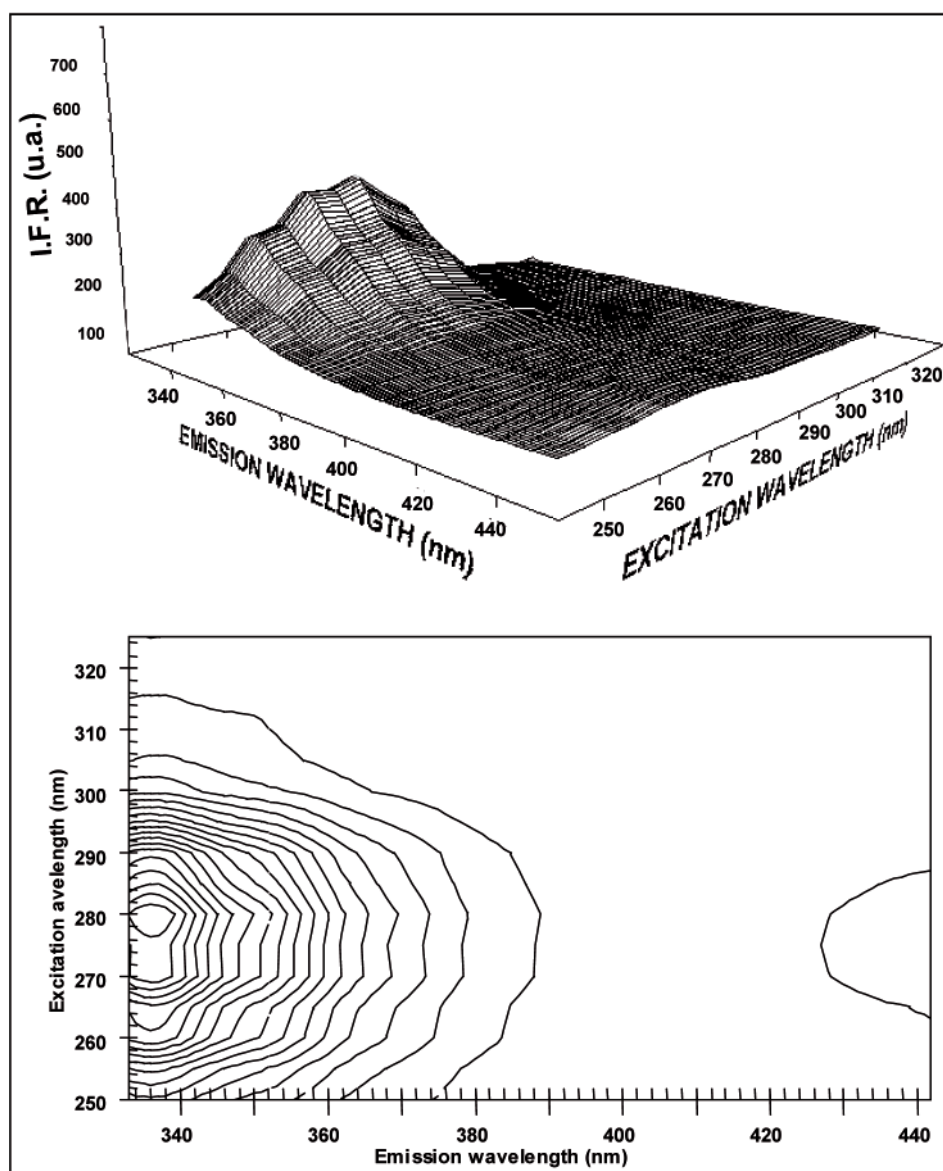
El método para la determinación de fuberidazol, carbarilo y benomilo está basado en la separación de los tres compuestos mediante el empleo de una precolumna "on-line" situada justo antes de la célula de flujo. Los compuestos se separan debido a la diferencia de polaridad, al interaccionar con el soporte sólido. De esta forma se consigue la discriminación, ya que la medida simultánea de los tres pesticidas no se podría llevar a cabo mediante medidas puntuales de fluorescencia debido al solapamiento de los espectros.

Los espectros de fluorescencia tanto de excitación como de emisión obtenidos para el carbarilo, benomilo y fuberidazol fueron estudiados en medio ácido, para que el benomilo no se degradase. En estas condiciones las longitudes de onda correspondientes a los máximos de excitación y emisión en disolución acuosa (HCl 1.5 M) para el benomilo fueron 280 y 400-410 nm (hombro) respectivamente. Para el caso del carbarilo, las respectivas longitudes de onda de excitación y emisión fueron 282 y 335 nm. Para el fuberidazole los máximos de excitación y emisión se encontraron a 314 y 356 nm. En las figuras IV.13, IV.14, IV.15 y IV.16, se muestran los espectros tridimensionales de fluorescencia junto con los mapas de contorno para el benomilo, carbarilo, fuberidazol y la mezcla de los tres. Estas figuras muestran el solapamiento de los espectros de estos compuestos, lo que impediría llevar a cabo la determinación simultánea de mezclas de estos compuestos mediante espectrofluorimetría convencional sin que sus señales interfiriesen.

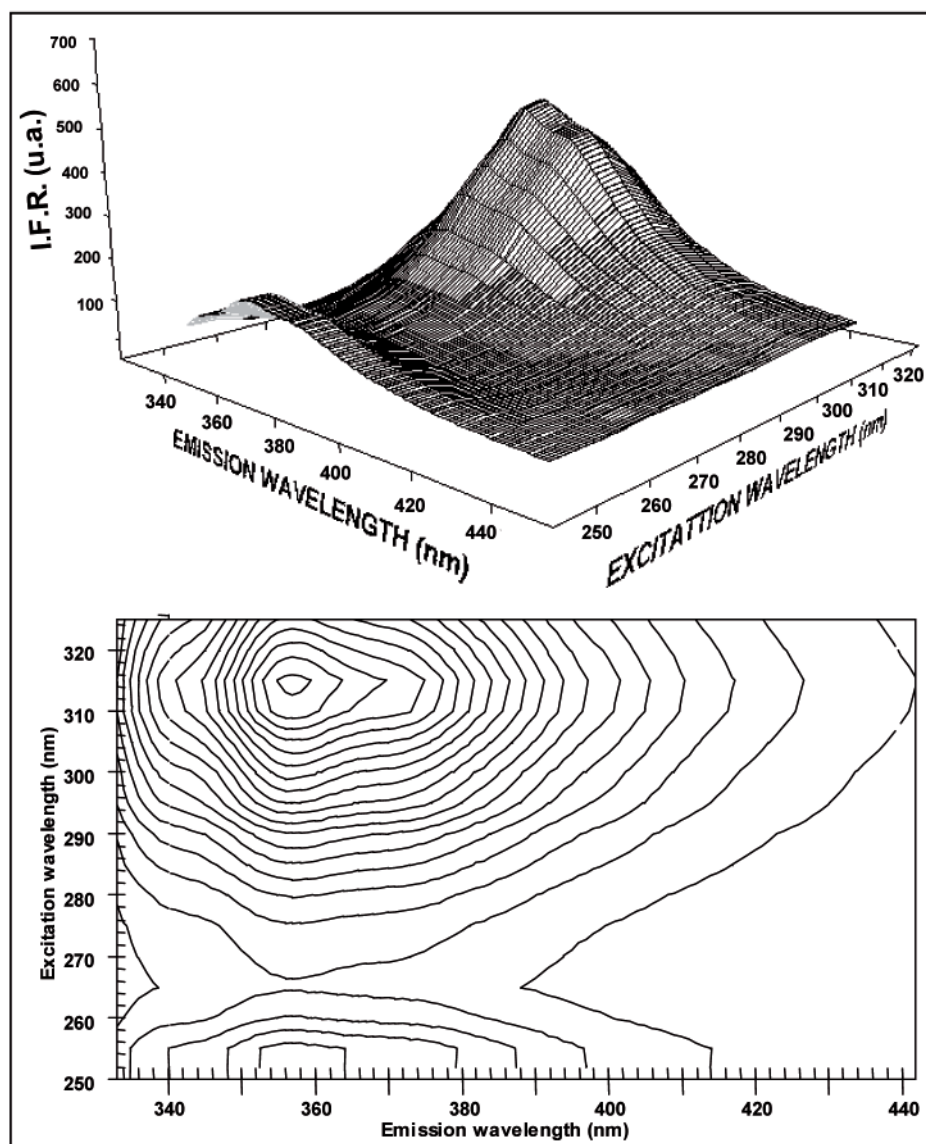
Los espectros de fluorescencia también se registraron en fase sólida ( $C_{18}$  silica gel), en modo "stopped-flow", usando disoluciones portadoras de MeOH 30 % (v/v), 55 % y 75 % para el fuberidazol, carbarilo y benomilo respectivamente. En este caso, las longitudes de onda de excitación y emisión fueron de 314/356 nm, 281/336 nm y 293/398 nm respectivamente.



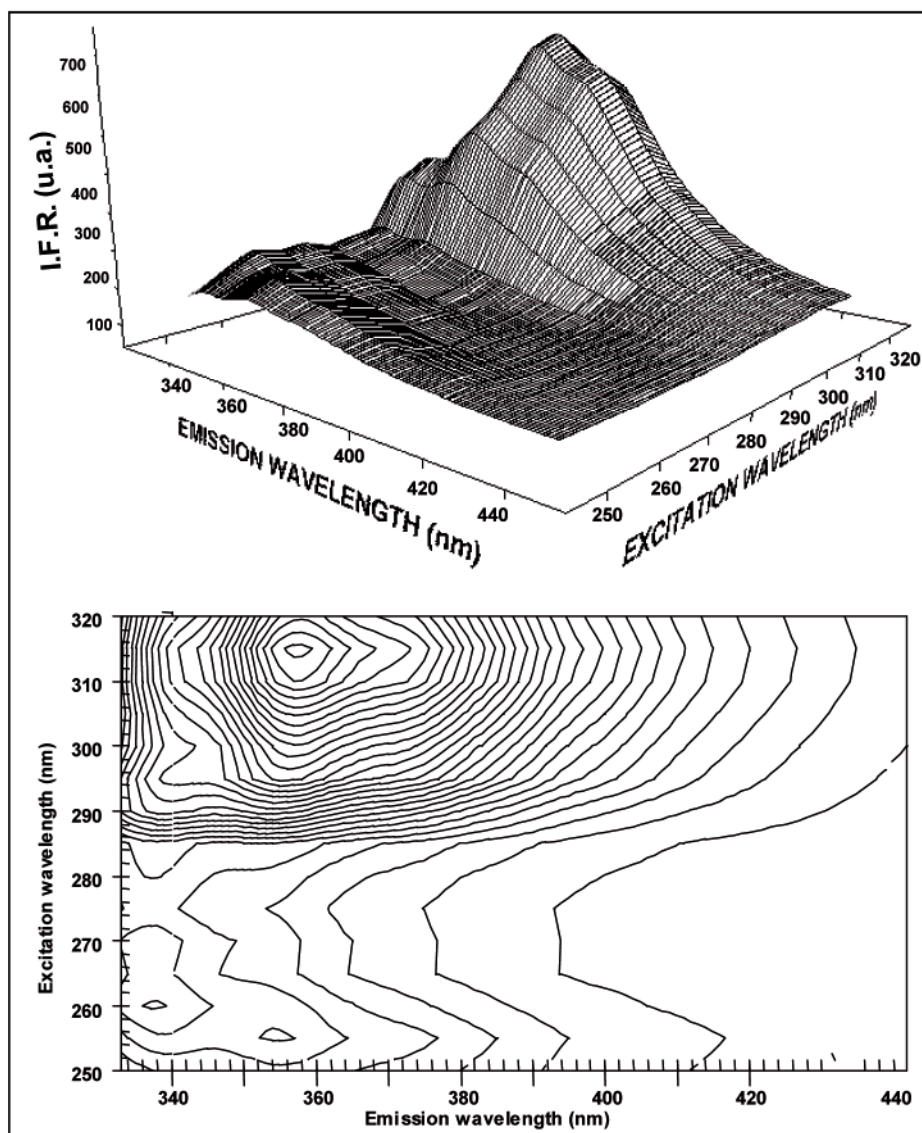
**Figura IV.13.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno del benomilo.



**Figura IV.14.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno del carbarilo.



**Figura IV.15.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno del fuberidazol.

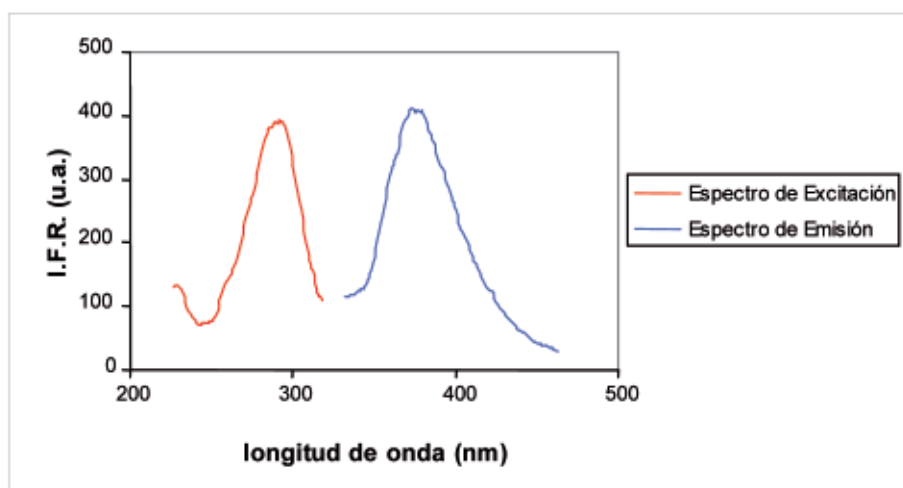


**Figura IV.16.** Espectro tridimensional de luminiscencia total en disolución acuosa y mapa de contorno de la mezcla benomilo, carbarilo y fuberidazol.

Para el desarrollo del método triparámetro se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión que proporcionan un máximo en la intensidad de fluorescencia relativa en fase sólida (314/356, 281/336 y 293/398 nm para fuberidazol, el carbarilo y benomilo respectivamente) con el fin de obtener la mayor sensibilidad posible. En este caso, también se empleó el modo de adquisición "multiwavelength". El equipo que se empleó permitía registrar la señal fluorescente a estos tres pares de longitudes de onda de excitación y emisión de forma prácticamente simultánea, por lo que se pudieron realizar las determinaciones midiendo en los máximos de excitación y emisión para cada analito.

#### **IV.2.1.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios para tratamiento post-cosecha.**

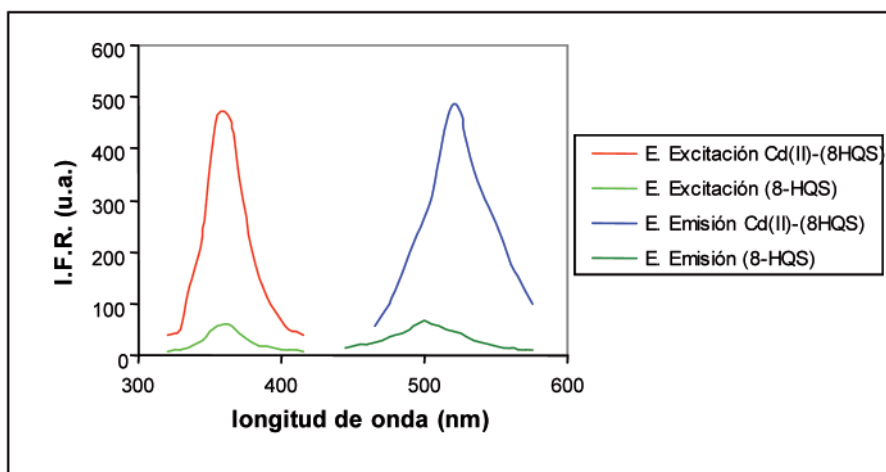
Las longitudes de onda de excitación y emisión para el tiabendazol seleccionadas fueron las mismas que las empleadas en el optosensor biparámetro para la determinación de tiabendazol y o-fenilfenol (305/358 nm). Para el caso de la difenilamina, las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión en disolución fueron 281 y 394 nm, mientras que en fase sólida ( $C_{18}$  silica gel) fueron 291 y 372 nm respectivamente (Figura IV.17). Estas fueron las longitudes de onda seleccionadas para estudios posteriores.



**Figura IV.17.** Espectros de excitación y emisión fluorescente en fase sólida de la difenilamina.

#### **IV.2.1.3. Optosensores para la determinación de metales**

Se han desarrollado dos optosensores monoparámetro con detección fluorescente para la determinación de metales (Cd (II) y Al (III)). Los dos métodos están basados en la formación de complejos con reactivos fluorogénicos. Se procedió por tanto al estudio de las características espectrales tanto de los productos de reacción como de los ligandos sin complejar, tanto en disolución acuosa como en el soporte sólido seleccionado. Para el caso del Al(III), las longitudes de onda de excitación y emisión para el ácido cromotrópico tanto en fase sólida como en disolución acuosa fueron 347 y 374 nm respectivamente. Las longitudes de onda de excitación y emisión del complejo Al(III)- ácido cromotrópico fueron 361 y 390 nm respectivamente tanto en disolución acuosa como en fase sólida. Éstas fueron las longitudes de onda seleccionadas para desarrollar el método para el Al(III).



**Figura IV.18.** Espectros de excitación y emisión fluorescente en fase sólida del reactivo fluorogénico ácido 8-hidroxiquinolin-5 sulfónico ((8-HQS) y del quelato Cd (II)-(8-HQS).

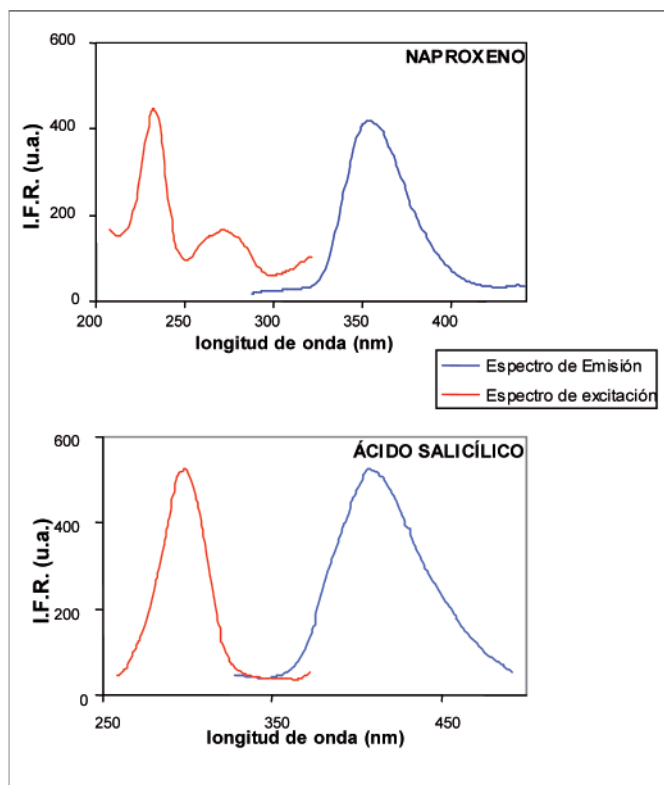
Para el método del Cd(II), las longitudes de onda de los máximos de excitación y emisión del reactivo fluorogénico seleccionado (8-HQS) tanto en fase sólida como en disolución acuosa fueron 360 y 500 nm respectivamente. Las del complejo Cd(II)- 8-HQS fueron 360 y 520 nm respectivamente tanto en disolución acuosa como en fase sólida. Éstas fueron las longitudes de onda seleccionadas para desarrollar el método.

#### **IV.2.1.4. Optosensor biparámetro para la determinación de fármacos.**

Este optosensor biparámetro con detección espectrofluorimétrica permite la determinación simultánea (mediante una única inserción de muestra) de dos analgésicos (naproxeno y ácido salicílico).

Se registraron los espectros de fluorescencia tanto de excitación como de emisión para el ácido salicílico y el naproxeno. En el caso del ácido salicílico, los máximos se presentaban a 297 nm (excitación) y 407 nm (emisión), mientras que para el naproxeno se encontraban a 230 nm y 356 nm respectivamente.

Los espectros también se registraron en fase sólida ( $C_{18}$  silica gel), en modo "stopped-flow". Los máximos de excitación y emisión para el ácido salicílico fueron 299 y 407 nm para ácido salicílico y 233 y 354 nm para el naproxeno. Para el desarrollo del método se seleccionaron las longitudes de onda de excitación y de emisión que proporcionan un máximo en la intensidad de fluorescencia relativa en fase sólida (299/407 nm y 233/354 nm para ácido salicílico y naproxeno respectivamente) y se empleó el modo de adquisición "multi- $\lambda$ ".



**Figura IV.19.** Espectros de excitación y emisión fluorescente en fase sólida del ácido salicílico y del naproxeno.

#### IV.2.2. Variables instrumentales

Debido a que las medidas se llevan a cabo sobre una fase sólida, el nivel de ruido de fondo que presentan las señales de fluorescencia es más elevado que en disolución. Por este motivo, es especialmente importante seleccionar unas variables instrumentales que permitan que las especies de interés puedan ser medidas en un amplio rango de concentración, y que a su vez, éstas concentraciones sean lo más bajas posibles.

Para poder cumplir este objetivo, se suelen estudiar dos variables instrumentales: la anchura de rendijas tanto de excitación como de emisión, y el voltaje de detector (tubo fotomultiplicador). Los valores posibles de voltaje del detector oscilan entre 600 y 1000 V, aunque valores superiores a 800 V, dan una señal de línea base del soporte sólido muy elevada, que impide que puedan medirse los compuestos en un amplio rango de concentraciones. Por otra parte, para aumentar la selectividad de la señal fluorescente que se registra, se suele optar por una anchura de la rendija de excitación ( $R_{exc}$ ) pequeña (típicamente 5 nm, aunque el equipo usado permite

una anchura de hasta 20 nm), para que sólo sea excitada la especie de interés. En el caso de la anchura de la rendija de emisión ( $R_{em}$ ), se suele optar por valores mayores, con el fin de recoger la mayor señal de fluorescencia posible.

#### IV.2.1.1. Anchura de rendijas de excitación y emisión

Para estudiar el efecto que ejerce la anchura de las rendijas sobre la señal analítica, se inyecta la muestra conteniendo el analito y una vez alcanzado el máximo de la señal, cuando el analito está fijado en la zona de detección, se detiene el sistema de flujo ("stopped flow") para poder medir la IFR a diferentes valores de  $R_{exc}$  y  $R_{em}$ .

Al estudiar las rendijas, es necesario seleccionar valores de anchura de rendija que produzcan una señal máxima correspondiente al analito y una mínima señal de fondo. Generalmente, se obtienen mejores resultados con bajas  $R_{exc}$  y altas  $R_{em}$ . Valores excesivamente elevadas de  $R_{exc}$ , aumentan la señal de fluorescencia (línea base) debida al soporte sólido. Manteniendo un valor de voltaje constante, el efecto que produce la variación de la anchura de las rendijas de excitación y emisión se estudia fijando la anchura de la rendija de excitación y modificando el valor de la de emisión. El espectrofluorímetro utilizado permite la variación de ambas rendijas en valores de 2.5, 5, 10 y 20 nm. A continuación, como ejemplo, se muestra el estudio llevado a cabo para el benomilo (Tabla IV.1).

**Tabla IV.1.** Estudio de la influencia de las rendijas de excitación y emisión para el benomilo.

| R<br>excitación | R <sub>emisión</sub><br>5 nm |                       | R <sub>emisión</sub><br>10 nm |                       | R <sub>emisión</sub><br>20 nm |                       |
|-----------------|------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|
|                 | Línea<br>base <sup>1</sup>   | Benomilo <sup>2</sup> | Línea<br>base <sup>1</sup>    | Benomilo <sup>2</sup> | Línea<br>base <sup>1</sup>    | Benomilo <sup>2</sup> |
| 2.5 nm          | 3                            | 6                     | 17.2                          | 27                    | 55.2                          | 77                    |
| 5 nm            | 20                           | 35                    | 86                            | 110                   | 235                           | 350                   |
| 10 nm           | N.E                          | NE                    | 334                           | 450                   | 590                           | SAT                   |
| 20 nm           | N.E                          | NE                    | SAT                           | SAT                   | SAT                           | SAT                   |

NE: No ensayado.

SAT.: Saturación del detector (> 1000 u (I.F.R.))

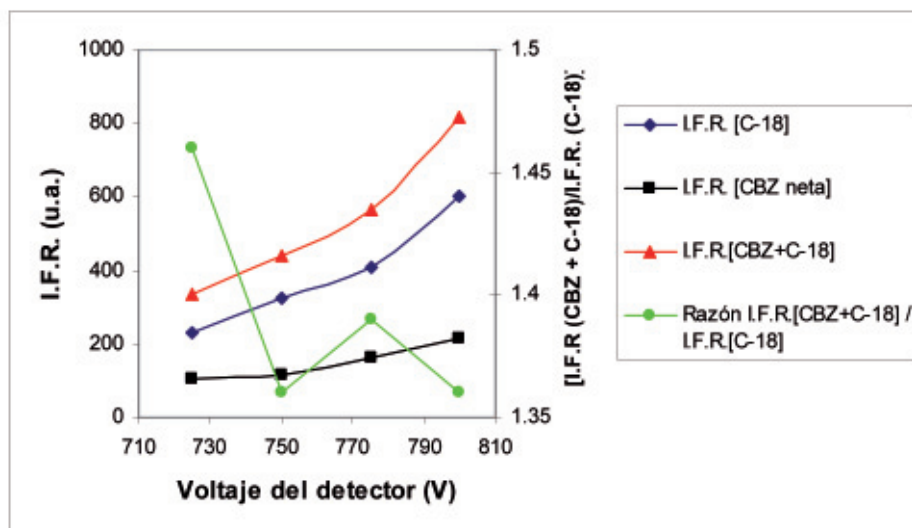
<sup>1</sup> Intensidad de fluorescencia debida al soporte sólido (línea base) (I.F.R. (u.a.))

<sup>2</sup> Intensidad de fluorescencia de benomilo (neta) (I.F.R. (u.a.))

Como se puede observar en la tabla anterior, a valores mayores de rendijas, aumenta la IFR. No obstante, hay que tener en cuenta que también se produce un aumento de la señal de fondo que proporciona el soporte sólido. En este caso, como solución de compromiso entre una señal de fondo baja y un valor de intensidad de fluorescencia alto, se eligieron como valores de anchura de las rendijas de excitación y emisión 5 y 20 nm, respectivamente, ya que proporcionaban una elevada señal del analito además de una alta razón señal analito/ señal de soporte sólido.

#### IV.2.1.2. Voltaje del detector

Una vez optimizada la anchura de las rendijas, se optimizó el voltaje aplicado al tubo fotomultiplicador. A modo de ejemplo, en la siguiente figura se muestran los datos registrados en el estudio del efecto del voltaje para el caso de la carbendazima. Se representa la intensidad de fluorescencia del fondo (debida al soporte sólido (I.F.R. [C-18]), del fondo + el analito (I.F.R. [CBZ+C-18]), la señal de analito neta (I.F.R. [CBZ]), junto con la razón de intensidades del fondo y del analito (I.F.R. [CBZ+C-18] / I.F.R. [C-18]).



**Figura IV.20.** Estudio del efecto del voltaje del detector en la intensidad de fluorescencia de la carbendazima.

Como puede observarse en la figura anterior, el aumento en el voltaje del detector produce un aumento en la intensidad de fluorescencia, de forma similar al aumento de la anchura de las rendijas. Sin embargo, hay que tener también en cuenta que se produce un aumento paralelo de la señal de fondo del soporte sólido. En este

caso, se seleccionó un valor de 725 V., para el que la señal del soporte sólido no fuese muy superior a 200 unidades de fluorescencia. Para este voltaje la razón de intensidades del analito con respecto al fondo del soporte sólido era máxima.

En la siguiente tabla, se resumen los valores seleccionados de las variables instrumentales estudiadas y las longitudes de onda óptimas para cada uno de los sensores descritos.

**Tabla IV.2.** Resumen de las características espectrales y de las variables instrumentales para cada uno de los analitos estudiados.

| Analito                | $\lambda_{exc} / \lambda_{em} (nm)^1$ | $R_{exc} / R_{em} (nm)$ | Voltaje detector (V) |
|------------------------|---------------------------------------|-------------------------|----------------------|
| Benomilo               | 293 / 398                             | 5 / 20                  | 725                  |
| Carbendazima           | 235 / 306                             |                         |                      |
| Tiabendazol            | 305 / 358                             | 5 / 20                  | 725                  |
| o-Fenilfenol           | 250 / 345                             |                         |                      |
| Benomilo               | 293 / 398                             | 5 / 20                  | 650                  |
| Carbarilo              | 281 / 336                             |                         |                      |
| Fuberidazol            | 314 / 356                             |                         |                      |
| Tiabendazol (cítricos) | 305 / 358                             | 5 / 20                  | 600                  |
| Difenilamina           | 291 / 372                             | 5 / 20                  | 700                  |
| Aluminio               | 361 / 390                             | 2.5 / 10                | 825                  |
| Cadmio                 | 360 / 520                             | 5 / 20                  | 675                  |
| Ácido salicílico       | 299 / 407                             | 5 / 20                  | 650                  |
| Naproxeno              | 233 / 354                             |                         |                      |

<sup>1</sup> Longitudes de onda de excitación y emisión de fluorescencia en fase sólida

### IV.3. CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA

Los trabajos desarrollados en esta Memoria implican la integración de la espectroscopía en fase sólida con un sistema en flujo continuo (empleando FIA y multiconmutación). La configuración del sistema en cada uno de los casos vendrá determinada: a) por el tipo de optosensor, en función de que éste responda a uno

o más analitos; b) por la existencia, o no, de reacciones de derivatización; y c) por la naturaleza/procedimiento del proceso de elución/regeneración.

#### **IV.3.1. Optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas**

##### ***IV.3.1.1. Optosensores biparámetro para la determinación de a) benomilo y carbendazima y b) tiabendazol y ortofenilfenol***

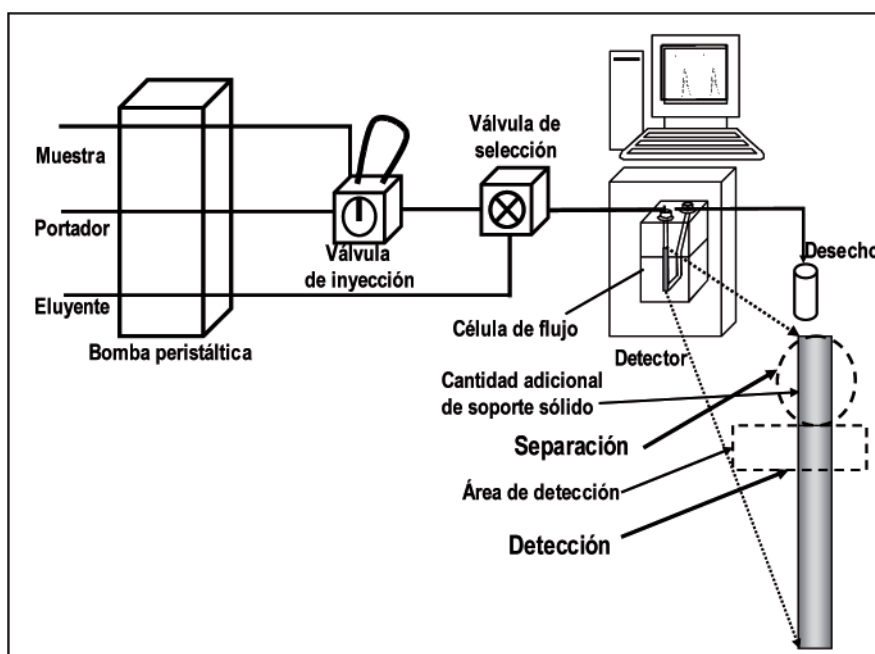
Para el desarrollo de optosensores para la determinación simultánea de dos pesticidas mediante una separación "on-line" previa, se propuso una configuración del sistema de flujo basada en el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido (sobre la que habitualmente se emplea en este tipo de sensores) en la célula de flujo.

Esta estrategia se aplicó para dos métodos (benomilo-carbendazima y tiabendazol-ortofenilfenol). En ambos casos, para llevar a cabo la separación simultánea de la mezcla, se recurre a la diferencia de polaridad entre los dos compuestos, que se pone de manifiesto en la distinta cinética de retención/elución de cada uno de ellos al interaccionar con un soporte sólido apolar ( $C_{18}$ ). Por ejemplo, para el caso de la resolución de la mezcla benomilo-carbendazima, el compuesto más apolar (benomilo), presenta una cadena alifática que hace que se retenga fuertemente en el soporte sólido, requiriendo un elevado porcentaje de MeOH, para ser eluido. Sin embargo, el otro compuesto (carbendazima) es menos apolar, y por tanto, se puede eluir de un sorbente como el  $C_{18}$  con porcentajes bajos de metanol. La diferencia de comportamiento en este caso particular es tan grande, que con una pequeña cantidad de fase estacionaria adicional, se pueden separar perfectamente las dos especies. Esto hace que en este caso no sea necesaria la utilización de una precolumna para separar los analitos antes de llegar a la célula de flujo, como ha sido descrito en los primeros multisensores desarrollados principalmente para análisis de principios activos en fármacos [277].

Por tanto, una pequeña cantidad adicional de soporte sólido por encima de la zona de detección, dentro de la propia célula de flujo, es suficiente para llevar a cabo una separación eficiente de dos especies de interés. A través de una optimización de la cantidad de soporte sólido requerido en la célula de flujo, se pueden desarrollar, por tanto multisensores para el análisis de dos especies, siempre y cuando haya una diferencia sustancial en el comportamiento (retención/elución) de los analitos en el soporte sólido empleado.

La configuración del sistema FIA empleada está esquematizada en la Figura IV.21. Se trata de una configuración monocanal en la que se efectúa la inyección de la

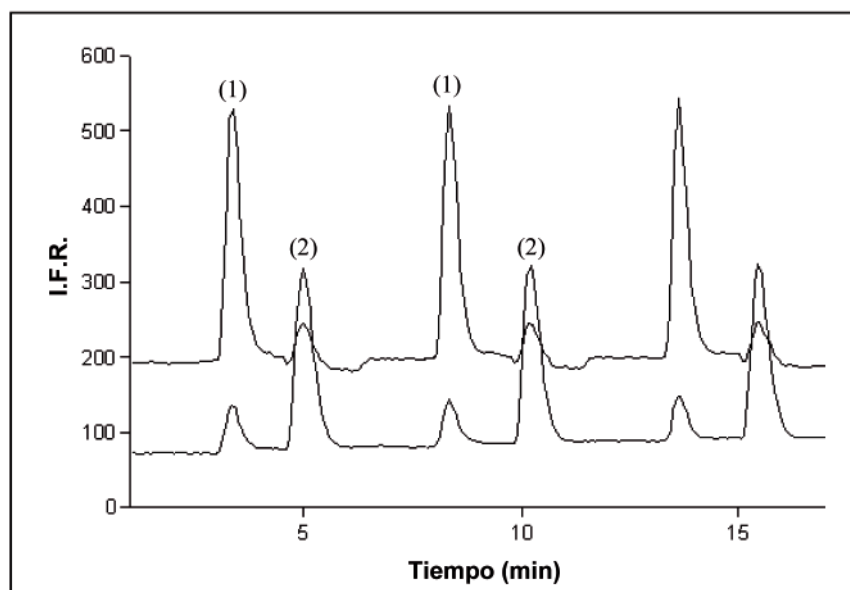
muestra por medio de una válvula rotatoria de seis vías, en el flujo del portador (MeOH 20 %, v:v), que actúa como portador/eluyente de una de las especies (carbendazima). Después de que el primer analito haya desarrollado su señal analítica transitoria, se introduce disolución eluyente (MeOH 65 %, v:v) mediante la válvula de selección, de forma que esta disolución actúe como portador/eluyente para el segundo analito (benomilo).



**Figura IV.21.** Configuración del sistema FIA para la resolución de mezclas binarias de pesticidas.

Este mismo principio también fue aplicado a la resolución de una mezcla de dos principios activos de fármacos (naproxeno y ácido salicílico), pero empleando multiconmutación.

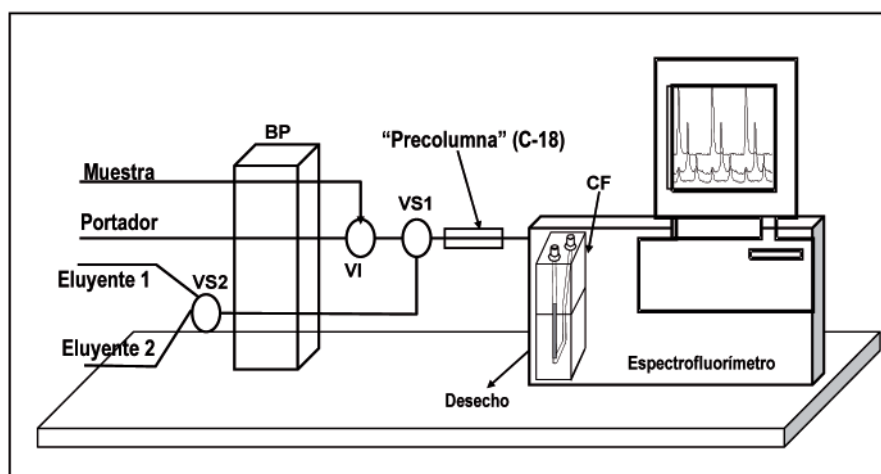
En la **Figura IV.22**, se puede observar un diagrama típico de la resolución de la mezcla tiabendazol y ortofenilfenol.



**Figura IV.22.** Diagrama típico de la resolución de la mezcla tiabendazol (1) y ortofenilfenol (2) con concentraciones de  $0.03$  y  $0.15 \mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente y un volumen de inyección de muestra de  $400 \mu\text{l}$ .

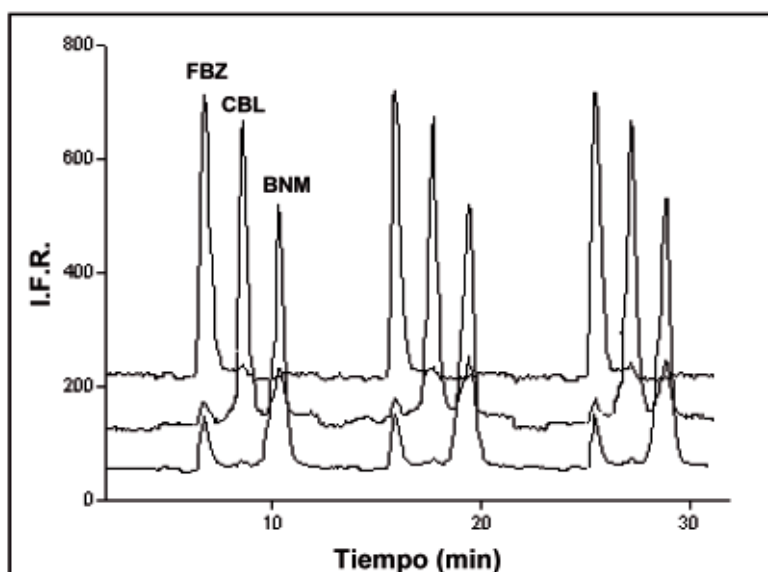
#### **IV.3.1.2. Optosensor para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol.**

Para el desarrollo del optosensor triparámetro para la determinación de tres pesticidas se recurrió al empleo de un dispositivo de separación en el sistema de flujo, justo antes de la célula de detección. Se preparó una "precolumna" empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida. Esta columna permitía la retención transitoria de dos de los analitos permitiendo el paso y determinación del tercero: dos de los analitos, carbarilo y benomilo, se quedan retenidos en la minicolumna empaquetada con  $\text{C}_{18}$  sílica gel, mientras que el otro (fuberidazol) llega a la zona sensora donde se detecta por medida de su fluorescencia nativa, originando una señal transitoria. Posteriormente, mediante el empleo de dos válvulas de selección, se procede a la elución secuencial de las dos especies restantes retenidas en la minicolumna mediante el empleo sucesivo de dos eluyentes apropiados, llegando asimismo a la zona sensora, desarrollando sus señales transitorias respectivamente. En la siguiente figura, se muestra la configuración FIA monocal empleada para la separación de estos tres pesticidas.



**Figura IV.23.** Configuración del sistema FIA para la determinación simultánea (mediante una sola inyección de muestra) de mezcla benomilo, carbarilo y fuberidazol; VI: válvula de inyección; VS1 y VS2: válvulas de selección; BP: bomba peristáltica; CF: célula de flujo.

En este caso, se emplea una disolución de metanol:agua desionizada al 30 % (v:v), que actúa como portador y eluyente del fuberidazol, que debido a su mayor polaridad, pasa a través de la precolumna con mayor rapidez, llegando a la zona sensora y originando la señal analítica correspondiente, mientras que el carbarilo y el benomilo se quedan fuertemente retenidos en la precolumna. Una vez eluido el fuberidazol de la zona sensora (por el propio portador), se gira la válvula de selección para emplear el eluyente 1 (una disolución de metanol:agua desionizada al 55% (v:v)), permitiendo la elución del carbarilo de la precolumna y transportándolo hasta la zona de detección, donde esta disolución también actúa como eluyente en la célula de flujo originando la señal transitoria correspondiente al carbarilo. Por último, una vez eluido el carbarilo de la zona sensora, se gira la válvula de selección 2 para cambiar de eluyente 1 a eluyente 2 (una disolución de metanol:agua desionizada al 75% (v:v)), permitiendo la elución del benomilo de la precolumna y su transporte hasta la zona de detección, donde esta disolución también actúa como eluyente en la célula de flujo originando la señal analítica correspondiente al benomilo y regenerando el sensor. En la siguiente figura se muestra un fiagrama típico de la determinación simultánea de benomilo, carbarilo y fuberidazol.



**Figura IV.24.** Diagrama típico del optosensor triparámetro para la determinación de fuberidazol (FBZ), carbarilo (CBL) y benomilo (BNM) con concentraciones de 0.01, 0.6 y 1  $\mu\text{g ml}^{-1}$  respectivamente, empleando un volumen de inyección de muestra de 2100  $\mu\text{l}$ .

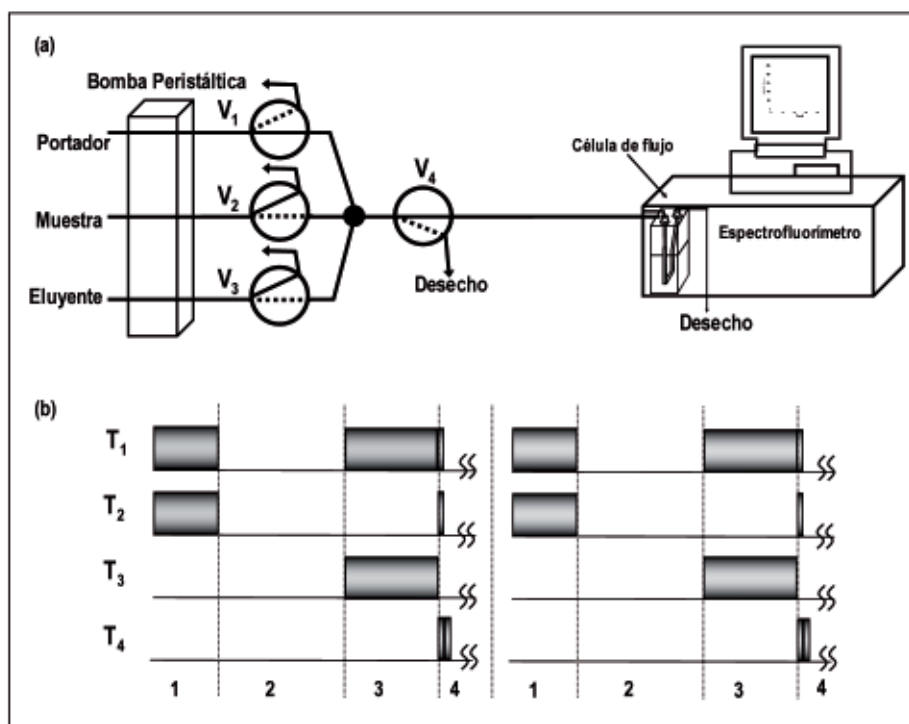
El diagrama anterior presenta tres líneas bases, correspondientes a los tres pares de longitudes de onda de excitación/emisión que se emplean para la determinación de cada uno de los analitos. En el diagrama anterior también se pueden observar picos de cada uno de los analitos en las longitudes de onda óptimas de los otros dos compuestos. Esto se debe a que los espectros de fluorescencia de los compuestos estudiados están parcialmente solapados, por lo que la determinación simultánea de estos tres compuestos no sería posible mediante fluorescencia convencional.

#### **IV.3.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios de tratamiento post-cosecha en frutas**

Los métodos desarrollados en esta memoria para la determinación de tiabendazol en cítricos y difenilamina en manzanas y peras emplean un sistema de flujo multiconmutado empleando válvulas solenoide de tres vías. El sistema de flujo empleado en ambos casos es prácticamente el mismo con la única diferencia de los segmentos de los tiempos de inserción de muestra y limpieza/regeneración del soporte sólido.

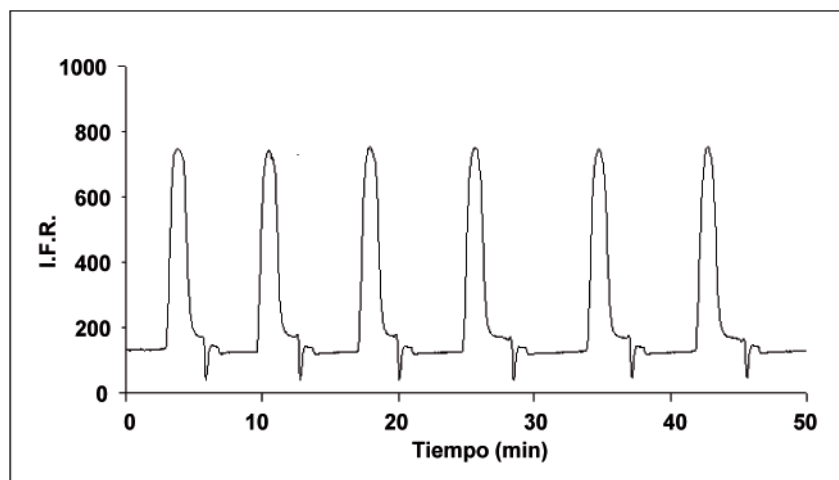
A continuación se muestra el sistema de flujo empleado para la determinación de residuos de tiabendazol en naranjas y limones (Figura IV.25). El sistema emplea 4 válvulas solenoide. La válvula  $V_1$  se emplea para controlar el paso de portador a la

célula de flujo; la válvula  $V_2$  se emplea para la inserción de la muestra; la válvula  $V_3$  para seleccionar la disolución regeneradora de la fase sólida, y la válvula  $V_4$  se usa para ejecutar un ciclo de lavado del sistema de flujo entre muestra y muestra. El sistema de propulsión se colocó antes de las válvulas solenoide, ya que se comprobó en estudios preliminares que el uso de la bomba peristáltica al final del sistema de flujo provocaba la formación de burbujas probablemente debido al soporte sólido. Por esto, se seleccionó la ubicación convencional (antes de las válvulas) típica en los sistemas FIA.



**Figura IV.25.** (a) Sistema de flujo continuo con válvulas solenoide de tres vías empleado para la determinación de tiabendazol; (b) esquema y protocolo de apertura y cierre de las válvulas en las distintas etapas de análisis en flujo: (1) inserción de muestra; (2) generación de la señal transitoria y elución; (3) limpieza y regeneración del soporte sólido; (4) limpieza para evitar contaminación entre muestra y muestra.

A continuación se muestran las señales transitorias generadas mediante el uso de este sistema de flujo multiconmutado para la determinación de tiabendazol en un extracto de cítricos.



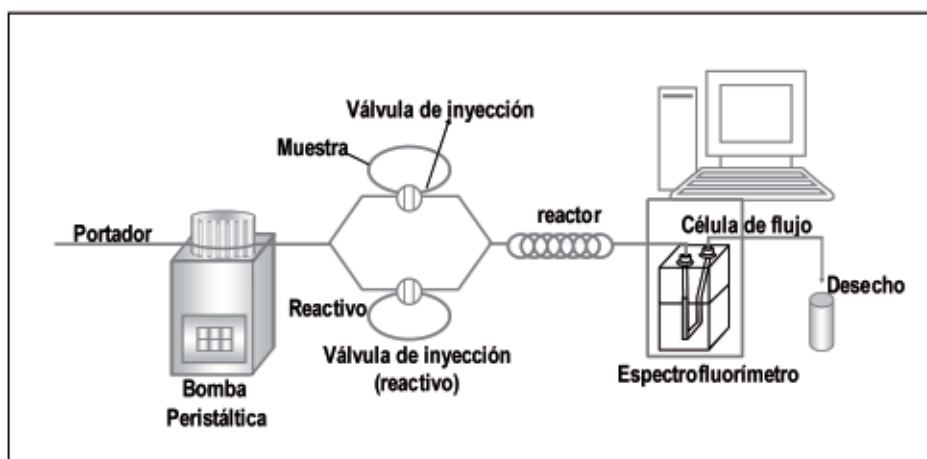
**Figura IV.26.** Diagrama obtenido para la determinación de  $10 \text{ mg Kg}^{-1}$  de tiabendazol en un extracto de naranja.

#### IV.3.3. Optosensores para la determinación de metales

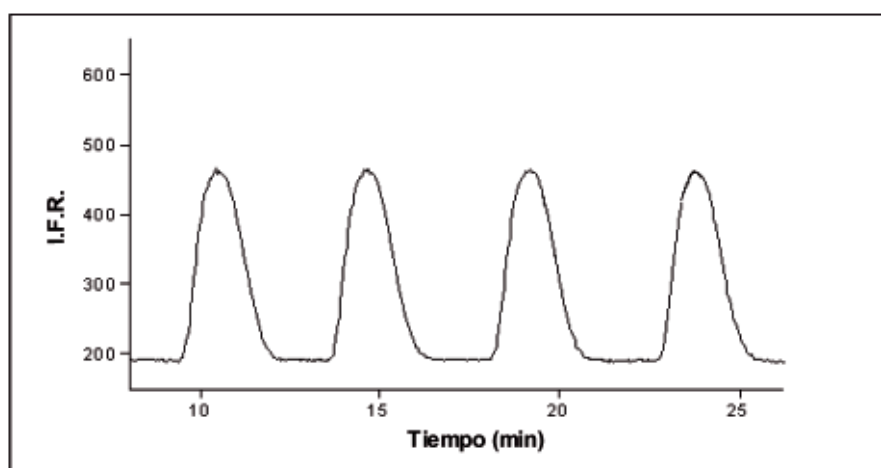
Para el desarrollo de los optosensores fluorescentes para la determinación de Aluminio (III) y de Cadmio (II), se llevó a cabo una reacción de derivatización previa "on-line", mediante el empleo de ácido cromotrópico y del ácido 8-hidroxi-5-quinolin sulfónico, para el Al(III) y el Cd(II) respectivamente. El sistema de flujo empleado es bastante similar en ambos casos. Está basado en un sistema FIA en el que se emplea una inyección doble sincronizada de reactivo y muestra mediante el uso de dos válvulas de inyección situadas en paralelo, junto con el uso de un reactor, para completar la reacción antes de que el bolo alcance la zona sensora.

La diferencia principal entre las dos configuraciones empleadas es la etapa de regeneración del soporte sólido. En el caso del método para el Al(III), el quelato formado entre el aluminio y el ácido cromotrópico se retiene de forma transitoria no siendo preciso el empleo de una solución eluyente adicional. Sin embargo, para el caso del Cd(II) sí es necesario emplear una inyección de un volumen determinado de eluyente para llevar a cabo la elución completa del complejo retenido en la resina de intercambio iónico empleada. Por otra parte, a diferencia del método para Cd(II), en el caso del Al(III), se requiere un reactor adicional para completar la reacción.

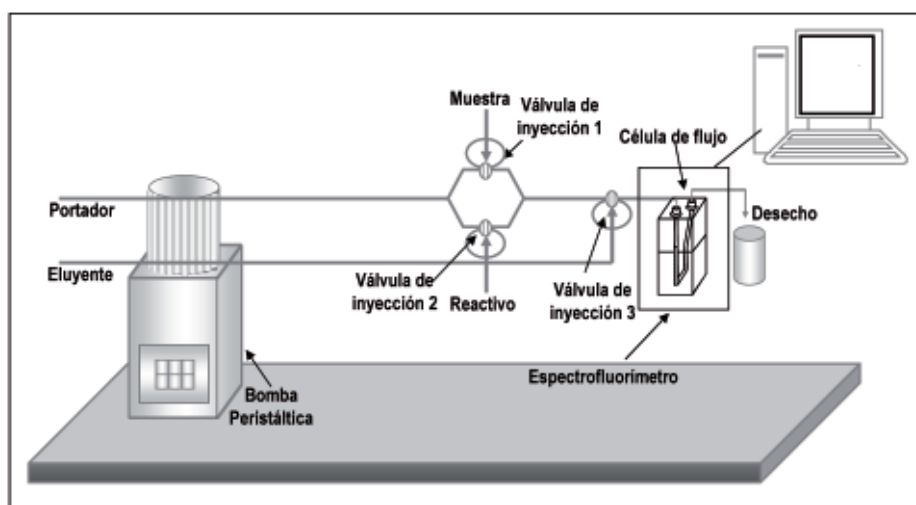
En las siguientes figuras se muestran las configuraciones FIA empleadas y ejemplos de diagramas típicos obtenidos en los métodos desarrollados para la determinación de Al(III) y Cd (II).



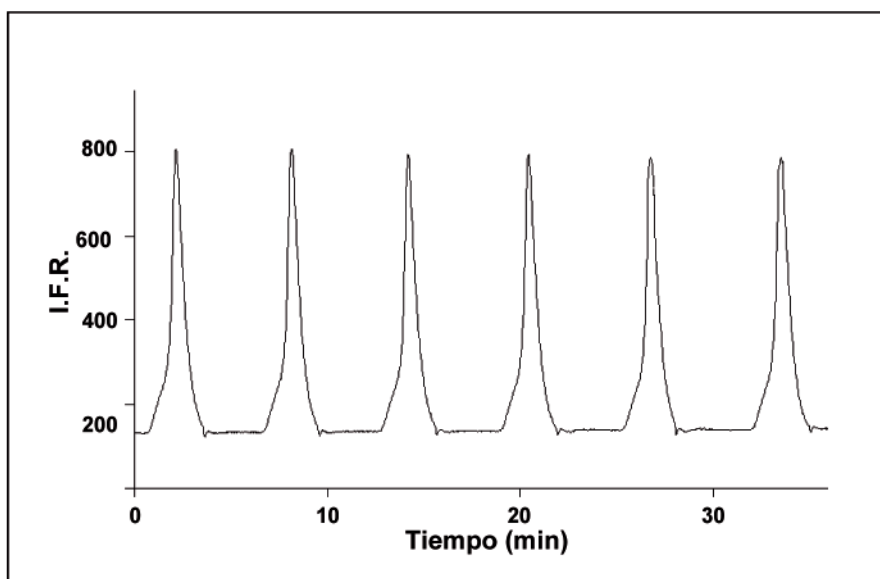
**Figura IV.27.** Configuración del sistema FIA para la determinación de Al(III) basada en la reacción de derivación con ácido cromotrópico y la retención transitoria del complejo formado en C<sub>18</sub> silica gel.



**Figura IV.28.** Fiagrama obtenido para la determinación de 125 ng ml<sup>-1</sup> de Al(III).



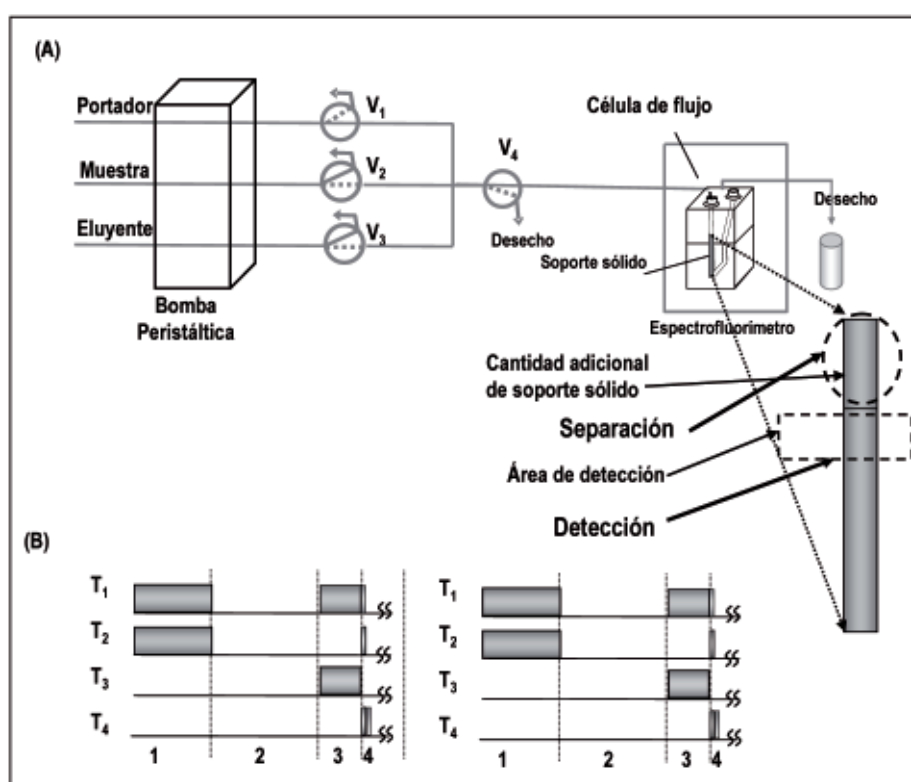
**Figura IV.29.** Configuración del sistema FIA para la determinación de  $\text{Cd(II)}$ .  
La válvula de inyección 3 se emplea para insertar un volumen de eluyente adecuado que permita la elución del complejo retenido y la regeneración de la zona sensora



**Figura IV.30.** Diagrama obtenido para la determinación de  $50 \mu\text{g L}^{-1}$  de  $\text{Cd(II)}$ .

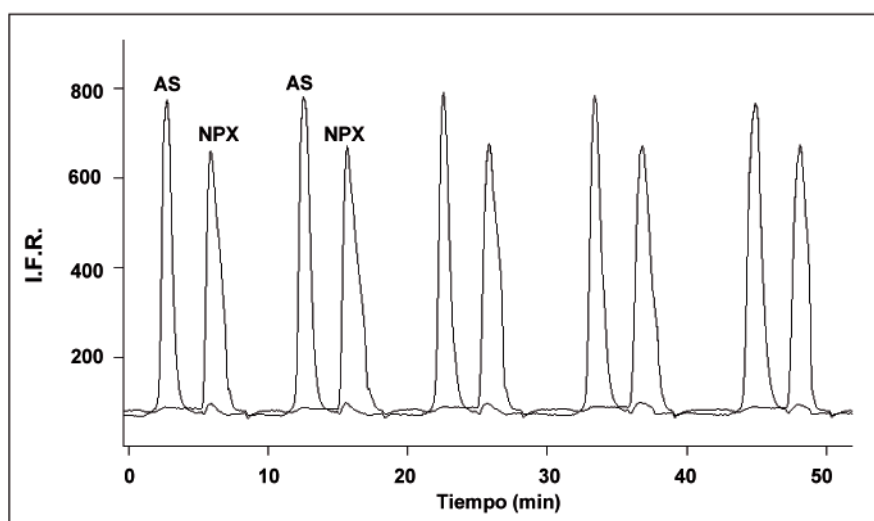
#### IV.3.4. Optosensor biparámetro para la determinación de naproxeno y ácido salicílico

Al igual que para los optosensores monoparámetro para la determinación de tiabendazol y difenilamina, en este optosensor biparámetro, también se diseñó un sistema de flujo continuo empleando válvulas solenoide de tres vías. La separación de los analitos estaba basada en el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo, como en los sensores biparámetro de mezclas de pesticidas. En la siguiente figura se muestra el esquema de flujo continuo propuesto:



**Figura IV.31.** Configuración del sistema FIA para la determinación de ácido salicílico y naproxeno; (A) Configuración del sistema de flujo continuo con el detalle de la cantidad adicional de soporte sólido para llevar a cabo la separación; (B) (b) Esquema y protocolo de apertura y cierre de las válvulas en las distintas etapas de análisis en flujo: (1) inserción de muestra; (2) generación de la señal transitoria para el ácido salicílico y elución; (3) selección de la disolución eluyente, generación de la señal transitoria y elución del naproxeno; (4) limpieza para evitar contaminación entre muestra y muestra.

A continuación se muestra un ejemplo de las señales obtenidas para la determinación simultánea de naproxeno y ácido salicílico.



**Figura IV.32.** Señal transitoria obtenida para la determinación simultánea de ácido salicílico (AS) y de naproxeno (NPX); [AS]: 225 ng ml<sup>-1</sup>; [NPX]: 20 ng ml<sup>-1</sup>.

#### IV.4. VARIABLES DE LA UNIDAD DE RETENCIÓN/SEPARACIÓN/DETECCIÓN

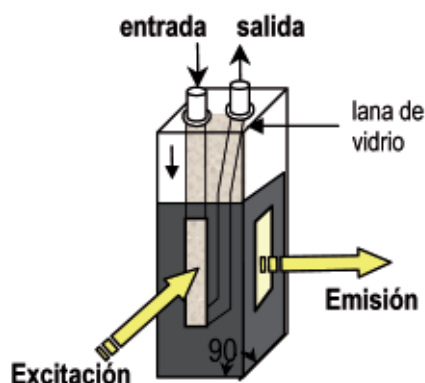
En este punto se estudian las características de la célula de flujo, la naturaleza del soporte sólido y el nivel de éste en la célula de medida, así como la cantidad de soporte sólido necesario para llevar a cabo las separaciones entre las distintas especies en los sensores multiparámetro mediante el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido o una precolumna, previa a la célula de flujo.

##### (a) Características de la célula de flujo

En la célula de flujo, hay que tener en cuenta tanto el camino óptico como el volumen interno de la misma. El camino óptico no debe ser muy grande para evitar que la señal de la línea base (IFR del soporte sólido) sea demasiado alta. Además, cantidades grandes de soporte sólido en el depósito interno de la célula puede producir una menor preconcentración de las especies retenidas con la correspondiente disminución de la señal y un aumento del tiempo de elución, por lo que este volumen debe ser lo menor posible para incrementar la sensibilidad.

Para todos los optosensores desarrollados en esta memoria se empleó una célula de flujo comercial con forma de prisma rectangular de base cuadrada, permitiendo

la emisión en un ángulo de  $90^\circ$  respecto a la excitación incidente. Es una célula de cuarzo **Hellma 176.052 QS** de 1.5 mm de paso óptico y un volumen interno de 25  $\mu\text{l}$  (Ver Figura IV.33.).



**Figura IV.33.** Esquema de una célula de flujo Hellma 176.052-QS (cuarzo)

Como se ha comentado anteriormente (sección I.4.4) el nivel óptimo de soporte sólido en la célula de flujo depende de la geometría del haz de luz del detector, siendo necesario que dicho nivel cubra completamente la zona en la que incide el haz de luz. Niveles más bajos del indicado dan lugar a una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de disolución. Por el contrario, niveles de soporte sólido muy por encima del haz de luz, conllevan la fijación del analito en la fase sólida fuera de la zona de detección. No obstante, en algún caso, se puede emplear una cantidad adicional de soporte sólido por encima de la zona irradiada para llevar a cabo la separación de dos especies, siempre y cuando la diferencia de retención sea suficientemente grande.

### **(b) Selección del soporte sólido y estudios de separación**

La selección del soporte sólido es uno de los aspectos más importantes a considerar cuando se desarrolla un optosensor en flujo. Es el punto de partida de los métodos que se desarrollan. La elección del soporte sólido se lleva a cabo considerando la naturaleza, la estructura y las propiedades físicas y químicas de la especie o especies de interés. Si los analitos (o los productos de reacción a partir de una reacción de derivatización) son de tipo iónico, se suelen emplear resinas de intercambio iónico como soporte sólido. En cambio, si los compuestos son de naturaleza neutra, se suelen emplear sorbentes que estén basados en interacciones por mecanismos de adsorción.

Para cada uno de los métodos descritos, se realizó un estudio preliminar de los posibles soportes sólidos a emplear de acuerdo con las características de los analitos.

A continuación se muestran los soportes sólidos seleccionados en cada sensor:

**Tabla IV.3.** Soportes sólidos seleccionados

| Optosensor                     | Soporte en la Célula de Flujo |
|--------------------------------|-------------------------------|
| Benomilo-Carbendazim           | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Tiabendazol-o-Fenilfenol       | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Benomilo-carbarilo-Fuberidazol | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Tiabendazol                    | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Difenilamina                   | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Al(III)                        | Silicagel C <sub>18</sub>     |
| Cd(II)                         | Sephadex QAE A-25             |
| Ácido salicílico-Naproxeno     | Silicagel C <sub>18</sub>     |

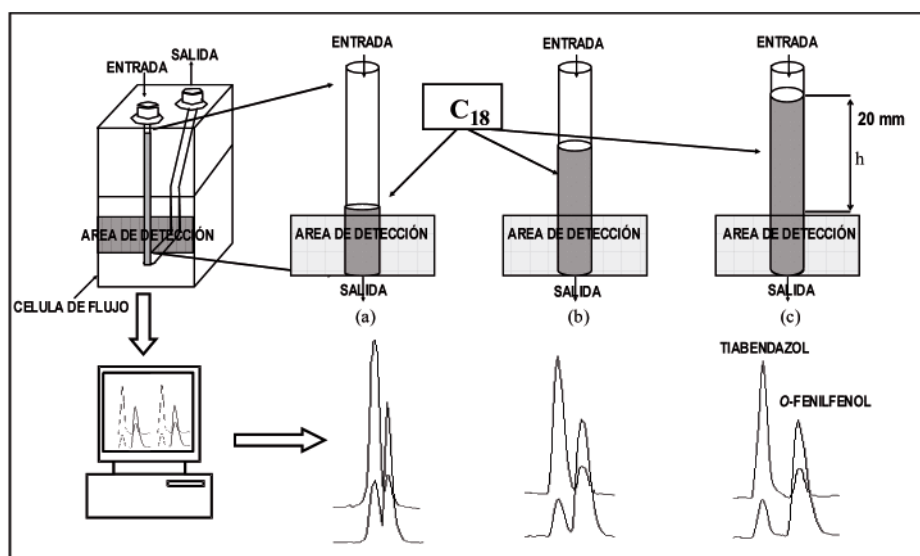
Como se puede observar en la tabla anterior, en siete de los ocho optosensores descritos se empleó C<sub>18</sub> silica gel.

En el caso de los optosensores multiparámetro tanto para la determinación de pesticidas como de fármacos, se escogió gel de sílice C<sub>18</sub> ya que presentaba una interacción fuerte para cada uno de los compuestos de las mezclas estudiadas de forma que mediante el empleo de unas determinadas condiciones (portador, eluyente, nivel de soporte sólido en la célula de flujo o en la precolumna), se podría llevar a cabo la separación y retención transitoria de cada una de las mezclas de forma simultánea (mediante una única inyección). El gel de sílice C<sub>18</sub> presenta una gran capacidad para retener especies hidrofóbicas con baja solubilidad en agua y/o poco polares. La gran diferencia de polaridad y por tanto, de retención de las distintas mezclas de especies estudiadas permitía la separación de las mismas incluso mediante una pequeña cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo. Además, variando el valor del pH de la muestra y del portador se puede controlar/modular el comportamiento y retención de los analitos en la zona sensora y de esa forma diseñar una estrategia para permitir la separación y determinación de los compuestos estudiados.

Aunque alguno de los analitos presentaba interacciones con soportes tipo Sephadex (SPC-25 o G-15 en el caso de tiabendazol), se escogió silica gel  $C_{18}$ , ya que presentaba una fuerte interacción tanto para el tiabendazol como para el o-fenilfenol. En este caso la interacción del o-fenilfenol con el soporte sólido era más intensa que en el caso del tiabendazol, que es un compuesto más polar. El o-fenilfenol requiere un elevado porcentaje de MeOH, para ser eluido, mientras que para el tiabendazol el porcentaje de MeOH es mucho más bajo. Esta diferencia de comportamiento de retención/elución se utilizó para llevar a cabo la separación completa de los dos pesticidas estudiados, con el uso de una cantidad adecuada de soporte sólido en la propia célula de flujo.

La diferencia de comportamiento en este caso particular es tan grande, que con una pequeña cantidad de soporte sólido, se pueden separar perfectamente las dos especies. Esto hace que en este caso no sea necesaria la utilización de una precolumna para separar los analitos antes de llegar a la célula de flujo, como ha sido descrito en los primeros multisensores desarrollados principalmente para análisis de principios activos en fármacos [277]. Por esto, sólo con una pequeña cantidad adicional de soporte sólido por encima de la zona de detección, dentro de la propia célula de flujo, es suficiente para llevar a cabo una separación eficiente de las dos especies de interés.

Se llevó a cabo un estudio para evaluar la cantidad de soporte sólido en la célula de flujo necesaria para separar las especies de interés usando unas condiciones químicas próximas a las óptimas (portador: MeOH 20 %; eluyente MeOH 50 %). Se estudiaron distintas cantidades de soporte sólido. El estudio está representado en la siguiente figura:



**Figura IV.34.** Estudio de la separación de dos analitos (tiabendazol y o-fenilfenol) en la célula de flujo usando: (a) 40 mg  $C_{18}$ , (b) 50 mg  $C_{18}$ , (c) 60.0 mg  $C_{18}$  (20 mm de altura). Portador: 20 % MeOH; eluyente 50 % MeOH.

En el caso (a) de la figura anterior, la cantidad de fase sólida en la célula de flujo es insuficiente, ya que la separación no es completa y el segundo analito comienza a ser detectado antes de que el primero haya dejado de desarrollar su señal analítica. En el caso (b) se puede observar como la separación es prácticamente completa. En el caso (c), la separación es completa. Este nivel de soporte sólido (60.0 mg; 20 mm de altura por encima del área irradiada), fue el escogido para el resto de las experiencias.

En otros métodos, el empleo de un valor de pH determinado para la muestra permitía la separación de dos especies, cuando alguna de ellas presentaba un equilibrio ácido-base. En el caso de la mezcla de fármacos, la separación se llevó a cabo también con el empleo de un pH adecuado tanto del portador como de la muestra, que permitiese la separación adecuada del ácido salicílico del naproxeno.

En el sistema para la determinación de los pesticidas benomilo, carbarilo y fuberidazol, la resolución de la mezcla se realizó mediante el uso de una precolumna "on-line" empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida, consiguiendo, mediante una serie de disoluciones portadoras y eluyentes que los analitos lleguen secuencialmente a la zona sensora y que se determinen sin solapamiento de señales. Se realiza un estudio de la influencia de la longitud de esta precolumna empaquetada en la resolución de la mezcla. A mayor cantidad de soporte sólido en la precolumna la separación de los analitos era cada vez más completa, hasta que se separan totalmente cuando usamos una longitud de precolumna de 50 mm (1.5 mm diámetro interno).

Sólo en el caso del optosensor para Cd (II) se empleo una resina de intercambio iónico (Sephadex QAE-A 25), para retener de forma transitoria el complejo Cd(II)-8-HQS que se formaba.

#### **IV.5. VARIABLES QUÍMICAS**

En este apartado se estudian las variables de tipo químico que fueron consideradas a la hora de desarrollar y poner a punto cada uno de los métodos descritos en la memoria. Una vez, seleccionado el soporte sólido adecuado y la configuración de flujo requerida, se procedió a la optimización de cada una de las variables químicas consideradas que podían ejercer una influencia en la retención de las especies, en la separación de los compuestos, en la señal analítica, en la regeneración del soporte sólido, etc., teniendo en cuenta el tipo de muestra y la matriz de cada uno de los métodos. Algunas de las variables químicas estudiadas fueron: (1) naturaleza, composición e influencia del pH del portador/eluyente(es); (2) estabilidad, influencia del pH y de la fuerza iónica de la muestra; (3) concentración y volumen de reactivos, en los casos donde sea necesaria una reacción de derivatización, etc. A continuación se resumen los estudios desarrollados para cada uno de los métodos descritos en la memoria.

##### **IV.5.1. Optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas.**

###### ***IV.5.1.1. Optosensor para la determinación de benomilo y carbendazima***

###### **(A) NATURALEZA DE LA MUESTRA: ESTABILIDAD DEL BENOMILO**

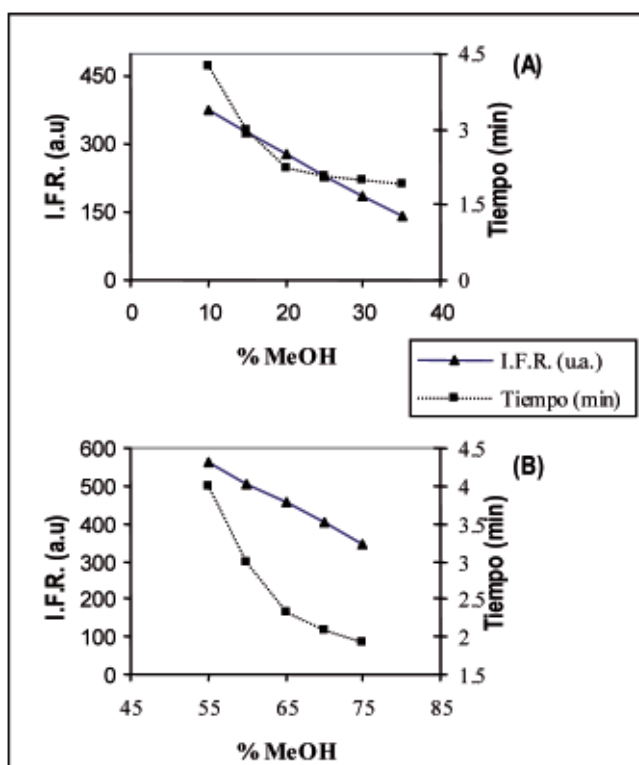
Debido a que las disoluciones de benomilo en agua o en disolventes orgánicos no son estables, la mayoría de los métodos cromatográficos descritos para la determinación de benomilo están basados en la conversión previa de éste en su principal producto de degradación: la carbendazima. Sin embargo, varios estudios han señalado que usando medios ácidos muy fuertes, el benomilo es estable y no se degrada, lo que permitiría su determinación directa. Singh estableció un umbral de concentración de HCl 1M, a partir del cual la degradación de benomilo en carbendazima, era prácticamente despreciable [81].

Por este motivo, se llevó a cabo un estudio de estabilidad, para seleccionar unas condiciones en la que el benomilo permaneciese estable. Mediante comparación de espectros de absorción UV y de excitación y emisión de fluorescencia registrados

cada 4 horas, se evaluó la estabilidad de patrones de benomilo con niveles de concentración de ácido clorhídrico (HCl) entre 0.1 y 10 M. Se observó que al aumentar la concentración de HCl, la velocidad de degradación de benomilo disminuía, de forma que con un medio 1.5 M HCl, el benomilo permanecía estable durante más de 24 horas a temperatura ambiente. Estos resultados están de acuerdo con los descritos por Singh. Se seleccionó finalmente una concentración de HCl de 1.5 M para las disoluciones de trabajo. La disolución madre se preparaba en un medio 5 M HCl, de forma que era estable durante más de dos semanas.

#### (B) NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DEL PORTADOR Y DEL ELUYENTE

Una vez seleccionado el soporte sólido adecuado para la separación y retención de benomilo y carbendazima y en paralelo con el estudio de separación y optimización de la cantidad de soporte sólido en la célula de flujo, se estudió la naturaleza y concentración de portador y eluyente óptimas. Este estudio se llevó a cabo empleando una cantidad de soporte sólido que permitía la separación completa de los dos compuestos. Teniendo en cuenta que la fase sólida escogida para llevar a cabo la retención de los dos analitos estudiados fue  $C_{18}$  silica gel, resulta adecuado emplear disoluciones de agua y metanol (MeOH), para llevar a cabo la elución de los analitos con porcentajes crecientes de MeOH en función de la polaridad y de la retención de las especies de interés en el soporte sólido, de forma semejante a un método de cromatografía de líquidos en fase reversa. Por este motivo, se estudiaron diversas disoluciones con distintos porcentajes de MeOH, tanto para el portador (portador/eluyente para la carbendazima) como para el eluyente (portador/eluyente para el benomilo). En la siguiente figura se pueden ver los resultados obtenidos en este estudio.



**Figura IV.35.** Estudio del % de metanol en el portador (A) y el eluyente (B) para el método de benomilo y carbendazima; Influencia del % de MeOH en la señal analítica de carbendazima (A) y benomilo (B) y en el tiempo de análisis.

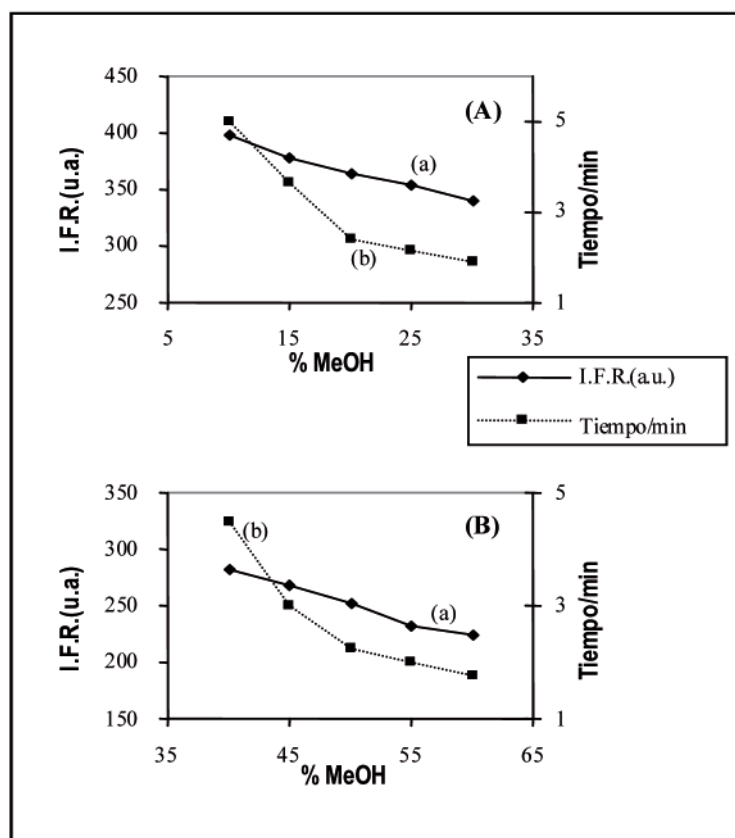
El estudio del portador se llevó a cabo con disoluciones con un porcentaje de MeOH entre el 10 y el 35 % (v:v). Se consideró como tiempo de análisis el que transcurre entre la inyección de muestra y la elución completa de la carbendazima. Como se puede ver en la figura anterior, a valores mayores de % de MeOH, el tiempo de análisis para la carbendazima era menor aunque la señal disminuía también. Como solución de compromiso, se escogió un porcentaje de 15 % de MeOH para el portador. En el caso del estudio del eluyente se procedió de la misma forma. El tiempo que se considera para el estudio del eluyente, es el que transcurre desde que se selecciona la disolución de eluyente, hasta que se eluye completamente el benomilo. Este estudio se llevó a cabo con disoluciones con porcentajes de MeOH entre el 55 y el 75 % (v:v). Conforme se incrementaba el % de MeOH, el tiempo de análisis era menor aunque la señal también disminuía. En este caso se eligió un porcentaje de 65 % de MeOH para el eluyente.

**IV.5.1.2. Optosensor para la determinación de tiabendazol y ortofenilfenol****(A) NATURALEZA DE LA MUESTRA**

Una vez seleccionado el soporte sólido adecuado para la retención y separación y del tiabendazol y el o-fenilfenol ( $C_{18}$  silica gel) y en paralelo con el estudio de separación, naturaleza y concentración de portador y eluyente, y la optimización de la cantidad de soporte sólido en la célula de flujo, se estudió la naturaleza de la muestra y el pH adecuado del método. Se encontró que debido a la estructura que presenta el tiabendazol (Sección I.5, Figura I.14), con grupos susceptibles de ser protonados a pH ácidos, la retención del mismo se podía regular en función del pH, de forma que con concentraciones de HCl elevadas en la muestra se favorecía claramente la separación del tiabendazol y el o-fenilfenol, ya que la señal del tiabendazol era más rápida a mayor concentración de HCl en la muestra. Esta concentración se estudió en un intervalo entre 0.1 y 3 M de HCl. Por debajo de 0.5 M HCl, no se conseguía una separación adecuada de los dos compuestos debido a la cola del pico del tiabendazol. En cambio, a partir de 0.5 M HCl, se conseguía una separación óptima de los dos compuestos. Esta concentración (0.5 M HCl) fue seleccionada para estudios posteriores.

**(B) NATURALEZA Y CONCENTRACIÓN DE PORTADOR Y ELUYENTE**

Como se ha comentado anteriormente, cuando se usa  $C_{18}$  silica gel como soporte sensor, se suelen emplear disoluciones de agua y metanol (MeOH), para llevar a cabo la retención transitoria y posterior elución de los analitos, mediante el empleo de porcentajes crecientes de MeOH en función de la mayor retención de las especies de interés en el soporte sólido. De la misma forma que en el método para carbendazima y benomilo, se estudiaron diversas disoluciones con distintos porcentajes de MeOH, tanto para el portador (portador/eluyente del tiabendazol) como para el eluyente (portador/eluyente del o-fenilfenol). Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la siguiente figura:



**Figura IV.36.** Estudio del porcentaje de MeOH del portador (A) y el eluyente (B) para la determinación simultánea de tiabendazol y o-fenilfenol e influencia del porcentaje de MeOH en la señal analítica (a) y en el tiempo de análisis (b).

El estudio del portador se llevó a cabo con disoluciones con un porcentaje de MeOH entre el 10 y el 30 % (v:v). A valores mayores de % de MeOH, el tiempo de análisis era menor aunque la señal disminuía ligeramente. Por otra parte valores de 15 % de MeOH o menores no producían una elución completa del tiabendazol. A partir de 20 % MeOH, el tiabendazol se eluía por completo; este fue el valor que se seleccionó finalmente para el portador.

El estudio del eluyente se llevó a cabo con disoluciones con un porcentaje de MeOH entre el 35 y el 60 % (v:v) debido a la mayor retención del ortofenilfenol en el soporte. A valores mayores de % de MeOH, tanto la señal como el tiempo de análisis disminuían. En este caso se eligió un porcentaje de 50 % de MeOH como portador/eluyente del o-fenilfenol.

### **IV.5.1.3. Optosensor para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol**

En este método para la determinación simultánea de benomilo, carbarilo y fuberidazol se empleó una disolución acuosa 1.5 M de HCl para la muestra, para evitar la degradación de benomilo a carbendazima como se ha descrito anteriormente. Por otra parte, como se empleó también C<sub>18</sub> silica gel como soporte sólido, se seleccionaron también disoluciones de metanol (MeOH), para llevar a cabo la elución de los tres analitos de forma secuenciada.

Se estudiaron diversas disoluciones con distintos porcentajes de MeOH para el portador (portador/eluyente para el fuberidazol), para el eluyente 1 (portador/eluyente para el carbarilo) y para el eluyente 2 (portador/eluyente para el benomilo). A continuación se muestra un resumen con los intervalos de porcentajes de metanol estudiados y seleccionados para cada una de las disoluciones:

**Tabla IV.4.** Estudio del portador y eluyentes para el optosensor para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol.

| Disolución | Intervalo estudiado<br>(% MeOH) | % MeOH<br>seleccionado |
|------------|---------------------------------|------------------------|
| Portador   | 15-35                           | 30                     |
| Eluyente 1 | 45-60                           | 55                     |
| Eluyente 2 | 60-75                           | 75                     |

### **IV.5.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios para tratamiento post-cosecha**

#### **IV.5.2.1. Optosensor para la determinación de tiabendazol en cítricos**

En este trabajo, el estudio de las variables químicas se llevó a cabo directamente con extractos de matriz (naranja y limón) fortificados con analito. El procedimiento de extracción y purificación de las muestras está descrito en el apartado IV.9). Gracias a la elevada sensibilidad del sensor, que permitía detectar niveles de concentración de tiabendazol bastante por debajo de la normativa vigente de límite máximo de residuos (LMRs) para este fungicida en cítricos (5 mg Kg<sup>-1</sup>) [118], el extracto obtenido de la muestra (en acetonitrilo), se diluía 1:10 (v/v) con agua. De

esta forma se simplificaba mucho la matriz y se aumentaba la vida media y número de inyecciones del sensor sin proceder a reemplazar el soporte sólido.

Por otra parte, teniendo en cuenta que también se empleó como soporte sólido, C<sub>18</sub> silica gel, se estudiaron distintas disoluciones de metanol (MeOH) con porcentajes de MeOH entre el 5 y el 35 %, como en los métodos descritos en los apartados anteriores. En este caso, se seleccionó una disolución de 25 % de MeOH como portador /eluyente para el tiabendazol.

Se observó que tras inyectar sucesivas veces (más de 6 veces) una muestra (estándar en matriz), la señal analítica disminuía de forma notable y sucesiva tras cada inserción de muestra. Este hecho se podría deber a la retención en el soporte sólido de alguna o algunas especies procedentes de la matriz, que no eran eluidas con las condiciones seleccionadas de portador (25 % MeOH). Para evitar esta disminución de señal, se incorporó en el programa de apertura y cierre de válvulas y en la configuración del sistema un ciclo de lavado con metanol, que permitiese regenerar completamente el soporte sólido tras cada inyección. Se incorporó un ciclo de 60 segundos con MeOH 100 %.

#### ***IV.5.2.1. Optosensor para la determinación de difenilamina en manzanas y peras***

En el método para la difenilamina también se emplearon estándares en matriz para llevar a cabo el estudio de las variables químicas. El procedimiento de extracción y purificación de las muestras es el mismo que para el tiabendazol (Ver apartado IV.9). Gracias a la elevada sensibilidad del que permitía detectar concentraciones de difenilamina entre 5 y 100 ng ml<sup>-1</sup> (estándares en disolvente) en las condiciones óptimas del método, el extracto preparado en acetonitrilo se diluía 1:50 (v/v) con una disolución acuosa con 20 % de MeOH (v:v), lo que permitía simplificar la matriz y aumentar el número de inyecciones sin reemplazar el soporte sólido.

Como se empleó C<sub>18</sub> silica gel, se ensayaron distintas disoluciones de metanol (MeOH) con porcentajes de MeOH entre el 40 y el 60 % para el portador/eluyente. En este caso, se seleccionó una disolución de 50 % de MeOH, ya que porcentajes menores no permitían una elución completa de la difenilamina.

De la misma forma que para el tiabendazol, también en este método se incorporó un ciclo de lavado y regeneración del soporte sólido con 100 % MeOH durante 40 segundos, para eliminar especies procedentes de la matriz que no se eluían en las condiciones del portador (50 % MeOH).

### IV.5.3. Optosensores monoparámetro para la determinación de metales

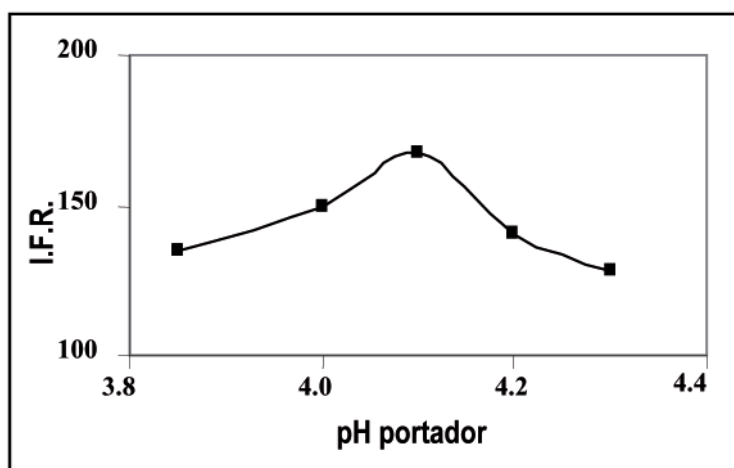
Los métodos desarrollados tanto para Al(III) y para Cd(II) están basados en la retención transitoria del complejo formado entre el ión metálico y un reactivo fluorogénico. En ambos casos, la reacción derivatizadora se produce *on-line* mediante una inyección sincronizada de muestra y reactivo, siendo retenido en el soporte sólido el producto de la reacción. En estos sistemas las variables químicas estudiadas fueron la naturaleza y pH del portador, muestra y eluyente, así como la influencia de la concentración de reactivo fluorogénico.

Para optimizar esta última variable se preparan disoluciones de reactivo a diferentes concentraciones, y se realizan inyecciones de muestra manteniendo fijas el resto de las variables. Se observa que en todos los casos la señal analítica aumenta conforme aumentamos la concentración de reactivo, hasta llegar a un valor en el que la señal analítica se mantiene prácticamente constante. La concentración de reactivo seleccionada en este estudio fue aquella que proporcionó la mayor sensibilidad y que no originaba una elevada señal de fondo, asegurándose que era una cantidad en exceso para todas las concentraciones de muestra de la recta de calibrado.

#### IV.5.3.1. Optosensor para la determinación de Al (III)

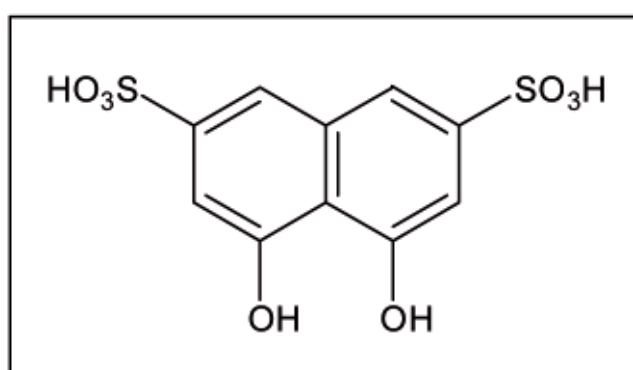
##### (A) NATURALEZA, CONCENTRACIÓN Y PH DEL PORTADOR Y DE LA MUESTRA

El método para la determinación de Al(III) estaba basado en la reacción con ácido cromotrópico. Se realizó un estudio preliminar en modo "batch" para evaluar el pH óptimo de la reacción. De ese estudio se concluyó que el valor óptimo estaba próximo a pH 4. Fijando ese valor de pH en la muestra, se procedió a estudiar (ya empleando el sensor), el pH del portador que proporcionaba una señal óptima. Se realizó el estudio en un rango de pH entre 3.8 y 4.3 empleando disoluciones tampón de ácido fórmico/formiato sódico. Los resultados obtenidos están incluidos en la figura IV.37. Como se puede observar en la gráfica, el mejor resultado se obtuvo para pH 4.1. Este fue el seleccionado para estudios posteriores.



**Figura IV.37.** Estudio del pH del portador para la reacción de Al(III) con ácido cromotrópico. [Al (III) = 100 ng/ml; [CA] = 25 mM.

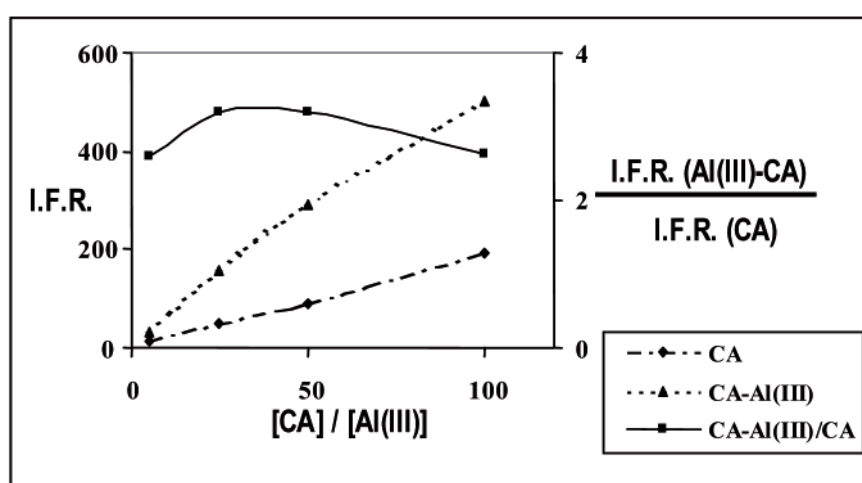
Una vez seleccionado el pH óptimo se estudiaron distintas disoluciones tampón, comparando la señal analítica que se obtenía para cada uno de ellos. Se estudiaron los siguientes tampones: ácido fórmico/formiato sódico, ácido cítrico/citrato sódico y ácido acético/acetato sódico. El sistema que proporcionaba mejores resultados era el ácido fórmico/formiato sódico (HCOOH/HCOONa). Se seleccionó 0.04 M (HCOOH/HCOONa), porque proporcionaba suficiente capacidad amortiguadora y la señal obtenida era mayor que para otras concentraciones de tampón superiores. Este mismo medio también fue seleccionado tanto para la muestra como para el reactivo, con la finalidad de procurar en el sistema de flujo el pH óptimo para que se diese la reacción.



**Figura IV.38.** Estructura del ácido cromotrópico (CA).

## (B) CONCENTRACIÓN DEL REACTIVO FLUOROGÉNICO

El estudio de la concentración óptima de ácido cromotrópico se llevó a cabo con las condiciones de pH óptimas descritas anteriormente. Se estudio un rango de concentración entre 2.5 y 50 mM de ácido cromotrópico (CA), manteniendo fija la concentración de Al(III) inyectada ( $100 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos están recogidos en la Figura IV.39, donde se representa la intensidad de fluorescencia del reactivo y del complejo, así como la razón de intensidad de fluorescencia entre el quelato y el reactivo.



**Figura IV.39.** Estudio de la influencia de la concentración de ácido cromotrópico (CA) para la determinación fluorimétrica de Al (III). Relación  $[CA]/[Al(III)]$  expresada como razón m:m.

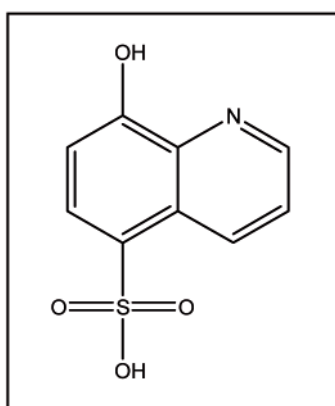
Como se puede apreciar en la figura, al aumentar la concentración de reactivo, aumenta la señal debida al complejo Al(III)-CA, aunque también aumenta la señal debida al blanco (reactivo inyectado en ausencia de analito). De acuerdo con los resultados obtenidos, se seleccionó finalmente 25 mM como concentración óptima de ácido cromotrópico, por el cual la razón señal quelato/señal reactivo es máxima.

#### IV.5.3.2. Optosensor para la determinación de Cd(II)

##### (A) NATURALEZA, CONCENTRACIÓN Y PH DEL PORTADOR, DEL ELUYENTE Y DE LA MUESTRA

Para el optosensor de Cd(II) se procedió de manera similar a la del Al (III). El método para la determinación de Cd(II) estaba basado en la reacción con ácido 8-hidroxí-5-quinolin sulfónico (8-HQS). Se realizó un estudio preliminar en disolución

en modo "batch" para evaluar el pH óptimo para que se llevara a cabo la reacción. Se exploró un intervalo de pH entre 6 y 9, empleando disoluciones tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  de concentración 0.02 M. De ese estudio se concluyó que el valor óptimo para la reacción era pH 7.4, valor en el que la señal del complejo era máxima. A continuación, se procedió a estudiar (también en modo batch) la concentración óptima de tampón en el intervalo entre 0.01 M y 0.05 M. Se seleccionó finalmente 0.02 M de concentración para el tampón  $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  para la muestra.



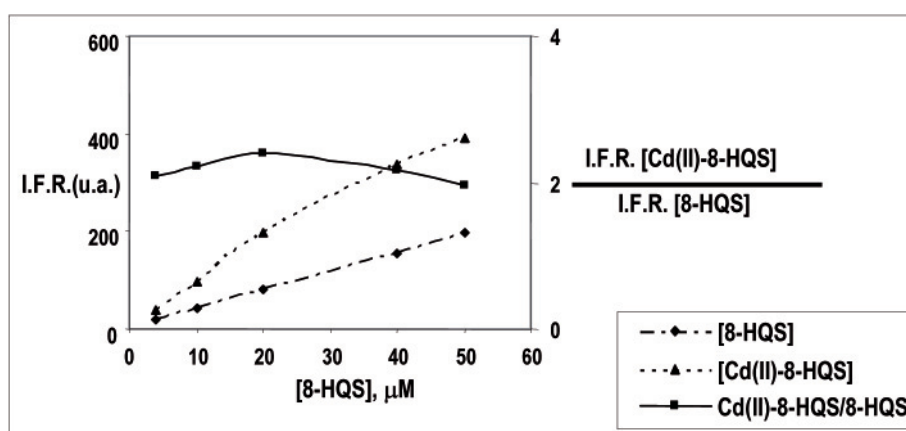
**Figura IV.40.** Estructura del ácido 8-hidoxi-5-quinolin-sulfónico(8-HQS).

Fijando ese valor de pH en la muestra, se procedió a estudiar (ya empleando el sensor), el pH del portador, que proporcionaba una señal óptima. Se realizó el estudio en un rango de pH entre 1 y 8, ya que el reactivo empleado (8-HQS) presenta dos equilibrios ácido-base y por tanto, dos valores de  $\text{pK}_a$ . Presenta un grupo sulfónico ( $\text{pK}_a$  2.2), con el que el ligando interacciona con la resina de intercambio iónico empleada (Sephadex QAE-A25). Además, presenta la parte que proviene de la oxina (8-hidroxiquinolina) ( $\text{pK}_a$  alrededor de 7), por donde el ligando interacciona con los iones metálicos para formar complejos. Por tanto, la reacción se debe realizar a valores aproximadamente de pH 7, pero sin embargo la retención transitoria en el intercambiador iónico y posterior elución del quelato se produce por el grupo sulfónico, por lo que la elución se debe realizar a pH ácidos (pH entre 1 y 3.5). Valores de pH por encima de 4, no permitían la elución del complejo  $\text{Cd(II)-8-HQS}$ . Por otra parte, empleando portadores con valores de pH bajos (pH  $\leq$  1), la retención transitoria del complejo y su posterior elución era demasiado rápida, obteniéndose señales muy bajas. Como solución de compromiso entre elución apropiada del complejo, rapidez y sensibilidad se escogió un valor de pH 2, empleando una disolución acuosa de HCl. Para facilitar una regeneración completa del sensor tras cada medida, se incorporó en el procedimiento la inyección de un volumen de 500 ml de disolución acuosa de HCl (pH 1), ya que esta cantidad era adecuada para

eluir completamente el complejo, y dejar preparada la fase sólida para la siguiente inyección de muestra.

## (B) CONCENTRACIÓN DEL REACTIVO FLUOROGÉNICO

El estudio de la influencia de la concentración óptima de 8-HQS se llevó a cabo con las condiciones de pH óptimas descritas anteriormente. Se estudio un rango de concentración entre 4 y 50 mM de 8-HQS, manteniendo fija la concentración de Cd(II) inyectada ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ). Los resultados obtenidos en este estudio se muestran en la siguiente gráfica. De igual modo que para el sensor de Al(III), se encontró que a mayor concentración de reactivo, aumentaba la señal debida al complejo Cd(II)-8-HQS, aunque también aumenta la señal debida al blanco (reactivo inyectado en ausencia de analito). De acuerdo con los resultados obtenidos, finalmente se seleccionó 20 mM como concentración óptima de reactivo fluorogénico. Las condiciones de pH y concentración de tampón para la disolución de 8-HQS seleccionadas fueron las mismas que las descritas para la muestra.



**Figura IV.41.** Estudio de la influencia de la concentración de ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico (8-HQS) para la determinación fluorimétrica de Cd (II).

### IV.5.4. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno

En este sensor, las variables químicas fueron estudiadas en paralelo con otras variables que también influían en la separación de los dos analitos, como el soporte sólido seleccionado y el nivel de soporte en la célula de flujo. En este caso, el pH de la muestra era muy importante para permitir una separación completa entre el naproxeno y el ácido salicílico, ya que ambas moléculas son ácidos orgánicos con valores de  $pK_a$  de 2.8 y 4.8 para el ácido salicílico y el naproxeno respectivamente.

Las estructuras de ambos compuestos se encuentran representadas en la sección I.5 de esta Memoria.

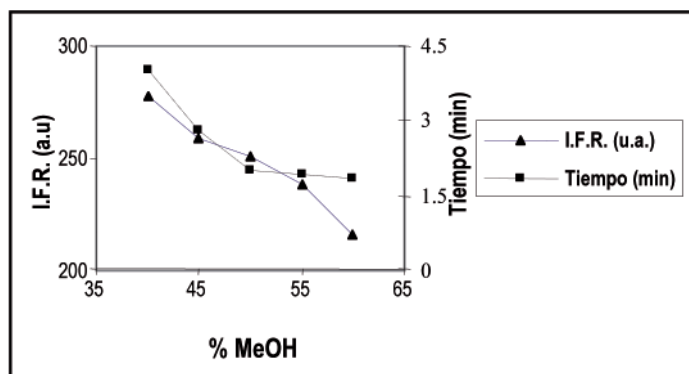
### **(a) Influencia del pH de la muestra**

Teniendo en cuenta el soporte sólido empleado ( $C_{18}$  silica gel), las estructuras de ambos compuestos y los valores de  $pK_a$ , se optimizó el valor de pH de la muestra para llevar a cabo la separación en el intervalo de pH 2-5 empleando agua destilada como portador. Se comprobó que para el naproxeno, no había variaciones sustanciales de comportamiento en ese intervalo de pH ya que se retenía fuertemente en el soporte sólido en todo el intervalo. En cambio, para el ácido salicílico si se observaban importantes cambios a esos valores de pH. Su señal disminuía al aumentar el valor de pH a partir de 4, probablemente debido a que la especie que más abunda en esas condiciones de pH es el ácido en forma desprotonada, que presenta una menor retención en el soporte sólido. En cambio, para valores por debajo de 3 (pH 2), la retención del ácido salicílico en el soporte sólido aumentaba, no pudiéndose separar del naproxeno con el uso de una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo. Por esto, finalmente se seleccionó como medio para la muestra un valor de pH 3, ya que tanto la señal analítica, como la separación de las especies eran óptimas. Se seleccionó un tampón ácido cítrico/hidróxido sódico (pH 3, 0.04 M) como medio óptimo de la muestra para llevar a cabo la separación.

### **(b) Naturaleza y concentración de portador y eluyente**

El estudio del portador adecuado para la retención transitoria y elución del ácido salicílico se realizó en un intervalo de pH entre 2 y 7. Se comprobó que valores de  $pH \leq 4$  daban lugar a señales transitorias para el ácido salicílico con largas colas, empeorando la separación y la frecuencia de muestro, mientras que con valores por encima de pH 5, la señal disminuía notablemente. Finalmente se seleccionó como portador para la retención y elución de ácido salicílico pH 5 (tampón ácido acético/acetato sódico pH 5, 0.04 M).

El estudio del eluyente adecuado para la retención transitoria y elución del naproxeno se llevó a cabo con disoluciones con un porcentaje de MeOH entre el 30 y el 60 % (v:v). A valores mayores de % de MeOH, el tiempo de análisis era menor aunque la señal disminuía también. Por otra parte valores de 45 % de MeOH o menores no producían una elución completa del naproxeno. Finalmente se seleccionó como eluyente un 50 % de MeOH.



**Figura IV.42.** Estudio del porcentaje de MeOH del eluyente para la determinación de naproxeno y ácido salicílico: influencia del porcentaje de MeOH en la señal analítica y en el tiempo de análisis.

A continuación se muestra un resumen de las variables químicas seleccionadas más relevantes para cada uno de los sensores descritos en esta Memoria:

**Tabla IV.5.** Resumen de las variables químicas seleccionadas para cada método

| Optosensor                             | Variables químicas seleccionadas                                                                      |
|----------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Benomilo-Carbendazima</b>           | Muestra: HCl 1.5 M; portador: MeOH 15 %;<br>eluyente: 65 % MeOH                                       |
| <b>Tiabendazol-o-Fenilfenol</b>        | Muestra: HCl 0.5 M; portador: MeOH 20 %;<br>eluyente: 50 % MeOH                                       |
| <b>Benomilo-Carbarilo-Fuberidazole</b> | Muestra: HCl 1.5 M; portador: MeOH 30 %;<br>eluyente 1: 55 % MeOH %; eluyente 2: 75 % MeOH.           |
| <b>Tiabendazol (cítricos)</b>          | Muestra: dilución 1:10 (10 % acetonitrilo) ; portador: MeOH 25 %;<br><br>Limpieza: 100 % MeOH (40 s.) |
| <b>Difenilamina</b>                    | Muestra: dilución 1:50 (20 % MeOH) ;<br>portador: MeOH 50 %; limpieza: 100 % MeOH (60 s.)             |
| <b>Al (III)</b>                        | Muestra y portador : pH 4.1 (0.04 M HCOOH; HCOONa);<br>[Ácido cromotrópico]: 25 µM                    |
| <b>Cd (II)</b>                         | Muestra: pH 7.4 (0.02 M fosfato); portador: pH 2 (HCl);<br>Eluyente: pH 1 (HCl); [8-HQS]: 20 µM       |
| <b>Ácido salicílico-Naproxeno</b>      | Muestra: pH 3 (0.04 M ácido cítrico/NaOH);<br>portador: pH 5 (AcOH/AcONa 0.04 M; eluyente: 50 % MeOH  |

#### IV.6. VARIABLES HIDRODINÁMICAS DEL SISTEMA DE FLUJO

En este apartado hay que considerar las diferencias entre los métodos desarrollados que emplean sistemas de flujo FIA convencionales (cinco) de los que usan válvulas solenoide y multiconmutación (tres). Con la válvula rotatoria de seis puertos sólo es posible introducir el volumen de muestra correspondiente al bucle. Sin embargo, en el modo de multiconmutación con válvulas solenoide de tres vías, el volumen de muestra a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Por tanto, en los métodos FIA, la inyección se puede considerar como de volumen constante, mientras que en los sistemas empleando multiconmutación se trata de una inyección en función del tiempo. Por esto, en los optosensores en flujo que emplean multiconmutación hay que optimizar el tiempo de inserción, lo que permite desarrollar métodos de inserción de muestra basados en el tiempo. Otra consecuencia es que la sensibilidad del

método dependerá de forma directa tanto del tiempo de inserción de muestra como del caudal.

Por tanto, se describirán por separado los sistemas desarrollados empleando FIA y multiconmutación.

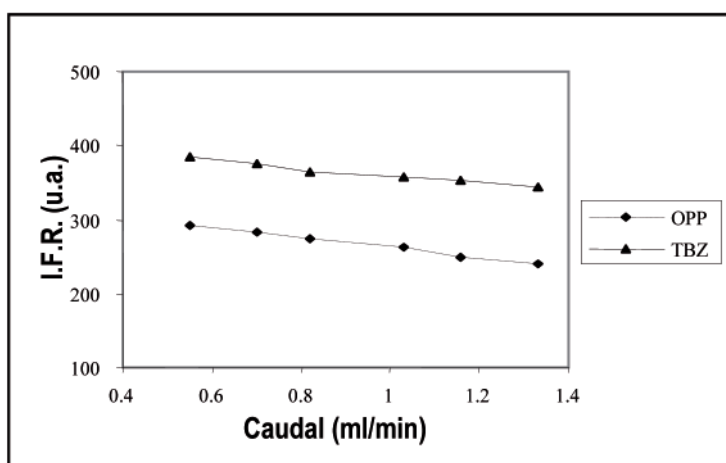
#### IV.6.1. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo en los optosensores con metodología FIA

Empleando las variables químicas seleccionadas anteriormente, se procedió a realizar el estudio de las variables del sistema de flujo: caudal, volumen de muestra inyectado y longitud del reactor (en el caso de que éste sea necesario). Estos estudios se llevaron a cabo manteniendo constante el diámetro interno de los tubos de bomba.

##### IV.6.1.1. Caudal

El efecto del caudal se estudió inyectando disoluciones de los analitos a diferentes caudales, los cuales se obtenían incrementando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. En este estudio se observa que al aumentar la velocidad de giro de la bomba, es decir al aumentar el caudal, disminuye la altura de los picos y los tiempos de residencia, por lo que hemos de adoptar una solución de compromiso que proporcione buenas señales analíticas y una frecuencia de muestreo aceptable.

A modo de ejemplo se muestra el estudio de la influencia del caudal en el optosensor tiabendazol/o-fenilfenol.



**Figura IV.43.** Estudio de la influencia del caudal sobre la señal analítica en la determinación de tiabendazol (TBZ) y o-fenilfenol (OPP).

A continuación se muestra un resumen con los caudales seleccionados para cada sensor desarrollado:

**Tabla IV.6.** Resumen de los caudales seleccionados para los optosensores basados en metodología FIA

| Optosensor                     | Intervalo estudiado<br>(ml min <sup>-1</sup> ) | Caudal (ml min <sup>-1</sup> ) |
|--------------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| Benomilo-Carbendazima          | 0.45-1.56                                      | 1.05                           |
| Tiabendazol-o-Fenilfenol       | 0.55-1.33                                      | 1.16                           |
| Benomilo-Carbarilo-Fuberidazol | 0.5-1.10                                       | 1.00                           |
| Al (III)                       | 0.66-1.40                                      | 1.26                           |
| Cd (II)                        | 0.66-1.15                                      | 1.00                           |

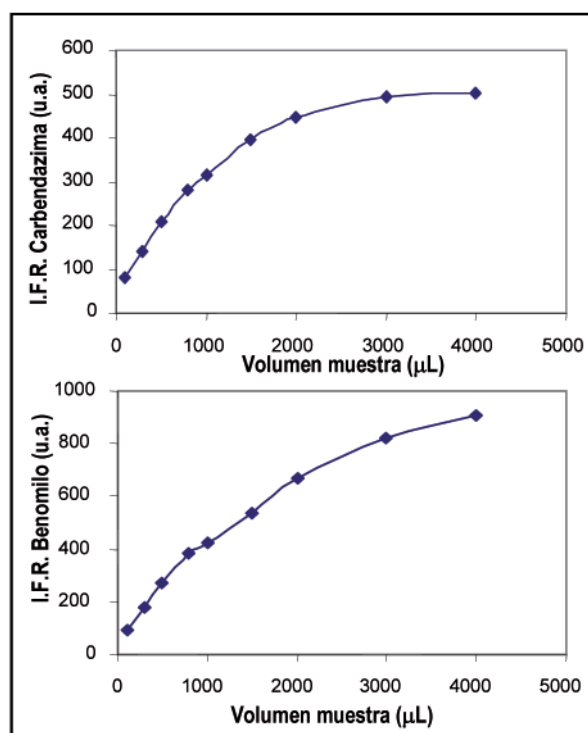
#### IV.6.1.2. Volumen de muestra inyectado

Para establecer la influencia del volumen de muestra en la determinación de cada uno de los analitos, se modifica el volumen de inyección mediante la utilización de bucles de volúmenes diferentes.

Se producirá un incremento de sensibilidad al incrementar el volumen de muestra usado para el análisis. Este aumento es lineal hasta un determinado volumen, por encima del cual la señal analítica tiende a estabilizarse.

Esta dependencia de la señal con el volumen aumenta la versatilidad del optosensor ya que permite trabajar con amplios márgenes de concentraciones de los analitos, con solo variar el volumen de muestra inyectado. El uso de un volumen de inyección grande se traduce en un aumento de la sensibilidad, debido a que se fija una mayor cantidad de analito sobre la misma masa de soporte sólido. El único inconveniente de usar grandes volúmenes de muestra es que se requiere un mayor tiempo para cada determinación, con lo que se produce una disminución en la frecuencia de muestreo.

Este estudio se realizó manteniendo las condiciones de trabajo previamente optimizadas, para cada analito por separado. Como ejemplo se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del volumen de muestra para el sensor biparámetro para la determinación de benomilo y carbendazima.



**Figura IV.44.** Influencia del volumen de muestra en la señal analítica para el optosensor biparámetro para la determinación de carbendazima y benomilo.

Una vez establecido el intervalo en el que la señal analítica es lineal con el volumen de inyección se seleccionan los volúmenes con los que posteriormente se lleva a cabo la calibración. Generalmente, se suelen elegir dos volúmenes de inyección con los que calibrar el método, consiguiendo para uno de ellos buena frecuencia de muestreo, y para el otro, una buena sensibilidad, ampliando así el intervalo de concentración del método.

La siguiente tabla muestra el intervalo de linealidad y los volúmenes seleccionados para la calibración de cada optosensor.

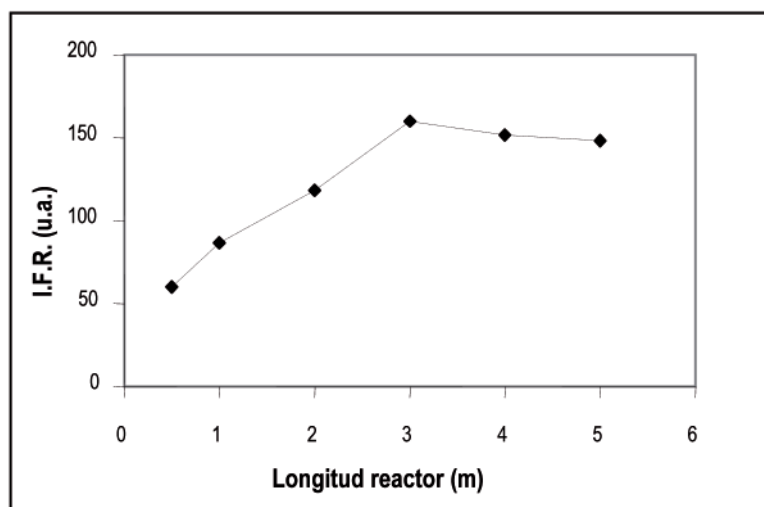
**Tabla IV.7.** Influencia del volumen de muestra inyectado en los optosensores que empleaban un sistema FIA convencional

| Sensor                               | Intervalo de volumen estudiado | Intervalo de volumen lineal                           | Volumen(es) seleccionado(s) |
|--------------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------------------------|-----------------------------|
| Benomilo<br>Carbendazima             | 200-3000 $\mu$ l               | 200-1000 $\mu$ l (BNM y CBZ)                          | 400 y 2000 $\mu$ l          |
| Tiabendazol<br>o-Fenilfenol          | 200-3000 $\mu$ l               | 200-1000 $\mu$ l<br>200-3000 $\mu$ l                  | 400 y 2600 $\mu$ l          |
| Benomilo<br>Carbarilo<br>Fuberidazol | 200-3000 $\mu$ l               | 200-3000 $\mu$ l (FBZ y CBL) y 200-2000 $\mu$ l (BNM) | 600 y 2100 $\mu$ l          |
| Al (III)                             | 200-2000 $\mu$ l               | 200-900 $\mu$ l                                       | 900 $\mu$ l                 |
| Cd (II)                              | 200-1100 $\mu$ l               | 200-900 $\mu$ l                                       | 900 $\mu$ l                 |

**IV.6.1.3. Longitud del reactor**

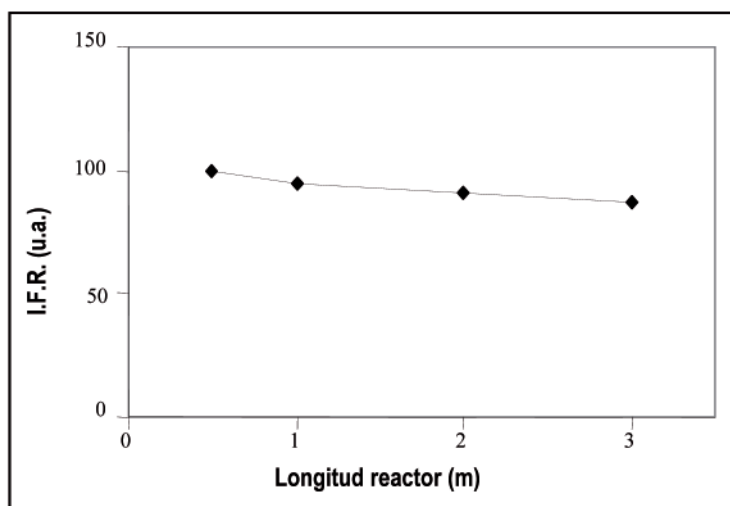
Solo en dos de los optosensores descritos en esta Memoria se requiere *a priori* de un reactor, para que se desarrollen reacciones derivatizadoras *on line*, antes de la llegada del analito a la zona de detección: los sensores para Al(III) y Cd(II). Se prepararon distintas longitudes de reactor con las condiciones químicas óptimas y el resto de variables FIA previamente estudiadas. En ambos casos, se empleó tubo de Teflón de 0.8 mm de diámetro interno para preparar los reactores empleados.

En el caso del Al(III), la influencia de la longitud del reactor se estudió entre 0.5 y 5 m. A mayor longitud de reactor, la señal analítica aumentaba, hasta un valor de longitud a partir del cual no se producía un aumento de la señal. En este caso, en vista de los resultados que se muestran en la siguiente figura, se seleccionó un reactor de 3 m de longitud como valor óptimo para el método.



**Figura IV.45.** Estudio del efecto de la longitud del reactor para la determinación de Al (III).

Para el caso del Cd (II), los resultados obtenidos fueron completamente distintos. En concreto, la variación de la longitud del reactor no modificaba sustancialmente la respuesta del sensor, lo cual indica que las reacciones son prácticamente completas en un pequeño intervalo tiempo. Por tanto, se opta por un reactor lo más corto posible con objeto de obtener una buena frecuencia de muestreo. Se eligió en este caso un reactor de 50 cm.



**Figura IV.46.** Estudio del efecto de la longitud del reactor para la determinación de Cd (II).

### IV.6.2. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo en los optosensores con multiconmutación

En los sistemas basados en multiconmutación, la inserción de muestra se realiza a tiempo fijo. Esto conlleva que el volumen de muestra insertado vendrá determinado por el tiempo en el que la válvula correspondiente está abierta así como del caudal escogido.

En este caso, primero se seleccionó el valor de caudal máximo que hiciese que la señal fuese mayor (a tiempo de inserción de muestra constante) sin que se generasen problemas de sobrepresiones en el sistema. A continuación se estudió el tiempo de inserción de muestra, empleando el flujo previamente seleccionado. Esto fue aplicado en los tres sistemas basados en multiconmutación descritos en esta memoria.

#### IV.6.2.1. Estudio del caudal

En la siguiente tabla se muestran los valores de caudal seleccionados para los distintos optosensores que se desarrollaron empleando multiconmutación.

**Tabla IV.8.** Resumen de los caudales seleccionados para los optosensores basados en multiconmutación.

| Optosensor                 | Intervalo estudiado<br>(ml min <sup>-1</sup> ) | Caudal (ml min <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------|------------------------------------------------|--------------------------------|
| Tiabendazol                | 0.5 - 1.2                                      | 1.0                            |
| Difenilamina               | 0.5 - 1.2                                      | 1.1                            |
| Ácido salicílico-Naproxeno | 0.6 - 1.2                                      | 1.2                            |

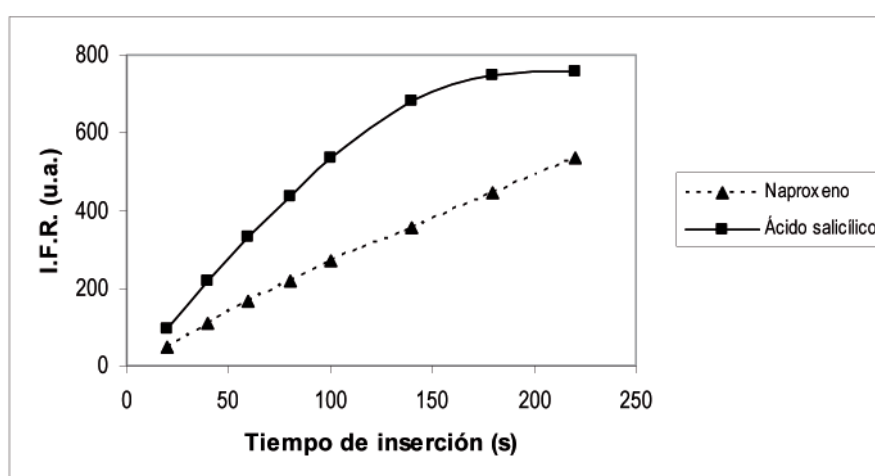
#### IV.6.2.2. Estudio del tiempo de inserción de muestra

En la siguiente Tabla, se muestran los resultados obtenidos en el estudio del tiempo de inserción de muestra para cada uno de los tres métodos desarrollados.

**Tabla IV.9.** Tiempo de inserción de muestra en sistemas basados en multiconmutación

| Optosensor                | Intervalo de tiempo de inserción estudiado | Tiempo de inserción seleccionado |
|---------------------------|--------------------------------------------|----------------------------------|
| Tiabendazol               | 0-80 s.                                    | 40 s.                            |
| Difenilamina              | 0-100 s.                                   | 80 s.                            |
| A. salicílico / Naproxeno | 0-300 s.                                   | 120 s.                           |

Este estudio se realizó manteniendo las condiciones de trabajo previamente optimizadas, para cada analito por separado. Como ejemplo, se muestran los resultados obtenidos en el estudio de la influencia del tiempo de inserción de muestra para el sensor biparámetro para la determinación de naproxeno y ácido salicílico. Para este sensor, se seleccionó un tiempo de inserción de 120 s.

**Figura IV.47.** Influencia del tiempo de inserción de muestra en la señal analítica para el optosensor biparámetro para la determinación de naproxeno y ácido salicílico. [AS]: 175 ng ml<sup>-1</sup>; [NPX]: 10 ng ml<sup>-1</sup>.

Los tiempos de inserción seleccionados permitían unos calibrados con una sensibilidad e intervalos dinámicos adecuados, para las aplicaciones previstas en estos métodos.

#### **IV. 7. CALIBRACIÓN DE LOS OPTOSENSORES: PARÁMETROS ANALÍTICOS**

Se emplea calibración univariante en todos los sensores propuestos. La calibración univariante utiliza relaciones sencillas entre los datos independientes, entendidos como los valores de concentración, y los datos dependientes, siendo éstos las señales analíticas (intensidad relativa de fluorescencia).

En los métodos univariantes se resuelve una única ecuación basada en una única señal analítica para predecir la concentración. Uno de los métodos más simples es la regresión lineal, en el que la señal analítica se relaciona con las concentraciones de los constituyentes mediante una ecuación polinómica de primer grado. El método más empleado es la regresión lineal por mínimos cuadrados, que se emplea para resolver la ecuación del modelo relacionando los datos de la señal analítica con concentraciones conocidas de los constituyentes.

Se comprueba la existencia de una relación lineal entre la señal analítica y la concentración de cada uno de los analitos a determinar. Para ello se construyen, a las condiciones óptimas de trabajo en cada caso, las funciones de calibrado, consistentes en la representación de las parejas de datos señal analítica-concentración.

Para determinar las funciones de calibrado, las variables químicas, FIA e instrumentales se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, y se inyectaron volúmenes iguales de disoluciones patrón de los analitos de diferente concentración (generalmente, cada inyección por triplicado), registrándose las correspondientes señales analíticas.

En el desarrollo de cada sensor también se estudiaron los parámetros analíticos: la repetitividad, límites de detección y cuantificación, y frecuencia de muestreo.

##### **Repetitividad**

Con objeto de evaluar la repetitividad del método propuesto, para cada sensor se realizan inyecciones sucesivas de diez disoluciones de cada analito de igual concentración con el/los volumen/es de muestra seleccionado/s en cada caso, midiendo la intensidad de fluorescencia relativa. Un análisis estadístico de los datos proporciona la desviación estándar relativa (RSD) para cada sensor.

### Límite de detección y cuantificación

Por el término "límite de detección" de una magnitud se entiende al valor mínimo de la misma que puede afirmarse que es distinto de cero. En nuestro caso la magnitud medida es la señal analítica (intensidad relativa de fluorescencia),  $Y$ . Denominaremos  $Y_L$  al límite de detección de esta magnitud, el cual corresponde a la incertidumbre sobre el valor de  $Y$  cuando ésta tiende a cero. Según el caso,  $Y_L$  es igual bien al límite de sensibilidad del aparato de medida, bien a la incertidumbre sobre los errores sistemáticos, o bien, a la incertidumbre sobre la precisión de los resultados.

Cuando  $Y$  es igual a  $Y_L$ , es decir cuando el error absoluto sobre la medida se iguala a la magnitud a determinar, entonces el valor obtenido  $Y$  cumple:

$$0 \leq Y \leq Y_b + 3\sigma$$

donde:

$Y_b$ : señal analítica media obtenida para el blanco

$\sigma$ : desviación estándar para el blanco

Se admite como límite de detección el valor [295]:

$$Y_L = Y_b + 3\sigma$$

El límite de detección en términos de concentración,  $c_L$ , se obtendrá usando la función de calibrado:

$$c_L = (Y_L - Y_b) / m = 3\sigma / m$$

siendo  $m$  la pendiente de la recta de calibrado.

Conforme la señal analítica ( $Y$ ) crece por encima del límite de detección, crece la concentración aparente del analito. Como criterio mínimo, la región de cuantificación debe estar claramente por encima del límite de detección.

Se admite la siguiente definición [296]:

$$Y_Q = Y_b + 10\sigma$$

donde:

$Y_Q$ : señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

$Y_b$ : señal analítica obtenida para el blanco.

$\sigma$ : desviación estándar para el blanco.

El límite de cuantificación en términos de concentración,  $c_Q$ , se obtendrá a partir de la función de calibrado:

$$C_Q = (Y_Q - Y_b) / m = 10\sigma / m$$

donde  $m$  es la pendiente de la recta de calibrado.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se inyectó en cada caso diez veces sucesivas el blanco, es decir, muestras que contenían todos los componentes excepto el/los analito/s, registrándose las señales analíticas a las longitudes de onda de trabajo para los volúmenes de inyección seleccionados.

### **Frecuencia de muestreo**

La frecuencia de muestreo da una idea de la velocidad de análisis, indicando el número de muestras que se pueden analizar en una hora con los sensores propuestos.

Las variables FIA (longitud de reactor, caudal y volumen de muestra inyectado) influyen en este parámetro, de forma que cuanto menor sea la longitud del reactor (en los casos en los que sea necesario), mayor sea el caudal, y menor el volumen de muestra, mayor será la frecuencia de muestreo o velocidad de análisis.

Los resultados obtenidos para cada uno de los optosensores descritos y para cada uno de los volúmenes de inyección propuestos se muestran a continuación.

**IV.7.1. Optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas.****IV.7.1.1. Optosensor para la determinación de benomilo y carbendazima****Tabla IV.10.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor biparámetro para la determinación de benomilo y carbendazima.

| Parámetro                                      | Carbendazima             |                         | Benomilo               |                         |
|------------------------------------------------|--------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|
|                                                | Volumen de muestra (μl)  |                         |                        |                         |
|                                                | 400                      | 2000                    | 400                    | 2000                    |
| Intervalo dinámico lineal /μg ml <sup>-1</sup> | 0.25 - 5.00              | 0.05 -1.00              | 0.15 - 3.00            | 0.02 – 0.50             |
| Recta de calibrado                             |                          |                         |                        |                         |
| O. origen                                      | 19.9                     | 14.5                    | 13.6                   | 6.90                    |
| Pendiente ml μg <sup>-1</sup>                  | 73.7                     | 325                     | 154                    | 849                     |
| Coef. de correlación (r)                       | 0.9966                   | 0.9986                  | 0.9990                 | 0.9998                  |
| Límite de detección / ng ml <sup>-1</sup>      | 30                       | 7.5                     | 15                     | 3.0                     |
| Límite cuantificación / ng ml <sup>-1</sup>    | 100                      | 25                      | 50                     | 10                      |
| Desviación estándar relativa (%)<br>(n=10)     | 1.34 (1.00) <sup>a</sup> | 1.91(0.50) <sup>a</sup> | 1.14(1.0) <sup>a</sup> | 1.54(0.50) <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo(h <sup>-1</sup> )       | 19                       | 13                      | 19                     | 13                      |

<sup>a</sup> (Nivel de concentración,  $\mu\text{g ml}^{-1}$ )

**IV.7.1.2. Optosensor para la determinación de tiabendazol y ortofenilfenol****Tabla IV.11.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor biparámetro para la determinación de tiabendazol y o-fenilfenol.

| Parámetro                                              | Tiabendazol             |                       | o-Fenilfenol           |                        |
|--------------------------------------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|------------------------|
|                                                        | Volumen de muestra (μl) |                       |                        |                        |
|                                                        | 400                     | 2600                  | 400                    | 2600                   |
| Intervalo dinámico lineal /ng ml <sup>-1</sup>         | 2 – 100                 | 0.5 – 16              | 20 – 500               | 5 – 120                |
| Recta de calibrado                                     |                         |                       |                        |                        |
| O. origen                                              | 1.5                     | 10                    | 1.2                    | 2.5                    |
| Pendiente (ml ng <sup>-1</sup> )                       | 7.26                    | 44.9                  | 1.42                   | 6.36                   |
| Coef. de correlación (r)                               | 0.9984                  | 0.9995                | 0.9998                 | 0.9998                 |
| L. de detección / ng ml <sup>-1</sup>                  | 0.45                    | 0.09                  | 2.4                    | 0.60                   |
| L. de cuantificación / ng ml <sup>-1</sup>             | 1.5                     | 0.3                   | 8.0                    | 2.0                    |
| Desviación estándar relativa (%) (n=10)                | 1.22(40) <sup>a</sup>   | 0.64(15) <sup>a</sup> | 0.94(300) <sup>a</sup> | 1.04(100) <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | 17                      | 11                    | 17                     | 11                     |

<sup>a</sup> (nivel de concentración, ng ml<sup>-1</sup>)<sup>b</sup> frecuencia de muestreo para la determinación simultánea

### IV.7.1.3. Optosensor para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol

**Tabla IV.12.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor triparámetro para la determinación de benomilo (BNM), carbarilo (CBL) y fuberidazol (FBZ).

| Parámetro                                       | FBZ                    | CBL                     | BNM                      |
|-------------------------------------------------|------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Intervalo dinámico lineal / ng ml <sup>-1</sup> | 0.5 -15                | 40 - 800                | 50 - 1000                |
| <i>Recta de calibrado</i>                       |                        |                         |                          |
| Ordenada en el origen                           | - 2.0                  | - 2.7                   | 4.1                      |
| Pendiente / ml ng <sup>-1</sup>                 | 46.8                   | 0.857                   | 0.402                    |
| Coefficiente de correlación                     | 0.9999                 | 0.9994                  | 0.9994                   |
| Límite de detección / ng ml <sup>-1</sup>       | 0.09                   | 6.0                     | 9                        |
| Límite de cuantificación / ng ml <sup>-1</sup>  | 0.30                   | 20                      | 30                       |
| Desviación estándar relativa (%) (n= 10)        | 1.33 (10) <sup>a</sup> | 1.54 (600) <sup>a</sup> | 1.80 (1000) <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> )       |                        | 7 <sup>b</sup>          |                          |

<sup>a</sup> (nivel de concentración, ng ml<sup>-1</sup>)

<sup>b</sup> Frecuencia de muestreo para la determinación simultánea de los tres analitos

### IV.7.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios para tratamiento post-cosecha

En los optosensores para tiabendazol y difenilamina, se llevó a cabo un calibrado en matriz, empleando patrones preparados con extractos de las muestras a analizar (naranjas y limones (tiabendazol) y peras y manzanas (difenilamina)). De esta forma se tenían en cuenta posibles diferencias entre los parámetros analíticos para cada una de las matrices.

#### IV.7.2.1. Optosensor para la determinación de tiabendazol en cítricos

**Tabla IV.13.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor para la determinación de tiabendazol en cítricos

| Parámetro                                       | Naranja          | Limón            |
|-------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Intervalo dinámico lineal / mg kg <sup>-1</sup> | 0.3 – 10         | 0.3 – 10         |
| <i>Recta de calibrado</i>                       |                  |                  |
| Ordenada en el origen                           | -5.7             | -4.6             |
| Pendiente / kg mg <sup>-1</sup>                 | 60.4             | 40.0             |
| Coefficiente de correlación (r)                 | 0.9994           | 0.9996           |
| Límite de detección / mg kg <sup>-1</sup>       | 0.09             | 0.09             |
| Límite de cuantificación / mg kg <sup>-1</sup>  | 0.3              | 0.3              |
| Desviación estándar relativa (%) (n= 10)        | 1.4 <sup>a</sup> | 1.9 <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> )       | 14               |                  |

<sup>a</sup> nivel de concentración: 2 mg kg<sup>-1</sup>.

#### IV.7.2.2. Optosensor para la determinación de difenilamina en manzanas y peras

**Tabla IV.14.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor para la determinación de difenilamina en peras y manzanas

| Parámetro                                       | Manzanas         | Peras            |
|-------------------------------------------------|------------------|------------------|
| Intervalo dinámico lineal / $\text{mg kg}^{-1}$ | 0.25 – 5         | 0.25 – 5         |
| <i>Recta de calibrado</i>                       |                  |                  |
| Ordenada en el origen                           | 1.9              | 0.96             |
| Pendiente / $\text{kg mg}^{-1}$                 | 131              | 126              |
| Coeficiente de correlación                      | 0.9991           | 0.9998           |
| Límite de detección / $\text{mg kg}^{-1}$       | 0.06             | 0.06             |
| Límite de cuantificación / $\text{mg kg}^{-1}$  | 0.2              | 0.2              |
| Desviación estándar relativa (%) ( $n= 10$ )    | 1.5 <sup>a</sup> | 1.8 <sup>a</sup> |
|                                                 | 2.4 <sup>b</sup> | 2.2 <sup>b</sup> |
| Frecuencia de muestreo ( $\text{h}^{-1}$ )      | 12               |                  |

<sup>a</sup> nivel de concentración:  $3 \text{ mg kg}^{-1}$

<sup>b</sup> nivel de concentración:  $1 \text{ mg kg}^{-1}$

### IV.7.3. Optosensores monoparámetro para la determinación de metales

#### IV.7.3.1. Optosensor para la determinación de Al (III)

**Tabla IV.15.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor para la determinación de Al(III).

| Parámetro                                        | Al (III)                |
|--------------------------------------------------|-------------------------|
| Intervalo dinámico lineal (ng ml <sup>-1</sup> ) | 10-500                  |
| <i>Recta de calibrado</i>                        |                         |
| Ordenada en el origen                            | 11                      |
| Pendiente (ml ng <sup>-1</sup> )                 | 1.38                    |
| Coefficiente de correlación                      | 0.9992                  |
| Límite de detección (ng ml <sup>-1</sup> )       | 2.6                     |
| Límite de cuantificación(ng ml <sup>-1</sup> )   | 8.6                     |
| Desviación estándar relativa (%) (n=10)          | 2.18 (200) <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> )        | 24                      |

<sup>a</sup> (nivel de concentración, ng ml<sup>-1</sup>)

**IV.7.3.2. Optosensor para la determinación de Cd(II)****Tabla IV.16.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor para la determinación de Cd(II).

| Parámetro                                                   | Cd (II)                |
|-------------------------------------------------------------|------------------------|
| Intervalo dinámico lineal (ng ml <sup>-1</sup> )            | 2-60                   |
| <i>Recta de calibrado</i>                                   |                        |
| Ordenada en el origen                                       | 6.6                    |
| Pendiente (ml ng <sup>-1</sup> )                            | 12.0                   |
| Coeficiente de correlación (r)                              | 0.9982                 |
| Límite de detección (ng ml <sup>-1</sup> )                  | 0.48                   |
| Límite de cuantificación(ng ml <sup>-1</sup> )              | 1.6                    |
| Desviación estándar relativa (%) (n=10)                     | 1.9 (25 <sup>a</sup> ) |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> )                   | 16                     |
| <sup>a</sup> (nivel de concentración, ng ml <sup>-1</sup> ) |                        |

#### IV.7.4. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno

**Tabla IV.17.** Resumen de los parámetros analíticos del optosensor para la determinación simultánea de ácido salicílico y naproxeno.

| Parámetro                                              | Ácido salicílico       | Naproxeno             |
|--------------------------------------------------------|------------------------|-----------------------|
| Intervalo dinámico lineal / ng ml <sup>-1</sup>        | 5 - 250                | 1 - 25                |
| <i>Recta de calibrado</i>                              |                        |                       |
| Ordenada en el origen                                  | 7.8                    | -1.2                  |
| Pendiente / ml ng <sup>-1</sup>                        | 3.51                   | 31.5                  |
| Coefficiente de correlación                            | 0.9974                 | 0.9987                |
| Límite de detección/ ng ml <sup>-1</sup>               | 1.3                    | 0.3                   |
| Límite de cuantificación / ng ml <sup>-1</sup>         | 4.0                    | 1.0                   |
| Desviación estándar relativa (%) (n= 10)               | 1.4 (100) <sup>a</sup> | 0.9 (10) <sup>a</sup> |
| Frecuencia de muestreo (h <sup>-1</sup> ) <sup>b</sup> | 8                      |                       |

<sup>a</sup> Nivel de concentración, ng ml<sup>-1</sup>

<sup>b</sup> Frecuencia de muestreo para la determinación simultánea

#### IV.8. ESTUDIO DEL EFECTO DE POSIBLES ESPECIES INTERFERENTES

Una vez establecidos los parámetros analíticos, procede evaluar la selectividad que presenta cada uno de los optosensores desarrollados.

Se lleva a cabo un análisis de la interferencia que puede producirse por la presencia de distintas concentraciones de especies interferentes en la disolución. Las especies que se han ensayado para cada caso son aquellas que más frecuentemente acompañan a los analitos en las muestras a las que se va a aplicar el sensor desarrollado.

Se emplean disoluciones que contienen los analitos correspondientes y cantidades variables de la especie cuyo efecto se pretende estudiar. Comparando la señal analítica que producen estas disoluciones con la señal que presenta la disolución exenta de ellas, se determina la tolerancia del sensor a cada una de estas especies.

Se establece como límite de tolerancia aquella concentración de especie interferente por encima de la cual se origina un error relativo en la señal analítica mayor del  $\pm 5\%$ . El límite de tolerancia se expresa como la relación especie interferente/analito, en masa (m/m).

En general, hay que señalar que la utilización de soporte sólido incrementa significativamente la selectividad del método, debido a la preconcentración del analito en la zona sensora, así como a la discriminación que se produce en la retención puesto que sólo especies afines a la fase sólida empleada quedarán retenidas en ella, eliminando por tanto un gran número de especies interferentes.

A continuación se incluye el resumen de los resultados obtenidos en este estudio.

#### **IV.8.1. Optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas.**

Para los tres optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas, este estudio se realizó sobre especies inorgánicas y otros pesticidas orgánicos (algunos de ellos con fluorescencia nativa) debido a que estos optosensores se aplicarán a muestras de agua natural y formulaciones de productos fitosanitarios. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

**IV.8.1.1. Optosensor para la determinación de benomilo y carbendazima****Tabla IV.18.** Estudio de especies interferentes. Optosensor biparámetro para la determinación de benomilo y carbendazima: límites de tolerancia.

| Especies interferentes                                                                                                                                                | Tolerancia interferente/analito (m/m) |                  |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|------------------|
|                                                                                                                                                                       | Carbendazima                          | Benomilo         |
| Simazina                                                                                                                                                              | 10 <sup>a</sup>                       | 25 <sup>a</sup>  |
| Dicloné                                                                                                                                                               | 10 <sup>a</sup>                       | 10 <sup>a</sup>  |
| Imazalil                                                                                                                                                              | 5                                     | 10 <sup>a</sup>  |
| Warfarina                                                                                                                                                             | 2.5                                   | 2.5              |
| o-Fenilfenol                                                                                                                                                          | 1.5                                   | 0.15             |
| α-Naftol                                                                                                                                                              | 1.5                                   | 1.5              |
| Tiabendazol                                                                                                                                                           | 0.25                                  | 5                |
| CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , AcO <sup>-</sup> , F <sup>-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> | 250 <sup>a</sup>                      | 250 <sup>a</sup> |
| K <sup>+</sup>                                                                                                                                                        | 125                                   | 125              |
| NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                                                                                                                                          | 62.5                                  | 125              |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>                                                                                                                       | 62.5                                  | 62.5             |
| Al <sup>3+</sup>                                                                                                                                                      | 25 <sup>a</sup>                       | 25 <sup>a</sup>  |
| I <sup>-</sup>                                                                                                                                                        | 12.5                                  | 25               |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

**IV.8.1.2. Optosensor para la determinación de tiabendazol y ortofenilfenol****Tabla IV.19.** Estudio de especies interferentes. Optosensor biparámetro para la determinación de tiabendazol y o-fenilfenol: límites de tolerancia.

| Especies interferentes                                                                                                                               | Tolerancia interferente/analito (m/m) |                    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------|--------------------|
|                                                                                                                                                      | Tiabendazol                           | o-Fenilfenol       |
| Cl <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Na <sup>+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , AcO <sup>-</sup> |                                       |                    |
| NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>                                                                         | 100000 <sup>a</sup>                   | 10000 <sup>a</sup> |
| Ca <sup>2+</sup> , F <sup>-</sup>                                                                                                                    | 50000                                 | 5000               |
| Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>                                                                                                                  | 1000                                  | 200                |
| Dicloné                                                                                                                                              | 1000 <sup>a</sup>                     | 100 <sup>a</sup>   |
| Imazalil                                                                                                                                             | 1000 <sup>a</sup>                     | 100 <sup>a</sup>   |
| Simazina                                                                                                                                             | 1000 <sup>a</sup>                     | 100 <sup>a</sup>   |
| Quinometionato                                                                                                                                       | 500 <sup>a</sup>                      | 50 <sup>a</sup>    |
| Benomilo                                                                                                                                             | 200                                   | 5                  |
| Warfarina                                                                                                                                            | 100                                   | 5                  |
| Carbarilo                                                                                                                                            | 100                                   | 1                  |
| Carbendazima                                                                                                                                         | 50                                    | 50 <sup>a</sup>    |
| α-Naftol                                                                                                                                             | 5                                     | 0.5                |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

### IV.8.1.3. Optosensor para la determinación de benomilo, carbarilo y fuberidazol

**Tabla IV.20.** Estudio de especies interferentes. Optosensor triparámetro para la determinación de benomilo (BNM), carbarilo (CBL) y fuberidazol (FBZ): límites de tolerancia.

| Especies interferentes                                                                                                              | Tolerancia interferente / analito (m/m) |                   |                  |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------|------------------|
|                                                                                                                                     | FBZ                                     | CBL               | BNM              |
| Cl <sup>-</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , Na <sup>+</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , |                                         |                   |                  |
| AcO <sup>-</sup> , K <sup>+</sup>                                                                                                   | 10000 <sup>a</sup>                      | 2000 <sup>a</sup> | 500 <sup>a</sup> |
| Aldicarb                                                                                                                            | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Aminocarb                                                                                                                           | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Bendiocarb                                                                                                                          | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Carbendazima                                                                                                                        | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Imazalil                                                                                                                            | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Metiocarb                                                                                                                           | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Morestan                                                                                                                            | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Simazina                                                                                                                            | 1000 <sup>a</sup>                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |
| Carbofurano                                                                                                                         | 100                                     | 2                 | 5 <sup>a</sup>   |
| O-fenilfenol                                                                                                                        | 100                                     | 2                 | 5 <sup>a</sup>   |
| Ácido α-naftil acético                                                                                                              | 50                                      | 0.4               | 5 <sup>a</sup>   |
| Tiabendazol                                                                                                                         | 5                                       | 20 <sup>a</sup>   | 5 <sup>a</sup>   |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

En todos los casos estudiados para estos tres métodos, los valores de tolerancia fueron más que satisfactorios.

#### IV.8.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios post-cosecha en frutas

De la misma forma que en el calibrado, para los dos optosensores (tiabendazol y difenilamina) se emplearon estándares en matriz, fortificando los extractos obtenidos de la frutas con distintos niveles de pesticida. En el caso de tiabendazol, se realizó este estudio con una concentración de  $2 \text{ mg Kg}^{-1}$ , en un extracto de naranja. En el caso de la difenilamina, se empleó una concentración de  $3 \text{ mg Kg}^{-1}$ . En los dos optosensores, no se observó ningún tipo de interferencia proveniente de la matriz, esto se debe en parte a la selectividad del sensor, y también a la limpieza de los extractos obtenidos mediante el protocolo de extracción usado, en el que se aplica una etapa de "clean-up". Diferentes pesticidas que se suelen emplear junto con los analitos fueron ensayados, obteniendo unos valores de tolerancia bastante elevados para todos los compuestos estudiados, incluyendo aquellos que presentaban fluorescencia nativa y espectros parcialmente solapados con los de los analitos.

##### IV.8.2.1. Optosensor para la determinación de tiabendazol en cítricos

**Tabla IV.21.** Estudio de especies interferentes. Optosensor para la determinación de tiabendazol en cítricos: límites de tolerancia.

| Especies interferentes       | Tolerancia interferente/analito<br>(m/m) |
|------------------------------|------------------------------------------|
| Imazalil, simazina, benomilo | >50 <sup>a</sup>                         |
| Carbendazima, carbarilo      | 20                                       |
| $\alpha$ -naftol             | 10                                       |
| o-Fenilfenol                 | 5                                        |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

#### IV.8.2.2. Optosensor para la determinación de difenilamina en manzanas y peras

**Tabla IV.22.** Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor para la determinación de difenilamina en peras y manzanas.

| Especies interferentes              | Tolerancia<br>interferente/analito (m/m) |
|-------------------------------------|------------------------------------------|
| Imazalil, imidacloprid,<br>simazina | >50 <sup>a</sup>                         |
| Carbendazima                        | 5                                        |
| o-Fenilfenol                        | 4                                        |
| Tiabendazol                         | 2                                        |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

#### IV.8.3. Optosensores monoparámetro para la determinación de metales

En el caso de los optosensores para la determinación de metales (Al(III) y Cd(II)), este estudio se realizó considerando como potenciales especies interferentes a otros iones, cationes y aniones que puedan estar presentes en las muestras de agua a las que se aplicarán. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

##### IV.8.3.1. Optosensor para la determinación de Al (III)

Pese a que el ácido cromotrópico es un reactivo bastante selectivo para la determinación fluorimétrica de Al(III), no es específico, por lo que se llevó a cabo un estudio del efecto de posibles interferentes. Las tolerancias obtenidas para cada especie interferente se muestran en la Tabla IV.23. Este estudio se llevó a cabo con una concentración de Al (III) de 100 ng ml<sup>-1</sup>. Como se puede ver, los valores de tolerancia obtenidos para la mayoría de las especies ensayadas son bastante elevados, lo que prueba la selectividad del método, excepto para Fe (III), que presentaba un valor de tolerancia bajo y del orden de las concentraciones a las que se suele encontrar en muestras de agua. Esta interferencia se puede eliminar fácilmente mediante la adición de ácido ascórbico a la muestra (40 µg ml<sup>-1</sup>), previa acidificación de la misma.

**Tabla IV.23.** Estudio de especies interferentes. Optosensor para la determinación de Al (III): límites de tolerancia.

| iones interferentes                                                                                                                                                                                              | Tolerancia<br>interferente/analito (m/m) |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 5000 <sup>a</sup>                        |
| Ca <sup>2+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>                                                                                                                                                                 | 1000                                     |
| Mg <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                                                 | 200                                      |
| Ni <sup>2+</sup> , Fe <sup>2+</sup> , Co <sup>2+</sup>                                                                                                                                                           | 100                                      |
| Hg <sup>2+</sup> , Cd <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                              | 50                                       |
| Zn <sup>2+</sup> , Sn <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                              | 20                                       |
| Cr <sup>3+</sup> , Pb <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                              | 10                                       |
| Fe <sup>3+</sup>                                                                                                                                                                                                 | 5 (100) <sup>b</sup>                     |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada<sup>b</sup> tolerancia en presencia de ácido ascórbico (40 µg ml<sup>-1</sup>)**IV.8.3.2. Optosensor para la determinación de Cd(II)**

Para el optosensor de Cd (II), las tolerancias obtenidas para cada especie interferente se muestran en la Tabla IV.24. Este estudio se llevó a cabo con una concentración de Cd (II) de 50 ng ml<sup>-1</sup>. Como se puede ver en la siguiente tabla, los valores de tolerancia obtenidos para la mayoría de las especies ensayadas son bastante elevados, lo que prueba la selectividad del método.

**Tabla IV.24.** Estudio de especies interferentes. Optosensor para la determinación de Cd (II): límites de tolerancia.

| iones interferentes                                                                                                                                                                                                                                 | Tolerancia interferente/analito<br>(m/m) |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------|
| Cl <sup>-</sup> , Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> ,<br>NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> | 10000 <sup>a</sup>                       |
| Ca <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                                                                                    | 5000                                     |
| Mg <sup>2+</sup> ; Sn <sup>2+</sup> ;                                                                                                                                                                                                               | 500                                      |
| Co <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                                                                                    | 100                                      |
| Hg <sup>2+</sup> ; Ni <sup>2+</sup> ; Fe <sup>2+</sup> ; Cu <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                           | 50                                       |
| Pb <sup>2+</sup> ; Cr <sup>3+</sup>                                                                                                                                                                                                                 | 20                                       |
| Al <sup>3+</sup> , Fe <sup>3+</sup>                                                                                                                                                                                                                 | 10                                       |
| Zn <sup>2+</sup>                                                                                                                                                                                                                                    | 5                                        |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada**IV.8.4. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno**

En este caso las especies estudiadas como posibles interferentes son aquellas que acompañan a éstos principios activos en preparados farmacéuticos, así como otras especies presentes en fluidos biológicos como ácido úrico y algunos cationes. Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indican que los límites de tolerancia obtenidos son bastantes altos. Esta alta selectividad se debe a la separación que se lleva a cabo en el soporte sólido permite a su vez la separación de los analitos del resto de matriz que no interacciona con dicho soporte.

**Tabla IV.25.** Estudio de especies interferentes. Optosensor para la determinación simultánea de ácido salicílico y naproxeno: límites de tolerancia.

| Especies interferentes                                                                                   | Tolerancia (interferente/analito) |                    |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|--------------------|
|                                                                                                          | Ácido salicílico                  | Naproxeno          |
| K <sup>+</sup> , Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup> , | 1000 <sup>a</sup>                 | 10000 <sup>a</sup> |
| Urea; ácido úrico                                                                                        | 500 <sup>a</sup>                  | 5000 <sup>a</sup>  |
| Sacarosa; glucosa; lactosa                                                                               | 200 <sup>a</sup>                  | 2000 <sup>a</sup>  |
| Paracetamol, ácido ascórbico; cafeína;                                                                   |                                   |                    |
| diclofenaco; ibuprofeno; fenilefrina                                                                     | 100 <sup>a</sup>                  | 1000 <sup>a</sup>  |
| Piroxicam                                                                                                | 100 <sup>a</sup>                  | 50                 |
| Piridoxina                                                                                               | 20                                | 1000 <sup>a</sup>  |

<sup>a</sup> máxima relación ensayada

Por último, a raíz de los resultados obtenidos, se puede concluir que la selectividad de los métodos desarrollados es alta permitiendo incluso el análisis de muestras con matrices relativamente complejas, sin que se originen problemas debido a interferencias.

#### IV.9. APLICACIONES ANALÍTICAS

Una vez desarrollados los métodos, se procedió a explorar las posibles aplicaciones analíticas de los optosensores en muestras reales. A continuación, se enumeran las diferentes muestras a las que han sido aplicados los métodos propuestos en esta Memoria.

## Aplicaciones

---

|                                |                                            |
|--------------------------------|--------------------------------------------|
| Benomilo-Carbendazima          | Aguas naturales y productos fitosanitarios |
| Tiabendazol-o-fenilfenol       | Aguas naturales y productos fitosanitarios |
| Benomilo-Carbarilo-Fuberidazol | Aguas naturales                            |
| Tiabendazol                    | Cítricos (limones y naranjas)              |
| Difenilamina                   | Manzanas y peras                           |
| Al (III)                       | Aguas de consumo humano                    |
| Cd (II)                        | Aguas de consumo humano                    |
| Naproxeno y ácido salicílico   | Fármacos, orina y suero                    |

---

### IV.9.1. Preparación de las muestras

Las muestras son de naturaleza muy diversa y requieren un tratamiento muy distinto y este tratamiento en general, es más o menos laborioso en cuanto a número de etapas en función de la complejidad de la muestra. Una vez preparada la muestra en las condiciones adecuadas, se realizan en cada caso las diluciones necesarias, hasta que la concentración se encuentre dentro del intervalo de la recta de calibrado correspondiente. A continuación se describen los procedimientos de tratamiento de muestra para cada una de las aplicaciones ensayadas.

#### ***Aguas naturales y aguas de consumo***

Los optosensores para la determinación de pesticidas, han sido aplicados a la determinación de estos analitos en muestras fortificadas de aguas naturales. Éstas aguas naturales (río, pantano, pozo, agua de riego, etc) fueron filtradas a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu$ m, analizándose inmediatamente. En los casos en los que procedía, la muestra se acidificaba con HCl para asegurar la estabilidad del benomilo.

Las muestras de agua para consumo humano (agua de grifo y agua mineral natural de distintas marcas) también fueron filtradas a través de una membrana Millipore de 0.45  $\mu$ m.

### **Productos fitosanitarios**

Los productos se disolvieron en agua desionizada (Fenomilo 50) y etanol (Tectar 60T, Fubotec extra, Textar 13 OP), empleando también un baño de ultrasonidos. A continuación se diluyeron con agua desionizada.

### **Frutas (naranjas, limones, manzanas y peras)**

Para los dos optosensores descritos para el análisis de tiabendazol y difenilamina en frutas, se empleo el método "QuEChERS" ("Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe") descrito por Anastassiades y Lehotay [297]. Este método está basado en una etapa de extracción líquido-líquido, seguida de una etapa de purificación mediante el empleo de PSA (amina primaria-secundaria) como sorbente. Con esta etapa de purificación se eliminan un gran número de componentes de la matriz, que pudiesen interferir, principalmente ácidos orgánicos y azúcares. A continuación, se describe brevemente el procedimiento.

De una muestra de fruta triturada y homogeneizada (con cáscara y sin ningún tipo de tratamiento previo) (1 Kg.), se tomaban 15 g en un tubo de centrifuga de 50 ml. Se añadían, a continuación 15 ml de acetonitrilo y se agitaba vigorosamente durante 1 minuto. Entonces, se añadían 2.5 g de cloruro sódico y 6 g de sulfato de magnesio anhidro ( $\text{MgSO}_4$ ) al tubo, y se agita de nuevo durante 1 minuto. A continuación, se centrifuga durante 3 minutos a 3700 rpm. Del sobrenadante se toman 5 ml, y se llevan a un tubo de centrífuga de 15 ml, al que se añaden 250 mg de PSA y 750 mg de  $\text{MgSO}_4$  anhidro, para llevar a cabo la etapa de purificación. El tubo se agita energéticamente durante 20 segundos, y se centrifuga de nuevo (3 minutos, 3700 rpm.). Finalmente, se obtiene un extracto de acetonitrilo 100 % que se diluye antes de realizar el análisis. (dilución 1:10 en el caso del tiabendazol y 1:50 en el caso de difenilamina).

### **Suero y orina**

El optosensor biparámetro para la determinación de naproxeno y ácido salicílico fue aplicado a muestras fortificadas de suero sanguíneo y orina. Las muestras de suero se obtuvieron a través del Hospital Universitario "Ciudad de Jaén". El único tratamiento previo que se llevó a cabo fue una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos, para posteriormente filtrar la muestra a través de una membrana de 0.45 mm. Posteriormente fueron diluidas con agua desionizada.

Las muestras de orina eran diluidas con agua desionizada y filtradas a través de un filtro de membrana de 0.45 mm.

### ***Preparados farmacéuticos***

Todos los fármacos analizados se encontraban recogidos en la Farmacopea Española y contenían los analitos que se iban a determinar en diversas formas de presentación: comprimidos, cápsulas, sobres, jarabes y disoluciones.

Los comprimidos fueron molidos en un mortero de ágata y disueltos en agua desionizada mediante sonicación durante 10 minutos. Los contenidos de las cápsulas se disolvieron en agua desionizada con ayuda de un baño de ultrasonidos y se filtraron. Las disoluciones y jarabes se diluyeron directamente con etanol. Posteriormente, se practicaron las diluciones necesarias con agua desionizada.

## **IV.9.2. Determinación en muestras reales**

Para evaluar el potencial analítico y aplicabilidad de los métodos propuestos en esta Memoria, éstos fueron aplicados a la determinación de los analitos en muestras reales mediante el procedimiento descrito en cada caso. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado, para obtener la media y la desviación estándar de los datos. A continuación se describen las principales aplicaciones ensayadas para cada uno de los métodos descritos en esta Memoria.

### ***IV.9.2.1. Optosensores multiparámetro para la determinación de pesticidas.***

#### **IV.9.2.1.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE BENOMILO Y CARBENDAZIMA**

El sensor desarrollado para la determinación de benomilo y carbendazima se aplicó al análisis de cuatro muestras de aguas naturales y a un producto fitosanitario. En las muestras de agua analizadas no se detectó la presencia de ninguno de éstos fungicidas. Por esto, para evaluar la precisión y la exactitud del método propuesto se realizó un estudio de recuperación de los dos fungicidas en aguas naturales, preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo con un volumen de inyección de muestra de 2000 ml, a niveles de concentración entre 50 y 350 ng ml<sup>-1</sup> tanto para la carbendazima como

para el benomilo. Además, también se llevó a cabo el estudio de recuperación de una formulación de pesticida ("Fenomilo 50"). Como se puede ver en la Tabla IV.26, en todos los casos las recuperaciones obtenidas estuvieron en torno al 100 %, con desviaciones estándares relativas menores de 3 %.

**Tabla IV.26.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de benomilo y carbendazima: productos fitosanitarios ("Fenomilo 50") y aguas naturales fortificadas con distintos niveles de concentración de benomilo y carbendazima.

|                   | Carbendazima                                  |                                         | Benomilo                                      |                                         |
|-------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|-----------------------------------------------|-----------------------------------------|
|                   | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Recuperación $\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Recuperación $\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> |
| Agua de río       | 0.05                                          | 102 $\pm$ 2                             | 0.05                                          | 104 $\pm$ 2                             |
|                   | 0.15                                          | 99 $\pm$ 1                              | 0.15                                          | 102 $\pm$ 1                             |
|                   | 0.35                                          | 100 $\pm$ 2                             | 0.35                                          | 98 $\pm$ 2                              |
| Agua de pantano 1 | 0.05                                          | 98 $\pm$ 1                              | 0.05                                          | 103 $\pm$ 1                             |
|                   | 0.15                                          | 99.0 $\pm$ 0.9                          | 0.15                                          | 100.6 $\pm$ 0.7                         |
|                   | 0.35                                          | 100 $\pm$ 2                             | 0.35                                          | 99 $\pm$ 1                              |
| Agua de pantano 2 | 0.05                                          | 104 $\pm$ 2                             | 0.05                                          | 97 $\pm$ 1                              |
|                   | 0.15                                          | 101 $\pm$ 3                             | 0.15                                          | 101 $\pm$ 1                             |
|                   | 0.35                                          | 101 $\pm$ 3                             | 0.35                                          | 99 $\pm$ 1                              |
| Agua de pantano 3 | 0.05                                          | 103.3 $\pm$ 0.6                         | 0.05                                          | 98 $\pm$ 2                              |
|                   | 0.15                                          | 101 $\pm$ 2                             | 0.15                                          | 101 $\pm$ 1                             |
|                   | 0.35                                          | 102 $\pm$ 3                             | 0.35                                          | 99.3 $\pm$ 0.5                          |
| "Fenomilo 50"     | 0.4                                           | 102 $\pm$ 2                             | 0.4                                           | 100 $\pm$ 1                             |
|                   | 0.8                                           | 101 $\pm$ 1                             | 0.8                                           | 97 $\pm$ 1                              |
|                   | 1.0                                           | 101 $\pm$ 1                             | 1.0                                           | 99.0 $\pm$ 0.6                          |

<sup>a</sup> n = 3

A continuación, se procedió al análisis de un producto fitosanitario que contenía benomilo ("Fenomilo 50"). En el producto ensayado (50 % benomilo (m/m) según el fabricante) se encontró una cantidad de principio activo mucho menor, (% Benomilo (m/m):  $30.1 \pm 0.3 \%$  ( $n = 3$ )). Esta diferencia tan grande podría deberse a que el benomilo del producto analizado se hubiese degradado debido a la humedad del recipiente. En efecto, en esta muestra analizada se encontró también carbendazima (% Carbendazima (m/m):  $10.8 \pm 0.2 \%$  ( $n = 3$ )), aunque en principio el producto comercial analizado no la contiene. Este resultado confirma la hipótesis de degradación parcial de benomilo a carbendazima, ya que se encontró una concentración de carbendazima del mismo orden que la de benomilo que supuestamente se había degradado. Por lo tanto, la diferencia entre el valor obtenido y el declarado por el fabricante, se podía justificar parcialmente por la degradación de benomilo a carbendazima. Esta es una aplicación bastante interesante de este optosensor, ya que permite evaluar el grado de degradación y deterioro de productos fitosanitarios que contengan benomilo durante etapas anteriores a su empleo, como por ejemplo el almacenamiento.

#### IV.9.2.1.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL Y ORTOFENILFENOL

El sensor biparámetro para la determinación simultánea de o-fenilfenol y tiabendazol se aplicó a muestras de productos fitosanitarios y a aguas naturales. En todos los casos, los análisis se realizaron por triplicado, y los resultados obtenidos para cada producto fitosanitario están en concordancia con los datos suministrados por los fabricantes. Los productos que se analizaron fueron los siguientes:

- Formulación 1: "Textar 60T" (Tecnidex S.A.); composición: 60 % (p/v) tiabendazol
- Formulación 2: "Fubotec Extra" (Tecnidex S.A.); composición: 22.5 % (p/v) tiabendazol, 7.5 % (p/v) imazalil
- Formulación 3: "Textar 13 OP" (Tecnidex S.A.); composición: 13.0 % (p/v) o-fenilfenol
- Formulación 4: "Citrosol A Tecto 50" (Productos Citrosol.); composición: 0.5 % (p/v) tiabendazol, 0.65 % (p/v) o-fenilfenol

En la siguiente tabla, se muestran los resultados que se obtuvieron para cada uno de los productos fitosanitarios analizados. Como se puede observar, existe gran concordancia entre los valores obtenidos y los indicados por el fabricante.

**Tabla IV.27.** Determinación de tiabendazol y o-fenilfenol en productos fitosanitarios ( $n=3$ .)

| Muestra                                      | Composición según fabricante                 | Tiabendazol                      | o-Fenilfenol                     |
|----------------------------------------------|----------------------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
|                                              |                                              | Encontrado $\pm$ SD <sup>a</sup> | Encontrado $\pm$ SD <sup>a</sup> |
| <b>Formulación 1:</b><br>"Textar 60T"        | 60 % Tiabendazol (p/v)                       | 58.7 % $\pm$ 0.7                 | -                                |
| <b>Formulación 2:</b><br>"Fubotec Extra"     | 22.5% Tiabendazol (p/v)                      | 22.0 $\pm$ 0.4                   | -                                |
| <b>Formulación 3:</b><br>"Textar 13 OP"      | 13% o-Fenilfenol (p/v)                       | -                                | 13.0 $\pm$ 0.6                   |
| <b>Formulación 4:</b><br>Citrosol A Tecto 50 | 0.5% Tiabendazol<br>0.65% o-Fenilfenol (p/v) | 0.497 $\pm$ 0.008                | 0.651 $\pm$ 0.005                |

<sup>a</sup>  $n = 3$ 

El método propuesto también se aplicó al análisis de 4 muestras de aguas naturales (río y pantano). Las muestras de agua analizadas no contenían ninguno de los pesticidas estudiados. Por esta razón, para chequear la exactitud del método se realizaron estudios de recuperación en las muestras de aguas naturales.

Del mismo modo, también se llevaron a cabo estudios de recuperación en los productos fitosanitarios previamente analizados. Los resultados obtenidos en estos estudios se muestran en las tablas IV.28 y IV.29. En todos los casos se obtuvieron muy buenas recuperaciones, entre 97 y 103 %, y desviaciones estándares relativas menores del 3%.

**Tabla IV.28.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de tiabendazol y o-fenilfenol: aguas naturales fortificadas con distintos niveles de concentración de ambos pesticidas.

|                   | Tiabendazol                             |                                     | o-Fenilfenol                            |                                     |
|-------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|-------------------------------------|
|                   | Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación ± RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación ± RSD (%) <sup>a</sup> |
| Agua de río       | 1                                       | 98 ± 2                              | 10                                      | 98 ± 2                              |
|                   | 2                                       | 98 ± 1                              | 20                                      | 99 ± 1                              |
|                   | 3                                       | 101.1 ± 0.8                         | 30                                      | 99.9 ± 0.6                          |
| Agua de pantano 1 | 1                                       | 100 ± 2                             | 10                                      | 100 ± 2                             |
|                   | 2                                       | 100 ± 1                             | 20                                      | 102 ± 1                             |
|                   | 4                                       | 98.2 ± 0.7                          | 40                                      | 100.8 ± 0.7                         |
| Agua de pantano 2 | 1                                       | 97 ± 1                              | 5                                       | 97 ± 3                              |
|                   | 2                                       | 102 ± 2                             | 10                                      | 99 ± 1                              |
|                   | 5                                       | 100 ± 1                             | 25                                      | 102 ± 1                             |
| Agua de pantano 3 | 1                                       | 103 ± 2                             | 5                                       | 98 ± 2                              |
|                   | 2                                       | 102 ± 1                             | 10                                      | 100 ± 2                             |
|                   | 5                                       | 100.5 ± 0.7                         | 25                                      | 101.6 ± 0.7                         |

<sup>a</sup> n = 3

**Tabla IV.29.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de tiabendazol y o-fenilfenol: productos fitosanitarios fortificados con distintos niveles de concentración de cada uno de los pesticidas.

|               | Tiabendazol                                   |                                        | o-Fenilfenol                                  |                                        |
|---------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|-----------------------------------------------|----------------------------------------|
|               | Cantidad<br>añadida<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación<br>± RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad<br>añadida<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación<br>± RSD (%) <sup>a</sup> |
| Formulación 1 | 10                                            | 101.2 ± 0.5                            | -                                             | -                                      |
|               | 20                                            | 100.0 ± 0.8                            | -                                             | -                                      |
|               | 40                                            | 99.1 ± 0.8                             | -                                             | -                                      |
| Formulación 2 | 10                                            | 99 ± 1                                 | -                                             | -                                      |
|               | 20                                            | 101 ± 1                                | -                                             | -                                      |
|               | 30                                            | 99.9 ± 0.4                             | -                                             | -                                      |
| Formulación 3 | -                                             | -                                      | 50                                            | 98 ± 1                                 |
|               | -                                             | -                                      | 100                                           | 101.3 ± 0.5                            |
|               | -                                             | -                                      | 150                                           | 100.4 ± 0.5                            |
| Formulación 4 | 10                                            | 100 ± 2                                | 50                                            | 100 ± 1                                |
|               | 20                                            | 99.6 ± 0.9                             | 100                                           | 101.2 ± 0.5                            |
|               | 40                                            | 100 ± 1                                | 200                                           | 99.5 ± 0.5                             |

<sup>a</sup> n = 3

#### IV.9.2.1.3. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE BENOMILO, CARBARILO Y FUBERIDAZOL

El método desarrollado se aplicó al análisis de 4 muestras de aguas naturales. Las muestras de agua analizadas no contenían ninguno de los pesticidas estudiados. Por esto, se realizó un estudio de recuperación de los tres pesticidas en aguas naturales (agua de pozo, agua de río, agua de pantano y agua de riego), preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo con un volumen de inyección de muestra de 2100 µl, a niveles de concentración entre 1 y 4 ng ml<sup>-1</sup>, entre 40 y 120 ng ml<sup>-1</sup> y entre 100 y 400 ng ml<sup>-1</sup> para el fuberidazol, carbarilo y benomilo respectivamente. Como se puede ver en

la siguiente tabla, en todos los casos las recuperaciones obtenidas fueron entorno al 100 %, con desviaciones estándares relativas menores de 2 % en la mayoría de los casos.

**Tabla IV.30.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de fuberidazol (FBZ), carbarilo (CBL) y benomilo (BNM): aguas naturales.

|                 | FBZ                                     |                                 | CBL                                     |                                 | BNM                                     |                                 |
|-----------------|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------|
|                 | Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> ) | Rec. $\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> ) | Rec. $\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad añadida (ng ml <sup>-1</sup> ) | Rec. $\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> |
| Agua de pozo    | 1                                       | 100.1 $\pm$ 0.9                 | 40                                      | 100 $\pm$ 2                     | 100                                     | 99 $\pm$ 2                      |
|                 | 2                                       | 100 $\pm$ 2                     | 80                                      | 99.1 $\pm$ 0.6                  | 200                                     | 97 $\pm$ 1                      |
|                 | 4                                       | 97.8 $\pm$ 0.7                  | 120                                     | 97.9 $\pm$ 0.5                  | 400                                     | 99.1 $\pm$ 0.9                  |
| Agua de río     | 1                                       | 101 $\pm$ 1                     | 40                                      | 103 $\pm$ 1                     | 100                                     | 105 $\pm$ 2                     |
|                 | 2                                       | 100.2 $\pm$ 0.9                 | 80                                      | 103.0 $\pm$ 0.8                 | 200                                     | 103 $\pm$ 1                     |
|                 | 4                                       | 99.4 $\pm$ 0.7                  | 120                                     | 100.4 $\pm$ 0.5                 | 400                                     | 101 $\pm$ 1                     |
| Agua de pantano | 1                                       | 100.0 $\pm$ 0.8                 | 40                                      | 98 $\pm$ 1                      | 100                                     | 99 $\pm$ 2                      |
|                 | 2                                       | 100.4 $\pm$ 0.7                 | 80                                      | 101.0 $\pm$ 0.8                 | 200                                     | 98 $\pm$ 1                      |
|                 | 4                                       | 98.8 $\pm$ 0.6                  | 120                                     | 102.3 $\pm$ 0.5                 | 400                                     | 98.4 $\pm$ 0.9                  |
| Agua de riego   | 1                                       | 101 $\pm$ 1                     | 40                                      | 98 $\pm$ 1                      | 100                                     | 100 $\pm$ 1                     |
|                 | 2                                       | 100.1 $\pm$ 0.8                 | 80                                      | 101.2 $\pm$ 0.8                 | 200                                     | 99 $\pm$ 2                      |
|                 | 4                                       | 100 $\pm$ 1                     | 120                                     | 102.2 $\pm$ 0.7                 | 400                                     | 97.9 $\pm$ 0.8                  |

<sup>a</sup> n = 3

#### **IV.9.2.2. Optosensores monoparámetro para la determinación de productos fitosanitarios para tratamiento post-cosecha**

Los optosensores para la determinación de tiabendazol y difenilamina fueron aplicados sólo a frutas. En ambos casos, se llevaron a cabo estudios de recuperación

de forma que se evaluaba el proceso completo, tanto la extracción de los compuestos de la matriz de fruta como la etapa de determinación. Se tomaba una muestra de fruta de aproximadamente 50 g, (a partir 1 kg de muestra previamente triturada y homogeneizada) y se añadía aproximadamente 5 ml de estándar en metanol de una concentración apropiada (en función del nivel de fortificación) y se usaba un mortero para asegurar la homogeneidad de la muestra. Posteriormente, se dejaba a temperatura ambiente, para facilitar la eliminación de metanol durante 8 horas, y después se almacenaba en un frigorífico hasta su extracción y análisis, siguiendo el procedimiento descrito en la sección IV.9.1.

#### IV.9.2.2.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE TIABENDAZOL EN CÍTRICOS

Para el optosensor de tiabendazol, se llevó a cabo este estudio como se ha descrito anteriormente. Los niveles de concentración estudiados estaban en el rango entre 1.5 y 6 mg Kg<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos en distintos ensayos tanto para naranjas como limones se muestran en la siguiente tabla. Los valores de recuperación obtenidos estaban en el intervalo entre el 87 y el 109 %.

**Tabla IV.31.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de tiabendazol: muestras de naranjas y limones fortificadas con distintos niveles de concentración.

| Muestra     | Nivel de fortificación (mg Kg <sup>-1</sup> ) | Recuperación (%) | RSD (%) <sup>a</sup> |
|-------------|-----------------------------------------------|------------------|----------------------|
| Naranja # 1 | 2                                             | 108.9            | 1.9                  |
|             | 4                                             | 92.4             | 3.4                  |
|             | 6                                             | 89.9             | 1.0                  |
| Naranja # 2 | 1.5                                           | 102.1            | 2.3                  |
|             | 3                                             | 94.7             | 1.9                  |
|             | 4.5                                           | 96.3             | 1.6                  |
| Naranja # 3 | 2                                             | 91.8             | 2.7                  |
|             | 4                                             | 92.5             | 1.9                  |
|             | 6                                             | 98.2             | 0.6                  |
| Limón # 1   | 2                                             | 97.8             | 2.1                  |
|             | 4                                             | 87.1             | 1.1                  |
|             | 6                                             | 91.6             | 1.7                  |
| Limón # 2   | 1.5                                           | 90.5             | 1.9                  |
|             | 3                                             | 93.0             | 2.0                  |
|             | 4.5                                           | 92.1             | 0.7                  |
| Limón # 3   | 2                                             | 93.7             | 2.2                  |
|             | 4                                             | 96.0             | 3.1                  |
|             | 6                                             | 94.1             | 1.4                  |

<sup>a</sup> n = 3

Además de estos estudios de recuperación, se llevó a cabo el análisis de veinte muestras de naranjas y limones obtenidas en supermercados de la zona. Se empleó el mismo tratamiento de muestra anteriormente descrito y se procedió al análisis de los extractos obtenidos mediante el optosensor y con un método de cromatografía de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas (HPLC-MS) con analizador de trampa de iones y una interfase de tipo "electrospray" operando en modo positivo. El instrumental y el método de HPLC-MS empleados para llevar a cabo este estudio se describen a continuación:

Método de referencia para la determinación de tiabendazol en frutas basado en cromatografía de líquidos/espectrometría de masas

Se empleó un equipo de cromatografía de líquidos (HPLC) Agilent 1100 Series (Palo Alto, CA, EEUU), equipado con un inyector automático, un desgasificador y una bomba binaria y acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de trampa de iones Bruker Esquire 6000 (Bruker Daltonik GmbH, Alemania), en modo positivo. El espectrómetro de masas se usó en modo "full-scan" para realizar la cuantificación del tiabendazol, empleando el área de pico del cromatograma del ion  $m/z$  202, correspondiente a la molécula protonada de tiabendazol. La cuantificación se realizó mediante estándares en matriz. Los parámetros instrumentales optimizados que se usaron para los análisis son los siguientes: temperatura del gas: 325 ° C; flujo de gas: 9 L/min; presión del nebulizador: 40 psig.; voltaje del capilar: 100 IV.

La separación del pesticida de la matriz se llevó a cabo usando una columna analítica (Zorbax Eclipse XDB-C8) de 150 mm (largo) x 3.0 mm (ancho) con un tamaño de partícula de 5 mm. El volumen de muestra inyectado en cada análisis fue 50 µl. Las fases móviles que se emplearon fueron acetonitrilo (fase móvil A) y agua-0.1 % ácido fórmico (fase móvil B). Se utilizó un método en el que la composición de la fase móvil permanecía constante durante los 5 primeros minutos (10 % A; 90 % B) para pasar posteriormente a un gradiente de composición de 10 % A a 100 % de A) desde el minuto 5 al 30. El flujo empleado fue de 0.6 ml/min.

De las veinte muestras analizadas, sólo se detectó tiabendazol en 8 de ellas. Los valores obtenidos con cada método para las muestras de cítricos analizadas y que contenían tiabendazol se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla IV.32.** Análisis de distintas muestras de naranja y limón analizadas mediante el optosensor y comparación de los resultados obtenidos frente al método de referencia empleado basado en cromatografía de líquidos/espectrometría de masas.

| Muestra     | Optosensor<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) | RSD (%) <sup>a</sup> | Método HPLC-MS<br>(mg kg <sup>-1</sup> ) |
|-------------|--------------------------------------|----------------------|------------------------------------------|
| Naranja # 1 | 2.68                                 | 2.3                  | 2.8                                      |
| Naranja # 2 | 0.63                                 | 4.0                  | 0.68                                     |
| Naranja # 3 | 1.28                                 | 1.8                  | 1.3                                      |
| Naranja # 4 | 2.19                                 | 2.2                  | 2.4                                      |
| Naranja # 5 | 1.73                                 | 3.2                  | 1.6                                      |
| Naranja # 6 | 1.13                                 | 2.4                  | 1.2                                      |
| Limón # 1   | ND <sup>b</sup>                      | -                    | 0.04                                     |
| Limón # 2   | 1.03                                 | 1.5                  | 1.1                                      |

<sup>a</sup> n = 3

<sup>b</sup>ND.: no detectado

Como se muestra en la tabla anterior, los resultados obtenidos mediante el optosensor están en concordancia con los obtenidos con el método de referencia (HPLC-MS). Los resultados son muy similares en ambos casos, lo que prueba la validez del método desarrollado para el análisis de tiabendazol. En términos comparativos, para niveles de concentración muy bajos, el potencial analítico del sensor propuesto es inferior al del método de HPLC-MS. Como ejemplo, la muestra de limón nº 1, que contenía tiabendazol (40 µg/Kg), pero por debajo de los niveles de detección del optosensor, por lo que no pudo ser detectada por éste.

#### IV.9.2.2.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE DIFENILAMINA EN MANZANAS Y PERAS

Para el optosensor de difenilamina, también se realizó el estudio de diversas muestras obtenidas en supermercados (7 muestras), pero no se encontró difenilamina en

ninguna de ellas, de forma que no se pudo realizar una comparación de muestras reales, tal y como se hizo para el optosensor de tiabendazol. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios de recuperación de la misma forma que para el tiabendazol, como se ha descrito anteriormente. Los niveles de concentración estudiados estaban en el intervalo entre 1 y 4 mg Kg<sup>-1</sup>. Los resultados obtenidos en distintos ensayos tanto para manzanas como para peras se muestran en la siguiente tabla. Los valores de recuperación obtenidos estaban en el intervalo entre el 78 y el 104 %.

**Tabla IV.33.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de difenilamina: manzanas y peras a distintos niveles de fortificación.

| Muestra     | Nivel de fortificación (mg Kg <sup>-1</sup> ) | Recuperación (%) | RSD (%) <sup>a</sup> |
|-------------|-----------------------------------------------|------------------|----------------------|
| Manzana # 1 | 1                                             | 88.3             | 2.8                  |
|             | 1.5                                           | 91.0             | 3.0                  |
|             | 2                                             | 86.8             | 1.9                  |
| Manzana # 2 | 1                                             | 92.3             | 2.2                  |
|             | 2                                             | 89.7             | 2.5                  |
|             | 3                                             | 96.1             | 1.7                  |
| Manzana # 3 | 1                                             | 104.0            | 1.8                  |
|             | 2                                             | 86.8             | 2.0                  |
|             | 4                                             | 91.2             | 1.4                  |
| Pera # 1    | 1                                             | 91.1             | 2.6                  |
|             | 1.5                                           | 85.7             | 2.9                  |
|             | 2                                             | 88.0             | 2.1                  |
| Pera # 2    | 1                                             | 87.1             | 1.8                  |
|             | 2                                             | 92.9             | 2.8                  |
|             | 3                                             | 87.0             | 2.0                  |
| Pera # 3    | 1                                             | 78.3             | 2.4                  |
|             | 2                                             | 89.0             | 2.1                  |
|             | 4                                             | 87.1             | 1.6                  |

<sup>a</sup> n = 3

**IV.9.2.3. Optosensores monoparámetro para la determinación de metales**

Los dos métodos desarrollados para el análisis de Al (III) y de Cd (II) fueron aplicados al análisis de aguas de consumo humano, tanto de botella (agua mineral natural) como de grifo. En ambos casos, se llevaron a cabo estudios de recuperación, mediante adiciones de Cd(II) y Al(III) en las muestras estudiadas a distintos niveles de concentración.

**IV.9.2.3.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE AL (III)**

En las muestras de agua mineral natural analizadas no se detectó la presencia de Al (III). En cambio, la muestra de agua de grifo analizada mediante el optosensor contenía  $27.1 \pm 0.8 \text{ ng ml}^{-1}$  ( $n=3$ ). Para evaluar la exactitud del método propuesto en aguas minerales se realizó un estudio de recuperación de Al(III) preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo con niveles de concentración entre 50 y 200  $\text{ng ml}^{-1}$  de Al (III). Como se puede ver en la siguiente tabla, en todos los casos las recuperaciones obtenidas estuvieron en torno al 100 %, con desviaciones estándar relativas menores de 3 %.

**Tabla IV.34.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de Al (III): agua para consumo humano.

| Muestra       | Al (III)                                   |                                        |
|---------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
|               | Cantidad añadida<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación ±<br>RSD (%) <sup>a</sup> |
| Agua 1        | 50                                         | 103 ± 2                                |
|               | 100                                        | 101 ± 2                                |
|               | 200                                        | 99 ± 2                                 |
| Agua 2        | 50                                         | 103 ± 1                                |
|               | 100                                        | 99.3 ± 0.8                             |
|               | 200                                        | 97 ± 1                                 |
| Agua 3        | 50                                         | 98 ± 2                                 |
|               | 100                                        | 100.2 ± 0.8                            |
|               | 200                                        | 97 ± 1                                 |
| Agua de grifo | 50                                         | 105 ± 2                                |
|               | 100                                        | 103 ± 2                                |
|               | 200                                        | 101 ± 1                                |

<sup>a</sup> n = 3

## IV.9.2.3.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE Cd(II)

En ninguna de las muestras de agua analizadas se detectó la presencia de Cd (II). Por tanto, se llevó a cabo un estudio de recuperación de Cd(II) preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo con niveles de concentración entre 5 y 30 ng ml<sup>-1</sup> de Cd (II). Los resultados obtenidos en este caso son muy satisfactorios con valores de recuperación próximos al 100 % en todos los casos.

**Tabla IV.35.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de Cd(II): agua de consumo humano.

| Muestra       | Cd (II)                                    |                                        |
|---------------|--------------------------------------------|----------------------------------------|
|               | Cantidad añadida<br>(ng ml <sup>-1</sup> ) | Recuperación ±<br>RSD (%) <sup>a</sup> |
| Agua 1        | 5                                          | 104 ± 1                                |
|               | 10                                         | 100 ± 1                                |
|               | 15                                         | 101 ± 1                                |
| Agua 2        | 10                                         | 102 ± 2                                |
|               | 20                                         | 102 ± 1                                |
|               | 30                                         | 99.6 ± 0.7                             |
| Agua 3        | 5                                          | 97 ± 2                                 |
|               | 10                                         | 98.2 ± 0.7                             |
|               | 15                                         | 101 ± 1                                |
| Agua de grifo | 10                                         | 103 ± 2                                |
|               | 20                                         | 100.5 ± 0.8                            |
|               | 30                                         | 100 ± 1                                |

<sup>a</sup> n = 3**IV.9.2.4. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno**

El optosensor para la determinación ácido salicílico y naproxeno fue aplicado al análisis de preparados farmacéuticos (uno de ellos semisintético), suero y orina. Se utilizaron fármacos de la Farmacopea Española, cuyas composiciones son:

- (a) "Antiverrugas ISDIN" (Laboratorios ISDIN, S.A.) (100 ml contienen 16.7 g de ácido salicílico (loción));
- (b) "Acnosan" (Bescansa) (2 g de ácido salicílico por cada 100 ml; 5 g/l de alcanfor (loción));
- (c) "Aliviomas" (Laboratorio Alacan, S.A.) (500 mg naproxeno (supositorios);
- (d) "Naprosyn" (Roche) (500 mg of naproxeno por comprimido);
- (e) "Naproxeno sodico" (Cinfa) (550 mg naproxeno por comprimido);

- (f) Mezcla semisintética (250 mg naproxeno (de "Naprosyn" y 1000 mg de ácido salicílico (s).

En todos los productos comerciales analizados, los resultados obtenidos con el método propuesto concordaban con las composiciones dadas por el fabricante. Los resultados para los 5 productos farmacéuticos analizados así como para la mezcla semisintética preparada para la determinación simultánea de naproxeno y ácido salicílico se muestran en la siguiente tabla.

**Tabla IV.36.** Aplicación del optosensor de naproxeno y ácido salicílico a la determinación de contenido de principio activo en diversos fármacos.

| Muestra                                | Ácido salicílico              |                                      | Naproxeno                     |                                      |
|----------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|
|                                        | Cantidad según fabricante (g) | Encontrado (g) $\pm$ SD <sup>a</sup> | Cantidad según fabricante (g) | Encontrado (g) $\pm$ SD <sup>a</sup> |
| <sup>a</sup> ISDIN                     | 16.7                          | 16.9 $\pm$ 0.4                       | -                             | -                                    |
| <sup>b</sup> Acnosan                   | 2.0                           | 1.97 $\pm$ 0.05                      | -                             | -                                    |
| <sup>c</sup> Aliviomas                 | -                             | -                                    | 0.500                         | 0.512 $\pm$ 0.008                    |
| <sup>d</sup> Naprosyn                  | -                             | -                                    | 0.500                         | 0.493 $\pm$ 0.009                    |
| <sup>e</sup> Naproxeno sodico          | -                             | -                                    | 0.550                         | 0.555 $\pm$ 0.005                    |
| <sup>f</sup> Naprosyn + Ac. Salicílico | 1.0                           | 1.02 $\pm$ 0.02                      | 0.250                         | 0.259 $\pm$ 0.006                    |

<sup>a</sup> n = 3

Para chequear la exactitud del método propuesto, además de los análisis de principios activos de fármacos, también se realizaron estudios de recuperación en los mismos productos farmacéuticos analizados y en suero y orina, añadiendo cantidades conocidas de los analitos, a distintos niveles de concentración de forma que las concentraciones fuesen del nivel que se espera encontrar en esas muestras (por ejemplo en suero: 30-90 mg l<sup>-1</sup> naproxeno y 200-400 mg l<sup>-1</sup> de ácido salicílico). Debido a la elevada sensibilidad del método, las muestras tenían que ser diluidas apropiadamente (1:100-1:1000 dependiendo del tipo de muestra). En orina las concentraciones son sensiblemente inferiores, por lo que las diluciones llevadas a cabo también eran menores. Los resultados obtenidos están incluidos en las Tablas IV.37 y IV.38. En todos los casos, tanto para los productos farmacéuticos, las muestras de suero y de orina, los resultados obtenidos fueron satisfactorios con valores de recuperación de aproximadamente el 100 % lo que prueba la validez del sensor para el análisis de estos dos principios activos en fluidos biológicos.

**Tabla IV.37.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno: muestras de suero humano, fortificadas con distintos niveles de ambos analgésicos.

|                  | Ácido salicílico                                           |                                            | Naproxeno                                     |                                            |
|------------------|------------------------------------------------------------|--------------------------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------|
|                  | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) <sup>a</sup> | Recuperación<br>$\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Recuperación<br>$\pm$ RSD (%) <sup>a</sup> |
| <b>Suero # 1</b> | 200                                                        | 102 $\pm$ 2                                | 30                                            | 99.5 $\pm$ 0.7                             |
|                  | 300                                                        | 99 $\pm$ 1                                 | 60                                            | 102 $\pm$ 1                                |
|                  | 400                                                        | 100.7 $\pm$ 0.9                            | 90                                            | 99.1 $\pm$ 0.8                             |
| <b>Suero # 2</b> | 100                                                        | 102 $\pm$ 2                                | 15                                            | 99.2 $\pm$ 0.7                             |
|                  | 200                                                        | 98.6 $\pm$ 0.6                             | 30                                            | 104 $\pm$ 1                                |
|                  | 300                                                        | 102.2 $\pm$ 0.7                            | 45                                            | 100.1 $\pm$ 0.7                            |
| <b>Suero # 3</b> | 100                                                        | 96 $\pm$ 1                                 | 10                                            | 101 $\pm$ 2                                |
|                  | 200                                                        | 100.1 $\pm$ 0.7                            | 20                                            | 98.2 $\pm$ 0.4                             |
|                  | 300                                                        | 102 $\pm$ 1                                | 40                                            | 100.5 $\pm$ 0.5                            |
| <b>Suero # 4</b> | 200                                                        | 100.5 $\pm$ 0.8                            | 40                                            | 97 $\pm$ 1                                 |
|                  | 300                                                        | 104 $\pm$ 1                                | 60                                            | 101 $\pm$ 2                                |
|                  | 400                                                        | 100.8 $\pm$ 0.7                            | 80                                            | 102.6 $\pm$ 0.9                            |

<sup>a</sup> n = 3

**Tabla IV.38.** Estudios de recuperación. Optosensor para la determinación de ácido salicílico y naproxeno: muestras de orina, fortificadas con distintos niveles de ambos analgésicos.

|           | Ácido salicílico                              |                                          | Naproxeno                                     |                                          |
|-----------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------------------|------------------------------------------|
|           | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Recuperación<br>$\pm \text{RSD } (\%)^a$ | Cantidad añadida<br>( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) | Recuperación<br>$\pm \text{RSD } (\%)^a$ |
| Orina # 1 | 2                                             | $99.7 \pm 0.8$                           | 0.5                                           | $103 \pm 2$                              |
|           | 4                                             | $102.0 \pm 0.9$                          | 1                                             | $97.3 \pm 0.5$                           |
|           | 6                                             | $96.1 \pm 0.8$                           | 1.5                                           | $101 \pm 2$                              |
| Orina # 2 | 5                                             | $101 \pm 1$                              | 1                                             | $98.4 \pm 0.8$                           |
|           | 10                                            | $98.4 \pm 0.8$                           | 2                                             | $101.7 \pm 0.9$                          |
|           | 15                                            | $99.2 \pm 0.7$                           | 4                                             | $97 \pm 1$                               |
| Orina # 3 | 4                                             | $98.8 \pm 0.6$                           | 1                                             | $99 \pm 1$                               |
|           | 8                                             | $101 \pm 1$                              | 2                                             | $100.3 \pm 0.6$                          |
|           | 12                                            | $103 \pm 1$                              | 3                                             | $102.4 \pm 0.9$                          |
| Orina # 4 | 2                                             | $101 \pm 2$                              | 0.5                                           | $104 \pm 1$                              |
|           | 4                                             | $99.6 \pm 0.9$                           | 1                                             | $101.2 \pm 0.6$                          |
|           | 6                                             | $100 \pm 1$                              | 2                                             | $99.5 \pm 0.7$                           |

<sup>a</sup>  $n = 3$

## V. Conclusiones

En esta Memoria se han desarrollado y aplicado nuevas estrategias y enfoques que han permitido el diseño de sensores espectroscópicos en flujo continuo, tendentes a incrementar la potencialidad, versatilidad y aplicabilidad de este tipo de sensores. Principalmente, se han descrito nuevas estrategias en el desarrollo de métodos que fuesen capaces de responder a más de un analito (sensores multiparámetro). Los métodos que se han descrito mediante el desarrollo de optosensores en flujo han permitido su aplicación directa a diversos campos tales como:

- Análisis de pesticidas en alimentos
- Análisis de pesticidas en aguas superficiales
- Análisis de iones metálicos en agua de consumo humano
- Análisis de principios activos (fármacos) en productos farmacéuticos y fluidos biológicos.

Con respecto al desarrollo de optosensores multiparámetro, en esta memoria se han descrito dos estrategias fundamentadas en el empleo de dispositivos «on-line» basados en principios de técnicas de separación cromatográficas, con detección fluorescente. El uso de una cantidad adicional de fase sólida en la célula de flujo, con respecto a optosensores convencionales ha sido empleado satisfactoriamente para el desarrollo de tres de los sensores descritos en esta memoria. Para llevar a cabo la separación de la mezclas binarias, se recurre a la diferencia de polaridad entre los compuestos, que se pone de manifiesto en la distinta cinética de retención/elución de cada uno de ellos al interaccionar con un soporte sólido apolar ( $C_{18}$ ). Se precisa que la diferencia de comportamiento sea suficientemente grande para que con una pequeña cantidad de fase estacionaria adicional, se puedan separar perfectamente las especies. Con esta cantidad adicional de soporte sólido se sustituye el uso de precolumnas, previas a la etapa de detección en la célula de flujo. La versatilidad y potencialidad de esta estrategia está demostrada en esta Memoria mediante su aplicación en tres métodos distintos que permiten el análisis de productos farmacéuticos, fluidos biológicos, productos fitosanitarios y aguas.

Por otra parte, también por primera vez se ha descrito el uso de una precolumna on-line dentro del sistema de flujo para el desarrollo de un optosensor mutiparámetro con detección fluorescente para la determinación simultánea de tres pesticidas (benomilo, carbarilo y fuberidazol). La aplicación de esta estrategia puede extenderse a otros campos como el farmacéutico y el alimentario.

En todos los métodos desarrollados en esta Memoria, cabe destacar que el empleo de un soporte sólido activo en la zona de detección proporciona no sólo un incremento considerable de la sensibilidad, sino que a su vez proporciona un incremento notable de selectividad con respecto a los métodos convencionales en disolución. Este incremento de selectividad permite, como se ha descrito, el análisis de muestras relativamente complejas como alimentos y fluidos biológicos, que no se podrían llevar a cabo con sistemas convencionales.

El empleo de multiconmutación para desarrollar optosensores fluorimétricos en flujo descrito en esta Memoria en 3 de los 8 métodos desarrollados (tiabendazol en cítricos, difenilamina y la mezcla de naproxeno y ácido salicílico) proporciona grandes ventajas con respecto a los sistemas de flujo continuo (FIA) que empleaban válvulas rotatorias de seis vías. El uso de multicomutación permite un mayor grado de automatización de todas las etapas de la determinación (inyección, elución, regeneración, selección de portadores, etc) y a su vez permite un menor consumo de reactivos y una menor generación de residuos. Esto hace que los métodos desarrollados sean más económicos y cómodos de implementar, lo que contribuye a aumentar el potencial de los optosensores en flujo.

Se ha demostrado la aplicabilidad de los sensores propuestos al análisis de muestras de muy diversa naturaleza, demostrándose su utilidad para el control analítico de rutina de fármacos, productos industriales, aguas naturales, fluidos biológicos, etc. La exactitud de los métodos se chequeó con estudios de recuperación y/o comparación con métodos de referencia. Por primera vez, se han desarrollado optosensores para el análisis de plaguicidas en alimentos obteniendo resultados realmente satisfactorios en comparación con la técnica de referencia empleada para estos fines (HPLC-ESI-MS)

Las distintas estrategias empleadas en el desarrollo de los optosensores en flujo incluidos en esta Memoria abren nuevas perspectivas en este campo de investigación, ya que permiten el desarrollo de nuevos métodos sencillos, económicos y rápidos para la resolución de problemas analíticos reales en diversos campos como el análisis medioambiental, alimentario y farmacéutico.

## VI. Bibliografía

- [1]** K.Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi. Ion-exchanger colorimetry—I : Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water. *Talanta* 23 (1976) 449-454.
- [2]** K. Yoshimura, H. Waki. Ion-exchanger phase absorptiometry for trace analysis. *Talanta* 32 (1985) 345-352.
- [3]** F. Capitán, E. Alonso, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, J.L. Vílchez. Determination of thiabendazole residues in water by solid-phase spectrofluorometry. *Anal. Chem.* 65 (1993) 1336-1339.
- [4]** P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Microdetermination of vitamin B1 in the presence of vitamins B2, B6 and B12 by solid-phase UV spectrophotometry. *Anal. Chem.* 70 (1998) 271-275.
- [5]** J. Ruzicka, E.H. Hansen. Optosensing at active surfaces — a new detection principle in flow injection analysis. *Anal Chim Acta* 173 (1985) 3 -21.
- [6]** J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis. *Anal. Chim. Acta* 78 (1975) 145.
- [7]** K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare. Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow. *Anal. Biochem.* 70 (1970) 167-173.
- [8]** R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro. Valves and flow injection manifolds: an excellent marriage with unlimited versatility. *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 181-192.
- [9]** J. Ruzicka, E.H. Hansen. «Flow Injection Analysis», J. Wiley, New York, 1981.
- [10]** J. Ruzicka, E.H. Hansen. Flow injection analysis: from beaker to microfluidics. *Anal. Chem.* 72 (2000) 212A-217A.
- [11]** K.K. Stewart. Flow-injection analysis: a review of its early history. *Talanta* 28 (1991) 789-797.

- [12] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P. Hare. Rapid analysis of discrete samples: the use of nonsegmented continuous flow. *Anal. Biochem.* 70 (1976) 167-173.
- [13] J. Martinez-Calatayud. «Flow injection analysis of Pharmaceuticals. Automation in the laboratory». Ed. Taylor and Francis, Londres, 1996.
- [14] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. «Flow injection Analysis. A practical guide». Ed. Elsevier, Amsterdam, Netherlands, 1989.
- [15] M. F. Mousavi, A. Jabbari, S. Nouroozi. A sensitive flow-injection method for determination of trace amounts of nitrite. *Talanta* 45 (1998) 1247-1253.
- [16] A. Molina Díaz, I. Ortega Carmona, M.I. Pascual Reguera. Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis. *Talanta* 47 (1998) 531-536.
- [17] A. A. Ensafi, A. Kazemzadeh. Simultaneous determination of nitrite and nitrate in various samples using flow injection with spectrophotometric detection. *Anal. Chim. Acta*, 382 (1999) 15-21.
- [18] C. Sánchez Pedreño, M.S. García, M.I. Albero, J. Rodríguez. Flow-injection spectrophotometric determination of piroxicam. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 11 (1993) 933-938.
- [19] S. Kulmala, J. Suomi. Current status of modern analytical luminescence methods. *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 21-69.
- [20] A. Fernández-Gutierrez, S.G. Schulman. «Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica». Editorial de la Universidad de Granada, Granada, 2001.
- [21] J. Kuijt, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer. Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry. *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 135-171.
- [22] P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou. Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution studies of bumetanide in pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 131-136.
- [23] A. Ensafi, B. Rezaei. Speciation of Thallium by Flow Injection Analysis with Spectrofluorimetric Detection. *Microchem. J.* 60 (1998) 75-83.

- [24] J.A. Murillo Pulgarín, L.F. García Bermejo. Flow-injection stopped-flow spectrofluorimetric kinetic determination of paracetamol based on its oxidation reaction by hexacyanoferrate(III). *Anal. Chim. Acta* 333 (1996) 59-69.
- [25] J. L. Vílchez, M.C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero, L. F. Capitán. Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 439 (2001) 299-305.
- [26] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens. «Chemiluminescence in Analytical Chemistry», Ed. Marcel Dekker, 2001.
- [27] K. Robards, P.J. Worsfold. Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* 266 (1992) 1471-73.
- [28] Y. Fuster Mestre, L Lahuerta-Zamora., J. Martinez-Calatayud. Flow-chemiluminescence: a growing modality of pharmaceutical analysis. *Luminescence* 16 (2001) 213-235.
- [29] Z.Y. Zhang, S.C. Zhang, X.R. Zhang. Recent developments and applications of chemiluminescence sensors. *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 37-47.
- [30] A. N. Anthemidis, G. A. Zachariadis, J. A. Stratis. Gallium trace on-line preconcentration/separation and determination using a polyurethane foam mini-column and flame atomic absorption spectrometry: Application in aluminum alloys, natural waters and urine. *Talanta* 60 (2003) 929-936.
- [31] N. M. M. Coelho, A. C. da Silva, C. M. da Silva. Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 460 (2002) 227-233.
- [32] G. E. Roscoe, R. Miles, C.G. Taylor. Determination of potassium in gasoline and lubricating oils by a flow-injection technique with flame atomic emission spectrometric detection. *Anal. Chim. Acta* 234 (1990) 439-444.
- [33] L. L. Sombra, M. O. Luconi, L. P. Fernández, R. A. Olsina, M. F. Silva, L. D. Martínez. Assessment of trace aluminium content in parenteral solutions by combined cloud point preconcentration—flow injection inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2003) 1451-1458.
- [34] E. Neide V. M. Carrilho, J. A. Nóbrega, T. R. Gilbert. The use of silica-immobilized brown alga (*Pilayella littoralis*) for metal preconcentration and determination by inductively coupled plasma optical emission spectrometry. *Talanta* 60 (2003) 1131-1140.

- [35] N. V. Semenova, L. O. Leal, R. Forteza, V. Cerdà. Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 217-225.
- [36] M. Barco, C. Planas, O. Palacios, F. Ventura, J. Rivera, J. Caixach. Simultaneous quantitative analysis of anionic, cationic and non-ionic surfactants in water by electrospray ionization mass spectrometry with flow injection analysis. *Anal. Chem.* 75 (2003) 5129-5136.
- [37] N. Wade, K. Miller. Determination of active ingredient within pharmaceutical preparations using flow injection mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 669-678.
- [38] M. Trojanowicz. «Flow Injection Analysis. Instrumentation and Applications. World Scientific Publishing, Singapur, 2000.
- [39] M. Miró, W. Frentzel, «Flow Injection Analysis/Detection Techniques, Chapter 3, en *Encyclopedia of Analytical Science*, 2<sup>nd</sup> Edition», 2005, Elsevier Academic Press; P.J. Worsfold, A. Townshend, C.F. Poole (Ed.).
- [40] J. Ruzicka, G.D. Marshall. Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays. *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343.
- [41] J.V. García-Mateo. Multicommutation in flow analysis. (<http://www.uv.es/FlowAnalysis/J.Vicente-multicommutation.htm>)
- [42] M. Catalá-Icardó, J.V. García-Mateo, J. Martínez-Calatayud. Multicommutation as a powerful new analytical tool. *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 366-378
- [43] F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos. Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends. *Anal. Chim. Acta* 468 (2002) 119-131.
- [44] B. Gómez-Taylor Corominas. «Nuevos métodos de análisis en flujo (FIA y multiconmutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 2003. ISBN.: 84-370-5894-5.
- [45] A.F. Kapanan, M.C. Magno. Continuous-flow injection for flow-injection analysis. *Anal. Chem.* 58 (1986) 509-510.

- [46] J.Y. Neira, N. Reyes, J.A. Nobrega. Development of hardware and software for online sample preparation using sequential injection analysis. *Lab. Robot. Autom.* 12 (2000) 246-252.
- [47] L.F. Capitán Vallvey, N. Navas Iglesias, I. De Orbe Payá, R. Avidad Castañeda. Simultaneous determination of quinoline yellow and brilliant blue FCF in cosmetics by solid-phase spectrophotometry. *Talanta* 43 (1996) 1457-1463.
- [48] F. Capitán, L.F. Capitán-Vallvey, M. D. Fernández, I. De Orbe-Payá, R. Avidad-Castañeda. Determination of colorant matters mixtures in foods by solid-phase spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 331 (1996) 141-148.
- [49] M.L.Fernández de Córdova, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz. Solid-phase spectrophotometric microdetermination of iron with ascorbic acid and ferrozine. *Fresenius J. Anal. Chem.* 357 (1997) 44-49.
- [50] C.A. Heller, R.R. McBride, M.A. Ronning. Detection of trinitrotoluene in water by fluorescent ion-exchange resins. *Anal. Chem.* 49 (1977) 2251-2253.
- [51] A. Molina Díaz, J.M. Herrador Mariscal, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey. Determination of traces of aluminium with chrome azurol S by solid-phase spectrophotometry. *Talanta* 40 (1993) 1059-1066.
- [52] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz. A rapid and selective solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and urine. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 247-254.
- [53] F. Capitán, G. Sánchez Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán Vallvey, J.L. Vílchez. Simultaneous determination of molybdenum and tungsten by first-derivative synchronous solid-phase spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 259 (1992) 345-353.
- [54] J.L. Vílchez, M. del Olmo, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon residues in water by synchronous solid-phase spectrofluorometry. *Analyst* 119 (1994) 121-1214.
- [55] A. Molina-Díaz, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova. The potential of flow-through optosensors in pharmaceutical analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 399-419.

- [56] Z. Gong, Z. Zhang. Development of a modified beta-cyclodextrin based optosensor for dipyridamole. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 138-140.
- [57] P. Van Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei. A Solid-state chemiluminescence detector for hydrogen peroxide based on an immobilized luminophore. Application to rain water. *Anal. Chim. Acta* 174 (1985) 151-161.
- [58] J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel. Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material. *Anal. Chim. Acta.* 360 (1998) 17-26
- [59] J.L. Suarez-Rodríguez, M.E. Díaz-García. Flavonol fluorescent flow-through sensing based on a molecular imprinted polymer. *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 67-76.
- [60] S. Al-Kindy, R. Badía, J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz-García. Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 30 (2000) 291-309.
- [61] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. Fast flow-injection fluorimetric determination of amiloride by using a solid sensing zone. *Talanta* 56 (2002) 1005-1013.
- [62] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. Determination of triamterene by transitory retention in a continuous flow solid phase system with fluorimetric transduction. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 721-728.
- [63] J. López-Flores, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Implementation of flow-through solid phase spectroscopic transduction with photochemically induced fluorescence: determination of thiamine. *Anal. Chim. Acta* 535 (2005) 161-168.
- [64] J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel. Room-temperature phosphorescence (bio)chemical sensors. *Quim. Anal.* 19 (2000) 189-203.
- [65] F. Álava-Moreno, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel. Room temperature phosphorescence optosensor for tetracyclines. *Anal. Chim. Acta* 281 (1993) 637-644.
- [66] F. Álava-Moreno, M.J. Valencia-González, M.E. Díaz-García. Room temperature phosphorescence optosensor for anthracyclines. *Analyst* 123 (1998) 151-154.

- [67] R.M. Cuenca-Trujillo, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz. Room-temperature phosphorescence flow-through optosensor for determination of ciprofloxacin based on lanthanide sensitized luminescence. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1268-1272.
- [68] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. Terbium-sensitized luminescence optosensor for the determination of norfloxacin in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* 532 (2005) 159-164.
- [69] W. Qin. Flow-injection chemiluminescence based chemical sensors. *Anal. Lett.* 35 (2002) 2207-2220.
- [70] P. Ortega-Barrales, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, S. Garrigues, M. De la Guardia. Solid phase fourier transform near infrared spectroscopy. *Analyst* 124 (1999) 579-582.
- [71] M. Haberkorn, P. Hinsmann, B. Lendl. A mid-IR flow-through sensor for direct monitoring of enzyme catalysed reactions. Case study: measurements of carbohydrates in beer. *Analyst* 127 (2002) 109-113.
- [72] A. Perez-Ponce, B. Lendl. Mid-IR spectroscopy for the quantitation of metal ions in aqueous solution in the nanogram range. *Applied Spectroscopy* 54 (2000) 676-680.
- [73] B. Lendl, R. Schindler. Flow-through sensors for enhancing sensitivity and selectivity of FTIR spectroscopy in aqueous media. *Vibrational Spectroscopy* 19 (1999) 1-10.
- [74] N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzelbock, R. Kellner. Surface enhanced Raman spectroscopy as a molecular specific detection system in aqueous flow-through systems. *Analyst* 123 (1998) 1057-1060.
- [75] M. J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, J. Frank, B. Lendl. Bead injection for surface enhanced Raman spectroscopy: automated on-line monitoring of substrate generation and application in quantitative analysis. *Analyst* 127 (2002) 1365-1369.
- [76] M.J. Ruedas Rama, M. López-Sánchez, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada. Flow-through sensor with Fourier Transform Raman detection for determination of sulfonamides. *Analyst* 130 (2005) 1617-1623.
- [77] M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz. Bead injection spectroscopic flow-through renewable surface sensors with commercial flow cells as an

- alternative to reusable flow-through sensors. *Anal. Chim. Acta* 482 (2003) 209-217.
- [78]** C. De Liñan. «Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales», edición XXI. Aerotécnicas S. L., Madrid, España, 2005.
- [79]** M. Chiba, E.A. Cherniak. Kinetic study of Reversible Conversión of Methyl 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (Benomyl) to Methyl 2-Benzimidazole carbamate (MBC) and n-Butyl Isocyanate (BIC) in Organic Solvents. *J. Agric. Food. Chem.* 26 (1978) 573-576.
- [80]** J.-P. Calmon, D.R. Sayag. Instability of Methyl 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (Benomyl) in Various solvents. *J. Agric. Food. Chem.* 24 (1976) 426-428
- [81]** R.P. Singh, C. H. Marvin, I. D. Brindle, C. D. Hall, M. Chiba. Stabilization of Methyl[1-butylcarbamoyl]-1H-benzimidazole-2-yl]carbamate (Benomyl) in hydrochloric acid solutions. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1303-1306.
- [82]** F. García-Sánchez, A. Aguilar-Gallardo. Fluorimetric determination of the fungicide benomyl after solvolysis. *Mikrochim. Acta* 116 (1994) 211-218.
- [83]** F. García-Sánchez, A. Navas-Díaz, M.M. López-Guerrero. Modulated anisotropy fluorescence for quantitative determination of carbaryl and benomyl. *Talanta* 60 (2003) 629-634.
- [84]** A. Coly, J.J. Aaron. Luminescence methods in pesticide analysis: Applications to the environment. *Analisis* 28 (2000) 699-709.
- [85]** A. Coly, J.J. Aaron. Fluorimetric analysis of pesticides: methods, recent developments and applications. *Talanta* 46 (1998) 815-843.
- [86]** F. Garcia-Sánchez, A. Navas Díaz, M.C. Torijas. Selective determination of carbaryl and benomyl by fluorescence polarization. *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 25-32.
- [87]** G. Zweig, R.Y. Gao. Determination of benomyl by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chem.* 55 (1983) 1448-1451.
- [88]** J.L. Bernal, M.J. del Nozal, L. Toribio, J.J. Jiménez, J. Atienza. High- performance liquid chromatographic determination of benomyl and carbendazim residues in apiarian simples. *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 129-136.

- [89] R.P. Singh, M. Chiba. Determination of benomyl and its degradation products by chromatographic methods in water, wettable powder, formulations and crops. *J. Chromatogr. A* 643 (1993) 249-260.
- [90] C.H. Marvin, I.D. Brindle, R.P. Singh, C.D. Hall, M. Chiba. Simultaneous determination of trace concentrations of benomyl, carbendazim (MBC) and nine other pesticides in water using an automated on-line preconcentration high-performance liquid chromatographic method. *J. Chromatogr. A* 518 (1990) 242-249
- [91] Y. Yamazaki, T. Ninomiya. Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography and gas chromatography. *J. AOAC Int.* 82 (1999) 1474-1478.
- [92] M. Anastassiades, W. Schwack. Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction. *J. Chromatography A* 825 (1998) 45-54.
- [93] K.A. Bean, J.D. Henion. Determination of carbendazim in soil and lake water by immunoaffinity extraction and coupled-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 791 (1997) 119-126.
- [94] J.L. Vílchez, L.F. Capitán-Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad. Determination of benomyl residues in waters by solid-phase spectrofluorimetry. *Analyst* 120 (1995) 1609-1611.
- [95] A. Garrido-Frenich, D. Picón Zamora, J.L. Martínez-Vidal, M. Martínez-Galera. Standardization of SPE signals in multicomponent analysis of three benzimidazolic pesticides by spectrofluorometry. *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 211-222.
- [96] J. Sancenon, M. De la Guardia. Micellar enhanced fluorimetric determination of carbendazim in natural waters. *Anal. Chim. Acta* 287 (1994) 49-57
- [97] R.M. Maggio, G.N. Piccirilli, G.M. Escandar. Fluorescence enhancement of carbendazim in the presence of cyclodextrins and micellar media: a reappraisal. *Applied Spectroscopy* 59 (2005) 873-880.
- [98] J.J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez. A new strategy for the chemiluminescent screening analysis of total N-methylcarbamate content in water. *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 111-116.

- [99] P. Hernández, Y. Ballesteros, F. Galán, L. Hernández. Determination of carbendazim with a graphite electrode modified with silicone OV-17. *Electroanalysis* 8 (1996) 941-946.
- [100] M.J. Gonzalez de la Huebra, P. Hernandez, O. Nieto, Y. Ballesteros, L. Hernández. Determination of carbendazim in soil samples by anodic stripping voltammetry using a carbon fiber ultramicroelectrode». *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 474-478.
- [101] M.J. González de la Huebra, P. Hernández, Y. Ballesteros, L. Hernández. Rapid identification of carbendazim and linuron by adsorptive stripping on a carbon fiber ultramicroelectrode. *Fresenius J. Anal. Chem.* 368 (2000) 853-856.
- [102] J.A. Irak, M.Y. Selisker, S.W. Jourdan, J.R. Fleeker, D.P. Herzog. Determination of benomyl (as carbendazim in water, soil, and fruit juice by a magnetic particle-based immunoassay. *J. Agric. Food Chem.* 41 (1993) 2329-2332.
- [103] G. Meszlenyi, J. Kortvelyessy, E. Juhasz, M. Lelkes. Determination of carbendazim in benomyl using infrared spectrophotometry. *Analyst* 115 (1990) 1491-1493.
- [104] E.A. Hogendoorn, K. Westhuis, E. Dijkman, H.A.G. Heusinkveld, P. Chamraskul, P. Biadul, R.A. Baumann, A.A. Cornelese, M.A. Van der Linden. Determination of carbendazim in water, soil and sediment samples by RPLC with and without switching and various spectrometric detection modes. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 78 (2000) 67-85.
- [105] D.H. Thomas, V. López-Ávila, L.D. Betowski, J. Van Emon. Determination of carbendazim in water by high-performance immunoaffinity chromatography online with high performance liquid chromatography with diode-array or mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 724 (1996) 207-217.
- [106] R. Halko, C.P. Sanz, C.S. Ferrate, J.J. Santana-Rodríguez. Determination of benzimidazole fungicides by HPLC with fluorescence detection after micellar extraction. *Chromatographia* 60 (2004) 151-156.
- [107] Y.S. Wu, H.K. Lee, S.F.Y. Li. Determination of carbendazim residues in grains by solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography with ultraviolet detection. *J. Chromatographic Science* 35 (1997) 513-518.
- [108] C.H. Marvin, I.D. Brindle, D.C. Hall, M.Chiba. Rapid on-line precolumn high-performance liquid chromatographic method for the determination of benomyl,

- carbendazim and aldicarb species in drinking water. *J. Chromatogr. A.* 555 (1991) 147-154.
- [109]** M. Chiba, R.P. Singh. High-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of benomyl and carbendazim in aqueous media. *J. Agric. Food Chem.* 34 (1986) 108-112.
- [110]** F. García-Sánchez, C. Cruces-Blanco. Spectrofluorometric determination of pesticide residue mixtures by isodifferential derivative spectroscopy». *Anal. Chem.* 60 (1988) 323-328.
- [111]** D. Picón-Zamora, J.L. Martínez-Vidal, M. Martínez-Galera, A. Garrido-Frenich, J.L. López-González, M.R. Arahál. Correction of predicted concentration in the use of solvent-based calibration lines for determining carbendazim, fuberidazole and thiabendazole in water after a SPE step. *Talanta* 60 (2003) 335-344.
- [112]** V. González-Díaz, A. González-Armas, C. Martí-Ossuna, M.L. Pérez-Pont. Spectrofluorometric determination of thiabendazole in a micellar medium. *Microchim. Acta* 111 (1993) 113-118.
- [113]** A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, B. Cañabate-Díaz, J.F. Fernández-Sánchez, A. Fernández-Gutierrez. Heavy-atom induced room-temperature phosphorescence: a straightforward methodology for the determination of organic compounds in solution. *Anal. Chim. Acta* 417 (2000) 19-30.
- [114]** L.F. Capitán-Vallvey, M. K. A. Deheidell, I de Orbe, R. Avidad. Application of partial least squares multivariate calibration for the determination of mixtures of carbaryl and thiabendazole in waters by transmitted solid phase spectrophosphorimetry. *Analyst* 124 (1999) 49-53.
- [115]** B. Tang, X. Wang, G. Guangli, Y. Wang, Z. Chen. Highly sensitive and selective room-temperature phosphorescence determination of thiabendazole by the supramolecular interaction of thiabendazole/b-cyclodextrin/Triton X-100. *Analyst* 130 (2005) 1038-1045.
- [116]** B. Cañabate-Díaz, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutierrez. Simultaneous determination of the pesticides carbaryl and thiabendazole in environmental samples by a three-dimensional derivative variable-angle and a synchronous room-temperature phosphorescence spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 57 (2003) 1585-1591.

- [117] L.F. Capitán-Vallvey, M.K. Deheidell, R. Avidad. Determination of thiabendazole in foods and waters by solid-phase transmitted room-temperature phosphorescence. *Microchimica Acta* 130 (1999) 273-279.
- [118] Límites máximos de residuos de productos fitosanitarios. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, España. Actualizado 03-05-2004.
- [119] [http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph\\_ps/pest/index.en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/fs/ph_ps/pest/index.en.htm)
- [120] Codex Alimentarius Commission, <http://www.fao.org>
- [121] Codex Alimentarius Commission, Report of the 28th session of the Codex Committee on Pesticide Residues, 15-20 April 1996.
- [122] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi. Rapid simultaneous determination of orto-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization. *J. Chromatogr. A* 1022 (2004) 145-150.
- [123] M. Fernández, R. Rodríguez, Y. Picó, J. Mañes. Liquid chromatographic - mass spectrometric determination of post-harvest fungicides in citrus fruits. *J. Chromatogr. A* 912 (2001) 301-310.
- [124] I. Ferrer, J.F. García-Reyes, M. Mezcua, E.M. Thurman, A.R. Fernández-Alba. Multi-residue pesticide analysis in fruits and vegetables by liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*. 1082 (2005) 81-90.
- [125] S. Takeda, K. Fukushi, K. Chayama, Y. Nakayama, Y. Tanaka, S.-I. Wakida. Simultaneous separation and on-line preconcentration of amitrole and benzimidazole pesticides by capillary electrophoresis with a volatile migration buffer applicable to mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*. 1051 (2004) 297-301.
- [126] C.K. Kaltsonoudis, F.N. Lamari, K.P. Prousalis, N.K. Karamanos, T. Tsegenidis. Analysis of carbendazim and thiabendazole in lemons by CE-DAD. *Chromatographia* 57 (2003) 181-184.
- [127] A. Juan-García, G. Font, Y. Picó. Quantitative analysis of six pesticides in fruits by capillary electrophoresis-electrospray-mass spectrometry. *Electrophoresis* 26 (2005) 1550-1561.

- [128] R. Rodríguez, Y. Picó, G. Font, J. Mañes. Analysis of thiabendazole and procymidone in fruits and vegetables by capillary electrophoresis-electrospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* 949 (2002) 359-366.
- [129] L.F. García, J.J. Aaron. Flow-injection analysis for the determination of thiabendazole and fuberidazole in water by spectrofluorimetry. *Mikrochim. Acta* 126 (1997) 289-294.
- [130] G. De Armas, E. Becerra, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá. Sequential injection analysis for the determination of fuberidazole and thiabendazole by variable-angle scanning fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 427 (2001) 83-92
- [131] B. Saad, N.H. Noor, M.I. Saleh, N.H. Hasim, A. Abu, N. Ali. Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection. *Food. Chem.* 84 (2004) 313-317.
- [132] J.E. Farrow, R.A. Hoodless, M. Sargent, J.A. Sidwell. Fungicide residues. Part VI. Determination of residues of post-harvest fungicides on citrus by high-performance liquid chromatography. *Analyst* 102 (1977) 752-758.
- [133] L. Yang, A. Kotani, H. Hakamata, F. Kusu. Determination of ortho-phenylphenol residues in lemon rind by high performance liquid chromatography with electrochemical detection using a microbore column. *Anal. Sci.* 20 (2004) 199-203.
- [134] L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A. Deheidell, R. Avidad. Solid-phase spectrophosphorimetric determination of the pesticide o-phenylphenol in water and vegetables. *Anal. Bioanal. Chem.* 375 (2003) 685-691.
- [135] L.F. Capitán-Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, J.L. Vílchez. Simultaneous determination of carbaryl and o-phenylphenol residues in waters by first-derivate synchronous solid-phase spectrofluorimetry. *Talanta* 40 (1993) 1695-1701.
- [136] J.L. Vílchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand, L.F. Capitán-Vallvey. Determination of (1,1'-biphenyl)-2-ol residues in waters by solid-phase spectrofluorimetry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 345 (1993) 716-719.
- [137] A. Tanaka, N. Nose, A. Hirose, A. Watanabe. Application of an improved stream distillation procedure in residue analysis. Part II. Determination of 2-phenylphenol in citrus fruits by a spectrophotometric method. *Analyst* 106 (1981) 94-99.

- [138] K.L. Bajaj, I.R. Miller, I.S. Bhatia. A sensitive colorimetric determination of 2-phenylphenol. *Anal. Chim. Acta* 84 (1976) 203-205.
- [139] K.P. Prousalis, D.A. Polygenis, A. Syrokou, F.N. Lamara, T. Tsegenidis. Determination of carbendazim, thiabendazole and o-phenylphenol residues in lemons by HPLC following sample clean-up by ion-pairing. *Anal. Bioanal. Chem.* 379 (2004) 458-463.
- [140] M. Nakazato, K. Tadano, H. Ogawa, H. Ushiyama, Y. Kawai, T. Tshigusa, Y. Tateishi, Y. Tamura. Determination of imazalil, diphenyl, thiabendazole and o-phenylphenol in citrus fruits and of imazalil and thiabendazole in banana, by high performance liquid chromatography. *J. Toxicol. Environ. Health* 41 (1995) 392-397.
- [141] Y. Kitada, M. Sasaki, K. Tanigawa. Simultaneous liquid chromatographic determination of thiabendazole, o-phenylphenol and diphenyl residues in citrus fruits, without prior clean-up. *J. AOAC Int.* 65 (1982) 1302-1304.
- [142] R. Rodríguez, Y. Picó, G. Font, J. Mañes. Analysis of post-harvest fungicides by micellar electrokinetic chromatography. *J. Chromatography A* 924 (2001) 387-396.
- [143] Y. Ito, T. Goto, H. Oka, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, N. Takahashi, H. Nakazawa. Simple and Rapid Determination of Thiabendazole, Imazalil and o-Phenylphenol in Citrus Fruit Using Flow-Injection Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. *J. Agric. Food. Chem.* 51 (2003) 861-866.
- [144] L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A. Deheidel, I. De Orbe, R. Avidad. Application of partial least squares multivariate calibration for the determination of mixtures of carbaryl and thiabendazole in waters by transmitted solid phase spectrophosphorimetry. *Analyst* 124 (1999) 49-53.
- [145] A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, J.F. Fernández-Sánchez, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández-Gutierrez. HAI-RTP Determination of pesticide Carbaryl in Different Irrigation Water Samples of South Spain. *J. Agric. Food Chem.* 48 (2000) 4453-4459.
- [146] N.L. Pancioni, A.V. Veglia. Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by  $\beta$ -cyclodextrin enhanced fluorimetric method. *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 193-202.
- [147] J.L. Vílchez, J. Rohand, I.F. Capitán-Vallvey. Simultaneous determination of carbaryl and thiabendazole in waters by derivative synchronous spectrofluorimetry. *Quim. Anal.* 14 (1995) 195-200.

- [148] M. Del Olmo, J.J. Laserna, D. Romero, J. Rohand, J.L. Vílchez. Determination of trace amounts of carbaryl in water by solid-phase laser-induced fluorescence. *Talanta* 44 (1997) 443-449.
- [149] J.L. Vílchez-Quero, J. Rohand, R. Avidad-Castañeda, A. Navalón, L.F. Capitán-Vallvey. Simultaneous determination of carbaryl and azinphos-methyl in water by first-derivative synchronous spectrofluorimetry. *Fresenius J. Anal. Chem.* 350 (1994) 626-629.
- [150] L.F. Capitán-Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, J.L. Vílchez. Simultaneous determination of carbaryl and o-phenylphenol residues in waters by first-derivative synchronous solid-phase spectrofluorimetry. *Talanta* 40 (1993) 1695-1701.
- [151] G.S. Nunes, M.P. Marco, M.L. Ribeiro, B. Barcelo. Validation of an immunoassay method for the determination of traces of carbaryl in vegetable and fruit extracts by liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A.* 823 (1998) 109-120.
- [152] M. González-Martínez, S. Morais, R. Puchades, A. Maquieira, A. Abad, A. Montoya. Monoclonal antibody-based flow-through immunosensor for analysis of carbaryl. *Anal. Chem.* 69 (1997) 1812-2818.
- [153] M.J. Abad, F. Pariente, L. Hernández, H.D. Abuña, E. Lorenzo. Determination of organophosphorus and carbamate pesticides using a piezoelectric biosensor. *Anal. Chem.* 70 (1998) 2848-2855.
- [154] K.S. Kumar, K. Suvardhan, P. Chiranjeevi. Preparation of reagents for the sensitive spectrophotometric determination of carbaryl in environmental samples. *Anal. Lett.* 38 (2005) 697-709.
- [155] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri. Two multivariate strategies applied to three way kinetic spectrophotometric data for the determination of mixtures of the pesticides carbaryl and chlorpyrifos. *Applied Spectroscopy* 58 (2004) 83-90.
- [156] K.D. Khalaf, A. Morales-Rubio, M. De la Guardia, J.M. García, F. Jimenez, J.J. Arias. Simultaneous kinetic determination of carbamate pesticides after derivatisation with p-aminophenol, by using partial least squares. *Microchem. J.* 53 (1996) 461-471.
- [157] K.D. Khalaf, A. Morales-Rubio, M. De la Guardia. Simple and rapid flow-injection spectrophotometric determination of carbaryl after liquid-liquid extraction. *Anal. Chim. Acta* 280 (1993) 231-238.

- [158] M. Nakamura, H. Taniguchi, S. Yamada, T. Itou. Synchronous second derivative fluorimetric determination of carbaryl and 1-naphthol using solid-phase extraction. *Bunseki Kagaku* 48 (1999) 841-846.
- [159] J.F. Sacenón, M. De la Guardia. Micellar enhanced flow injection fluorimetric determination of carbaryl and 1-naphthol. *Quim. Anal.* 11 (1992) 285-297.
- [160] J.F. Sacenón, J.L. Carrion, M. De la Guardia. Fluorometric determination of carbaryl in micellar media. *Talanta* 36 (1989) 1165-1169.
- [161] J. Sacenon, J.C. Carrion, M. De la Guardia. Fluorometric determination of 1-naphthol and mixtures of carbaryl and 1-naphthol in micellar media. *Fresenius J. Anal. Chem.* 336 (1990) 389-393.
- [162] J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, A. González-Casado, L. Gámiz-Gracia. Potencial of the luminol reaction in the sensitive detection of pesticide residues by flow injection analysis. *Luminescence* 19 (2004) 222-224.
- [163] J.F. Huertas-Pérez, A.M. García-Campaña, L. Gámiz-Gracia, A. González-Casado, M. Del Olmo. Sensitive determination of carbaryl in vegetal food and natural waters by flow-injection analysis based on the luminol chemiluminescence reaction. *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 161-166.
- [164] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Martín. Flow injection chemiluminescence determination of carbaryl using photolytic decomposition and photogenerated tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium (III). *Anal. Chim. Acta* 476 (2003) 141-148.
- [165] M. Gallignani, S. Garrigues, A. Martínez-Vado, M. De la Guardia. Determination of carbaryl in pesticide formulations by Fourier transform infrared spectrometry with flow analysis. *Analyst* 118 (1993) 1043-1048.
- [166] H. Nakazawa, N. Takahashi, K. Inoue, Y. Ito, T. Goto, Y. Yoshimura, H. Oka. Rapid and simultaneous analysis of dichlorvos, malathion, carbaryl and 2,4-dichlorophenoxy acetic acid in citrus fruit by flow-injection ion spray ionization tandem mass spectrometry. *Talanta* 64 (2004) 899-905.
- [167] C. Sánchez-Brunete, B. Albero, J.L. Tadeo. High-performance liquid chromatography multiresidue method for the determination of N-methyl carbamates in fruit and vegetable juices. *J. Food Protection* 67 (2004) 2565-2569.

- [168] C. Hetherton, M.D. Sykes, R.J. Fussell, D.M. Goodall. A multi-residue screening method for the determination of 73 pesticides and metabolites in fruit and vegetables using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 18 (2004) 2443-2450.
- [169] Q. Hao, H. Liu, S. Zhang, Z. Yuan. Simultaneous determination of fuberidazole and o-phenylenediamine by ultraviolet spectrophotometry-CPA matrix method. *Fenxi Shiyanshi* 17 (1998) 9-11.
- [170] F. García-Sánchez, A. Aguilar-Gallardo. Fluorimetric determination of the fungicide fuberidazole in irrigation water at low ng/mL level. *Microchem J.* 50 (1994) 161-168.
- [171] M. Martínez-Galera, D. Picón-Zamora, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña. F. Salinas-López. Determination of carbendazim, thiabendazole and fuberidazole using a net analyte signal-based method. *Talanta* 59 (2003) 1107-1116.
- [172] M. Lezcano, W. Al-Soufi, M. Novo, E. Rodríguez-Nuñez, J. Vázquez-Tato. Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins. *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 108-112.
- [173] A. Salinas, J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández. A simple and rapid phosphorimetric method for the determination of the fungicide fuberidazole in water samples. *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 85 (2005) 443-449.
- [174] A. Navas-Díaz, F. García-Sánchez, M.M. López-Guerrero. Modulated anisotropy fluorescence for quantitative determination of carbaryl and benomyl. *Talanta* 60 (2003) 629-634.
- [175] G. De Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdá. Simultaneous determination of fluorophores with overlapped spectra by sequential injection analysis coupled to variable angle scanning fluorescence spectrometry and multivariate linear regression algorithms. *Anal. Chim. Acta* 471 (2002) 173-186
- [176] F. García-Sánchez, A. Navas-Díaz, A. García-Pareja. «Normal-phase liquid chromatography on amino-bonded-phase column of fluorescence detected pesticides. *J. Liq. Chromatogr.* 18 (1995) 2543-2558.
- [177] M. Olek. Determination of diphenylamine residues in apples, and 4-aminobiphenyl residues in diphenylamine, by high-performance liquid

- chromatography and electrochemical detection. *J. Chromatogr.* 447 (1988) 421-425.
- [178]** D.R. Rusell, J.P. Matheis, J.K. Fellman. Evaluation of diphenylamine derivatives in apple peel using gradient reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet-visible absorption and atmospheric pressure chemical ionization mass selective detection. *J. Chromatogr. A.* 1081 (2005) 202-209.
- [179]** L. Yu, R. Schoen, A. Dunkin, M. Firman, H. Cushman. Rapid Identification and Quantitation of Diphenylamine, o-Phenylphenol, and Propargite Pesticide Residues on Apples by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 748-752.
- [180]** L. Yu, R. Schoen, A. Dunkin, M. Firman, H. Cushman, A. Fontanilla. Determination of o-phenylphenol, diphenylamine, and propargite pesticide residues in selected fruits and vegetables by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC Int.* 80 (1997) 651-656.
- [181]** A. Martín-Esteban, P. Fernández, C. Pérez-Conde, A. Gutierrez, C. Cámara. On-line preconcentration of aluminium with immobilized Chromophore 2B for the determination by flame atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 304 (1995) 121-126.
- [182]** EPA method 200.8. «Determination of trace elements in waters and wastes by inductively coupled plasma mass spectrometry».
- [183]** J. Zhang, H. Xu, J.L. Ren. Fluorimetric determination of dissolved aluminium in natural waters after liquid-liquid extraction into n-hexanol. *Anal. Chim. Acta* 405 (2000) 31-42.
- [184]** C. Brach-Papa, B. Coulomb, C. Branger, A. Margaillan, F. Theraulaz, P. Van Loo, J.L. Borduene. Fluorimetric determination of aluminium in water by sequential injection through column extraction. *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 1652-1658.
- [185]** X. Zhu, L. Bao, R. Guo, J. Wu. Determination of aluminium(III) in water samples in a microemulsion system by spectrofluorimetry. *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 43-48.
- [186]** Y.M. Liu, M.R. Fernández de la Campa, M.E. Díaz-García, A. Sanz Medel. Phosphorescence detection in flowing systems: selective determination of aluminum by flow-injection liquid room temperature phosphorimetry. *Anal. Chim. Acta* 234 (1990) 233-238.

- [187] M.Du, C.W. Huie. Sensitive and selective determination of aluminium by peroxyoxalate chemiluminescence detection of the lumogallion complex. *Anal. Chim. Acta* 443 (2001) 269-276.
- [188] F. Carrillo, C. Pérez, C. Cámara. Sensitive spectrofluorimetric determination of aluminium (III) with Eriochrome Red B. *Anal. Chim. Acta* 243 (1991) 121-125.
- [189] F. Carrillo, C. Pérez, C. Cámara. Sensitive flow-injection-spectrofluorimetric method to determine aluminium (III) in water. *Anal. Chim. Acta* 262 (1992) 91-96.
- [190] H. Lian, Y. Kang, S. Bi, Y. Arkin, D. Shao, D. Li, Y. Chen, L. Dai, N. Gan, L. Tian. Direct determination of trace aluminum with quercetin by reversed-phase high performance liquid chromatography. *Talanta* 62 (2004) 43-50.
- [191] S.M.Z. Al-Kindy, F.O. Suliman, S.B. Salama. A sequential injection method for the determination of aluminum in drinking water using fluorescence enhancement of the aluminum–morin complex in micellar media. *Microchem. J.* 74 (2003) 173-179.
- [192] M.J. Ruedas-Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz. Implementation of flow-through multi-sensors with bead injection spectroscopy: fluorimetric renewable surface biparameter sensor for determination of berillium and aluminium. *Talanta* 62 (2004) 879-886.
- [193] S.M.Z. Al-Kindy, R. Badia, M.E. Diaz-García. Fluorimetric monitoring of molecular imprinted polymer recognition events for aluminium. *Anal. Lett.* 35 (2002) 1763-1774.
- [194] L.A. Saari, W.R. Seitz. Immobilized morin as fluorescence sensor for determination of aluminum(III). *Anal. Chem.* 55 (1983) 667-670.
- [195] M. Ahmad, R. Narayanaswamy. Optical fibre Al(III) sensor based on solid surface fluorescence measurement. *Sens. Actuators B* 81 (2002) 259-266.
- [196] J.A. Resing, C.I. Measures. Fluorometric Determination of Al in Seawater by Flow Injection Analysis with In-Line Preconcentration. *Anal. Chem.* 66 (1994) 4105-4111.
- [197] S.H. Sutheimer, S.E. Cabaniss. Determination of trace aluminum in natural waters by flow-injection analysis with fluorescent detection of the lumogallion complex. *Anal. Chim. Acta* 303 (1995) 211-221.

- [198] C. Brach-Papa, B. Coulomb, J.-L. Boudenne, V. Cerdá, F. Theraulaz. Spectrofluorimetric determination of aluminum in drinking waters by sequential injection analysis. *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 311-318.
- [199] G. De Armas, M. Miró, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá. Time-based multisyringe flow injection system for the spectrofluorimetric determination of aluminium. *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 149-157.
- [200] Z. Zhang, W.R. Seitz. A fluorescent sensor for aluminum(III), magnesium(II), zinc(II) and cadmium(II) based on electrostatically immobilized quinolin-8-ol sulfonate. *Anal. Chim. Acta* 171 (1985) 251-258.
- [201] A. Alonso, M.J. Almendral, M.J. Porras, Y. Curto, C. García de María. Flow-injection solvent extraction with and without phase separation: Fluorimetric determination of aluminium in water. *Anal. Chim. Acta* 447 (2001) 211-217.
- [202] G. Albendin, M.P. Manuel-Vez, C. Moreno, M. García-Vargas. Reverse flow-injection manifold for spectrofluorimetric determination of aluminum in drinking water. *Talanta* 60 (2003) 425-431.
- [203] C. Jiang, B. Tang, R. Wang, J. Yen. Spectrofluorimetric determination of trace amounts of aluminium with 5-bromo-salicylaldehyde salicyloylhydrazone. *Talanta* 44 (1994) 197-202.
- [204] F. Sánchez-Rojas, E. Cristofol-Alcaráz, J.M. Cano Pavón. Determination of aluminum in water by flow-injection with fluorometric detection by using salicylaldehyde carbohydrazone as reagent in a micellar medium. *Analyst* 119 (1994) 1221-1223.
- [205] E. Destandau, V. Alain, E. Bardez. Chromotropic acid, a fluorogenic chelating agent for aluminium(III). *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 402.
- [206] C.-I. Park, K.-W. Cha. Spectrofluorimetric method for determination of aluminium with chromotropic acid and its application to water samples. *Talanta* 51 (2000) 769-774.
- [207] S. Cerutti, M.F. Silva, J.A. Gásquez, R.A. Olsina, L.D. Martínez, On-line preconcentration/determination of cadmium in drinking water on activated carbon using 8-hydroxyquinoline in a flow injection system coupled to an inductively coupled plasma optical emission spectrometer. *Spectrochim. Acta. B* 58 (2003) 43-50.

- [208] E. Skrzydlewska, M. Balcerrak, F. Vanhaecke. Determination of chromium, cadmium and lead in food-packaging materials by axial inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 479 (2003) 191-202.
- [209] E. Vassileva, C.R. Quetel. Certification measurement of the cadmium, copper and lead contents in rice using isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 79-86.
- [210] H.-W. Sun, R. Suo. Enhancement reagents for simultaneous vapor generation of zinc and cadmium with intermittent flow system coupled to atomic fluorescence spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 509 (2004) 71-76.
- [211] A.N. Anthemidis, G.A. Zachariadis, C.G. Farastelis, J.A. Stratis. On-line liquid-liquid extraction system using a new phase separator for flame atomic absorption spectrometric determination of ultra-trace cadmium in natural waters. *Talanta* 62 (2004) 437-443.
- [212] M.C. Yebra-Biurrun, A. Moreno-Cid, L. Puig. Minicolumn field preconcentration and flow injection flame atomic absorption spectrometric determination of Cd in seawater. *Anal. Chim. Acta* 524 (2004) 73-77.
- [213] J. Ruiz-Jimenez, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro. Dynamic ultrasound-assisted extraction of cadmium and lead from plants prior to electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 480 (2003) 231-237.
- [214] M.F. Enríquez-Domínguez, M.C. Yebra-Biurrun, M.P. Bermejo-Barrera. Determination of cadmium in mussels by flame atomic absorption spectrometry with preconcentration on a chelating resin in a flow injection system. *Analyst* 123 (1998) 105-108.
- [215] E.A. Hernandez-Caraballo, M. Burguera, J.L. Burguera. Determination of cadmium in urine specimens by graphite furnace atomic absorption spectrometry using a fast atomization program. *Talanta* 63 (2004) 419-424.
- [216] L.A. Pereira, I.G. De Amorim, J.B. Borba de Silva. Development of methodologies to determine aluminum, cadmium, chromium and lead in drinking water by ET AAS using permanent modifiers. *Talanta* 64 (2004) 395-400.
- [217] S. Suteerapataranon, J. Jakmunee, Y. Vaneesorn, K. Grudpan, Exploiting flow injection and sequential injection anodic stripping voltammetric systems for simultaneous determination of some metals. *Talanta* 58 (2002) 1235-1242.

- [218] Y. Bonfil, E. Kirowa-Eisner, Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode. *Anal. Chim. Acta* 457 (2002) 285-296
- [219] D. Sancho, M. Vega, L. Debán, R. Pardo, G. González, Determination of Zinc, Cadmium and Lead in Untreated Sugar Samples by Anodic Stripping Voltammetry. *Analyst* 122 (1997) 727-730.
- [220] L. Hernández, J.M. Melguizo, M.H. Blanco, P. Hernández. Determination of cadmium (II) with a carbon paste electrode modified with an ion exchange resin. *Analyst* 114 (1989) 397-399.
- [221] R. Agraz, M.T. Sevilla, J.M. Pinilla, L. Hernández. Voltammetric determination of cadmium on a carbon paste electrode modified with a chelating resin». *Electroanalysis* 3 (1991) 393-397.
- [222] C. Hu, K. Wu, X. Dai, S. Hu, Simultaneous determination of lead(II) and cadmium(II) at a diacetyldioxime modified carbon paste electrode by differential pulse stripping voltammetry. *Talanta* 60 (2003) 17-24.
- [223] O. A. Farghaly, Direct and simultaneous voltammetric analysis of heavy metals in tap water samples at Assiut city: an approach to improve the analysis time for nickel and cobalt determination at mercury film electrode. *Microchem J.* 75 (2003) 119-131
- [224] E. Muñoz, S. Palmero, M.A. García-García, A continuous flow system design for simultaneous determination of heavy metals in river water samples. *Talanta* 57 (2002) 985-992.
- [225] C. Whitchurch, A. Andrews, Development and characterization of a novel electrochemiluminescent reaction involving cadmium. *Analyst* 125 (2000) 2065-2070.
- [226] S. Tanikkul, J. Jakmunee, S. Lapanantnoppakhun, M. Rayanakorn, P. Sooksamiti, R. E. Synovec, G. D. Christian, K. Grudpan, Flow injection in-valve-mini-column pretreatment combined with ion chromatography for cadmium, lead and zinc determination. *Talanta* 64 (2004) 1241-1246.
- [227] I.M. Raimundo, R. Narayanaswamy, Simultaneous determination of Zn(II), Cd(II) and Hg(II) in water. *Sensors Actuators B* 90 (2003) 189-197.
- [228] E. Castillo, J.L. Cortina, J.L. Beltrán, M.D. Prat, M. Granados, Simultaneous determination of Cd(II), Cu(II) and Pb(II) in surface waters by solid phase

- extraction and flow injection analysis with spectrophotometric detection. *Analyst* 126 (2001) 1149-1153.
- [229]** C. Sánchez-Pedreño, M.S. García, J.A. Ortuño, M.I. Albero, R. Expósito, Kinetic methods for the determination of cadmium(II) based on a flow-through bulk optode. *Talanta* 56 (2002) 481-489.
- [230]** R. Compañó, R. Ferrer, J. Guiteras, M.D. Prat, Spectrofluorimetric detection of zinc and cadmium with 8-(benzenesulfonamido)-quinoline immobilized on a polymeric matrix. *Analyst* 119 (1994) 1225-1228
- [231]** S. Charles, S. Yunus, F. Dubois, E.V. Donckt, Determination of cadmium in marine waters: on-line preconcentration and flow-through fluorescence detection. *Anal. Chim. Acta* 440 (2001) 37-43.
- [232]** S. Charles, F. Dubois, S. Yunus, E.V. Donckt, Determination by Fluorescence Spectroscopy of Cadmium at the Subnanomolar Level: Application to Seawater. *J. Fluorescence* 10 (2000) 99-105.
- [233]** B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Spectrofluorimetric method for the rapid screening of toxic heavy metals in water samples. *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 203-210.
- [234]** K. Soroka, R.S. Vithanage, D.A. Phillips, B. Walker, P.K. Dasgupta, Fluorescence Properties of metal complexes of 8-hydroxyquinoline-5-sulfonic acid and chromatographic applications. *Anal. Chem.* 59 (1987) 629-636.
- [235]** Yi-Bin Qu. New reagent for spectrophotometric determination of salicylic acid. *Talanta* 38 (1991) 1061-1066.
- [236]** J. Klimundova, H. Sklensrova, U.F. Schaefer, P. Solich. Automated system for release studies of salicylic acid based on a SIA method. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 893-898.
- [237]** S. Ortega-Algar, N: Ramos-Martos, A. Molina-Díaz. Fast and single solid phase fluorescence spectroscopic batch procedure for (acetyl) salicylic acid determination in drug formulations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 31 (2003) 439-446.
- [238]** N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz, A. Navalón, I. De Orbe Payá, L. F. Capitán Vallvey. Simultaneous spectrofluorimetric determination of (acetyl)salicylic acid, codeine and pyridoxine in pharmaceutical preparations using partial least-squares multivariate calibration. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 837-844.

- [239] Y. Goto, K. Makino, Y. Kataoka, H. Shuto, R. Oishi. Determination of salicylic acid in human serum with capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. B.* 706 (1998) 329-335.
- [240] R. Pirker, C.W. Huck, M. Popp. G.K. Bonn. Simultaneous determination of gentisic, salicyluric and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Chromatogr. B.* 809 (2004) 257-264.
- [241] C. Albrecht, W. Thormann. Determination of naproxen in liver and kidney tissues by electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection. *J. Chromatogr. A.* 802 (1998) 115-120.
- [242] A. Kunkel, S. Günter, H. Wätzig. Quantitation of acetaminophen and salicylic acid in plasma using capillary electrophoresis without sample pretreatment improvement of precision. *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 125-133.
- [243] J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutierrez. Room-temperature luminescence optosensings based on immobilized active principles actives: Application to nafronyl and naproxen determination in pharmaceutical preparations and biological fluids. *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 217-224.
- [244] P.C. Damiani, M. Bearzotti, M. A. Cabezón. Spectrofluorometric determination of naproxen in tablets. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 229-238.
- [245] A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, M.I. Ramirez-García, B. Cañabate-Díaz, A. Fernández-Gutierrez. Simple and rapid determination of the drug naproxen in pharmaceutical preparations by heavy atom-induced room temperature phosphorescence. *Talanta* 50 (1999) 401-407.
- [246] T. Pérez.Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, J. Carpena. Selective determination of naproxen in the presence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in serum and urine samples using room temperature liquid phosphorimetry. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 17 (1998) 719-724.
- [247] J.A. Murillo-Pulgarín, L.F. García-Bermejo. First-derivative non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of salicylamide, salsalate and naproxen in serum and urine. *Anal. Chim. Acta* 373 (1998) 119-129.

- [248] D.G. Konstantianos, P.C. Ioannou. Second-derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of naproxen and salicylic acid in human serum. *Analyst* 121 (1996) 909-912.
- [249] P.C. Damiani, M.D. Borraccetti, A.C. Olivieri. Direct and simultaneous spectrofluorometric determination of naproxen and salicylate in human serum assisted by chemometric analysis. *Anal. Chim. Acta* 471 (2002) 87-96.
- [250] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, G.M. Escáandar. First- and second-order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine. *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 451-459.
- [251] A. Navalón, R. Blanc, M. Del Olmo, J.L. Vílchez. Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (PLS) multivariate calibration. *Talanta* 48 (1999) 469-475.
- [252] G.A. Ibáñez, G.M. Escandar. Combined liquid and solid-surface room temperature fluorimetric determination of naproxen and salicylate in serum. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37 (2005) 149-155.
- [253] K. Yoshimura. Application of ion-exchanger phase absorptiometry to flow analysis. Determination of trace amounts of chromium (VI) in water. *Analyst* 113 (1988) 471-474.
- [254] K. Yoshimura. Implementation of ion-exchanger Absorptiometric Detection in Flow Analysis systems. *Anal. Chem.* 59 (1987) 2922-2924.
- [255] M.M. Jiménez-Carmona, M.D. Luque de Castro. An approach for monitoring subcritical water extraction kinetics of fluorescent analytes. *Anal. Chim. Acta* 342 (1997) 215-221.
- [256] L.F. Capitan-Vallvey, M.C. Valencia, E.A. Nicolás. Simple resolution of butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in fatty foods and cosmetics by flow injection solid phase spectrophotometry. *J. Food. Sci.* 68 (2003) 1595-1599.
- [257] E.J. Llorent-Martínez, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. Solid-phase ultraviolet sensing system for determination of methylxanthines. *Anal. Bioanal. Chem.* 382 (2005) 158-163.
- [258] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Integrated flow injection-solid phase spectrophotometric determination of minoxidil. *Talanta* 50 (1999) 277-282.

- [259] A. Segura-Carretero, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. Low-level mercury determination with thiamine by fluorescence optosensing. *Talanta* 49 (1999) 907-913.
- [260] J.F. García-Reyes, E.J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. The potential of combining solid-phase optosensing and multicommutation principles for routine analyses of pharmaceuticals. *Talanta* 68 (2006) 1482-1488.
- [261] R. Badía, M.E. Díaz-García. Cyclodextrin based optosensor for the determination of warfarin in waters. *J. Agric. Food. Chem.* 47 (1999) 4256-4260.
- [262] J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutierrez. The development of solid surface characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples. *Talanta* 60 (2003) 287-293.
- [263] J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz-García. Fluorescent competitive flow-through assay for chloramphenicol using molecularly imprinted polymers. *Biosens. Bioelectronics.* 16 (2001) 955-961.
- [264] R. Badía, M.E. Díaz-García. Room temperature phosphorescence flow-through biosensing of anionic surfactants. *Anal. Chim. Acta* 371 (1998) 73-80.
- [265] L.F. Capitán-Vallvey, M.C. Valencia, E. Arana-Nicolás. Monoparameter sensors for the determination of the antioxidants butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in foods and cosmetics by flow-injection spectrophotometry. *Analyst* 126 (2001) 897-902.
- [266] M.C. Valencia, F. Uroz, Y. Tafersiti, L.F. Capitan-Vallvey. A flow-through sensor for the determination of the dye Sunset Yellow and its subsidiary Sudan I in foods. *Quim. Anal.* 19 (2000) 129-134.
- [267] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-Through (Bio)chemical sensors*, Elsevier, Amsterdam (1994).
- [268] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz. A selective optosensor for UV spectrophotometric determination of thiamine in the presence of other vitamins B». *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 227-233.
- [269] A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova. Determination of ascorbic acid by use of a flow-through solid phase UV spectrophotometric system. *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 92-97.

- [270] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz. Sensitive and simple determination of diclofenac sodium by use of a continuous flow-injection procedure with solid-phase spectroscopic detection. *Anal. Sci.* 15 (1999) 985-989.
- [271] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz. Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 22 (2000) 59-66.
- [272] B. S. Vicente de la Riva, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz Medel. Flow-through room temperature phosphorescence optosensing for the determination of lead in sea water. *Anal. Chim. Acta* 395 (1999) 1-9.
- [273] R.B. Lowry, C.E. Williams, J. Braven. Initial studies of an immobilised, regenerable chemiluminescent sensor. *Talanta* 63 (2004) 961-966.
- [274] N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzénböck, B. Mizaikoff, R. Kellner. Continuous surface enhanced Raman spectroscopy for the detection of trace organic pollutants in aqueous systems. *J. Molecular Structure* 410-411 (1997) 539-542.
- [275] A. Edelmann, B. Lendl. Towards the optical tongue: Flow-through sensing of tannin-protein interactions based on FTIR spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* 124 (2002) 14741-14747.
- [276] B. Fernández-Band, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel. Flow-through sensor for the direct determination of pesticide mixtures without chromatographic separation. *Anal. Chem.* 63 (1991) 1671-1675.
- [277] P. Ortega-Barrales, A. Domínguez-Vidal, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 25 (2001) 619-630.
- [278] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. A simple solid phase spectrofluorimetric method combined with flow analysis for the rapid determination of salicylamide and salicylic acid in pharmaceutical samples. *Fresenius J. Anal. Chem.* 365 (1999) 619-624.
- [279] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. A very simple resolution of the mixture paracetamol and salicylamide by flow-injection solid phase spectrophotometry. *Anal. Chim. Acta* 394 (1999) 149-158.

- [280] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera. A flow through solid-phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol. A. Molina-Díaz. *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 131-139.
- [281] A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Use of a continuous-flow solid phase spectroscopic sensor using two sensing zones: determination of thiamine and ascorbic acid. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 369-374.
- [282] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and acetylsalicylic acid by means of a FI ultraviolet PLS optosensing device. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21 (1999) 983-992.
- [283] A. Domínguez-Vidal, B. Muik, M. Ayora-Cañada, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. A chemometric flow-through multiptosensor based on implementation of PLS analysis with fluorimetric transduction for the determination of a ternary pesticide mixture. Enviado a publicar.
- [284] B. Fernández-Band, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel. Flow injection determination of mixtures of amines immobilized in the flow cell of a photometric diode-array detector. *Anal. Chim. Acta* 229 (1990) 177-182.
- [285] E. Vereda, A. Ríos, M. Valcárcel. Simultaneous automatic determination of trace amounts of copper and cobalt by use of a flow-through sensor and first-derivative spectrometry. *Analyst* 122 (1997) 85-88.
- [286] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel. Flow-through sensing device based on a derivative synchronous fluorescence measurements for the multidetermination of B-6 vitamins. *Anal. Chim. Acta* 261 (1992) 269-274.
- [287] M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz, L.F. Capitán-Vallvey. Solid-phase UV spectroscopic multisensor for the simultaneous determination of caffeine, dimenhydrinate and acetaminophen by using partial least squares multicalibration. *Talanta* 49 (1999) 691-701.
- [288] P. Cañizares, M.D. Luque de Castro. On-line coupling of isolation/in situ concentration integrated with derivative synchronous spectrofluorimetry for the simultaneous determination of ephedrine and norepinephrine in urine. *Anal. Chim. Acta* 317 (1995) 335-341.

- [289] S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz. A flow-through fluorimetric sensing device for the determination of a- and b-naphthol mixtures using a partial-least squares multivariate calibration approach. *Talanta* 60 (2003) 313-323.
- [290] P. Cañizares, M.D. Luque de Castro. Flow-through sensor based on derivative synchronous fluorescence spectrometry for the simultaneous determination of pyrene, benzo(e)pyrene, benzo(ghi)perylene in water. *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 291-295.
- [291] A. Domínguez-Vidal, J.F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. UV spectrophotometric Flow-through multiparameter sensor for the simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine. *Anal. Lett.* 35 (2002) 2433-2447.
- [292] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. Simultaneous determination of paracetamol, caffeine and propifenazone in pharmaceuticals by means of a single-Flow-through UV Multiparameter sensor. *Microchim. Acta.* 141 (2003) 157-163.
- [293] M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz. Use of a solid sensing zone implemented with unsegmented flow analysis for simultaneous determination of thiabendazole and warfarin. *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 235-243.
- [294] E. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, M. De la Guardia, A. Molina-Díaz. Implementation of muticommution with flow-through multisensors. *Anal. Chim. Acta* 545 (2005) 113-118.
- [295] Analytical Chemistry division, IUPAC, Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II, Data interpretation. *Spectrochimica Acta Part B.* 33 (1976) 242.
- [296] Guidelines for data acquisition and data quality evaluation on environmental analytical chemistry ACS Committee on environmental improvement. *Anal. Chem.* 52 (1980) 2242.
- [297] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F.J. Schenck. Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and «Dispersive Solid-Phase Extraction» for the Determination of Pesticide Residues in Produce. *J. AOAC Int.* 86 (2003) 412-431.

## VII. Anexo

## CONTRIBUCIONES CIENTÍFICAS

### ARTÍCULOS:

1. «Gel-surface enhanced fluorescence based sensing system coupled to a continuous flow assembly for the simultaneous monitoring of benomyl and carbendazim», *Analytica Chimica Acta* 493 (2003) 35-45.
  2. «Continuous-flow separation and pre-concentration coupled on-line to solid surface fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of o-phenylphenol and thiabendazole», *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 378 (2004) 429-437.
  3. «Multiwavelength fluorescence based optosensor for simultaneous determination of fuberidazole, carbaryl and benomyl», *Talanta* 64 (2004) 742-749.
  4. «Determination of thiabendazole residues in citrus fruits using a multicommuted fluorescence-based optosensor», *Analytica Chimica Acta*, 557 (2006) 95-100.
  5. «Rapid determination of diphenylamine residues in apples and pears with a single multicommuted fluorimetric optosensor», *J. Agric. Food. Chem.* 53 (2005) 9874-9878.
  6. «Development of a solid surface fluorescence based sensing system for aluminium monitoring in drinking water», *Talanta* 65 (2005) 1203-1208.
  7. «Sensing of trace amounts of cadmium in drinking water using a single fluorescence-based optosensor», *Microchemical Journal* 82 (2006) 94-99.
- «Simultaneous determination of naproxen and salicylic acid using a solid surface fluorescence-based optosensor», **enviado a publicar.**

**COMUNICACIONES A CONGRESOS****1. «Gel-Surface Enhanced Fluorescence Sensing System Coupled to a Continuous-Flow Assembly for Simultaneous Monitoring of Benomyl and Carbendazim»**

P. Ortega Barrales, J. F. García Reyes, A. Molina Díaz.

«XXXIII COLLOQUIUM SPECTROSCOPICUM INTERNATIONALE» (CSI XXXIII), Granada, Septiembre 2003.

**2. «An Integrated Continuous Flow On-Line Preconcentration and Separation Device Implemented with Gel-Surface Enhanced Fluorescence Detection for Simultaneous Monitoring of O-phenylphenol and Thiabendazole»**

J. F. García Reyes, E. J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz.

«XXXIII COLLOQUIUM SPECTROSCOPICUM INTERNATIONALE» (CSI XXXIII), Granada, Septiembre 2003.

**3. «Fluorescence Based Optosensors Implemented with On-Line Solid-Phase Separation: Simultaneous Determination of Benomyl, Carbaryl and Fuberidazole»**

J. F. García Reyes, E. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz.

«VIII INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON ANALYTICAL METHODOLOGY IN THE ENVIRONMENTAL FIELD» (VIII ISAMEF), La Coruña, Octubre 2003.

**4. «Sensing of trace amounts of cadmium in drinking water using a single fluorescence-based optosensor»**

J. F. García Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz.

«SIMEC 2004», Huelva, Junio 2004.

**5. «Development of a continuous-flow solid surface fluorescence based sensing system for aluminium monitoring in drinking water».**

A. Molina Díaz, J. F. García Reyes, P. Ortega Barrales.

Euroanalysis XIII, Salamanca, Septiembre 2004.

**6. «The potential of combining solid-phase optosensing and multicommutation principles for routine analyses of pharmaceuticals.**

J. F. García Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz.

The Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Orlando (EE.UU), Marzo 2005.

**7. «Determination of thiabendazole residues in citrus fruits using a multicommutated fluorescence-based optosensor».**

J. F. García Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz.

Jornadas de Análisis Instrumental (JAI) /XIV Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica (SEQA), Barcelona, Noviembre 2005.

**8. «Simultaneous determination of naproxen and salicylic acid using a solid-surface fluorescence-based multicommutated flow system».**

J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz.

The Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Orlando (Florida, EE.UU), Marzo 2006.

**9. «Rapid determination of diphenylamine residues in apples and pears with a single multicommutated fluorimetric optosensor».**

J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz.

The Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON), Orlando (Florida, EE.UU), Marzo 2006.

**10. «Analytical applications of luminescence-based multicommutated flow-through optosensors in food and pharmaceutical analysis».**

J. F. García-Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz.

The Pittsburg Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (PITTCON)

Orlando (Florida, EE.UU), Marzo 2006.

**OTROS ARTÍCULOS PUBLICADOS RELACIONADOS CON EL MISMO TEMA**

1. AUTORES: A. Domínguez-Vidal, J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: UV Spectrophotometric flow through multiparameter sensor for the simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine.

Analytical Letters 35 (15) (2002) 2433-2447.

2. AUTORES: J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: Development of a Single Fluorescence-Based Optosensor for Rapid Simultaneous Determination of Fungicides Benomyl and Thiabendazole in Waters and Commercial Formulations.

Journal of Agricultural and Food Chemistry 52 (2004) 2197-2202.

3. AUTORES: E. J. Llorent-Martínez, J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: Terbium-sensitized luminescence optosensor for the determination of norfloxacin in biological fluids

Analytica Chimica Acta 532 (2005) 159-164.

4. AUTORES: E. J. Llorent-Martínez, J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: Solid-phase ultraviolet sensing system for determination of methylxanthines.

Analytical and Bioanalytical Chemistry 382 (2005) 158-163.

5. AUTORES: E. J. Llorent-Martínez, J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: Flow-through fluorescence-based optosensor with on-line solid-phase separation for the simultaneous determination of a ternary pesticide mixture.

Journal of AOAC International 88 (2005) 860-865.

6. AUTORES: J. F. García-Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: The potential of combining solid-phase optosensing and multicommutation principles for routine analyses of pharmaceuticals.

Talanta 68 (2006) 1482-1488.

7. AUTORES: E. J. Llorent-Martínez, J. F. García-Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz

TÍTULO: Development of a multicommutated fluorescence-based sensing system for the simultaneous determination of vitamins B<sub>2</sub> and B<sub>6</sub>.

Analytica Chimica Acta 555 (2006), 128-133.