UNIVERSIDAD DE JAÉN

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA, FÍSICA Y ANALÍTICA

TESIS DOCTORAL

OPTOSENSORES EN FLUJO CONTINUO. NUEVAS CONTRIBUCIONES Y ESTRATEGIAS

PRESENTADA POR:
ANA DOMÍNGUEZ VIDAL

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

JAÉN, 1 DE JULIO DE 2003

ISBN 84-8439-235-X

Nombre y apellidos del autor

Ana Domínguez Vidal

Título de la Tesis Doctoral

Optosensores en Flujo Continuo. Nuevas contribuciones y Estrategias

I.S.B.N.

84-8439-235-X

Fecha de Lectura

1 de Julio de 2003

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
	Dra. Dña. Pilar Ortega Barrales
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Miguel de la Guardia Cirugeda
Vocales	Dr. D. Víctor Cerdá Martín
	Dr. D. José Barbosa Torralbo
	Dr. D. José Luis Víchez Quero
Secretario/a	Dra. Dña. Maria Luisa Fernández de Córdoba

Calificación Obtenida

Sobresaliente Cum Laude por Unanimidad

Universidad de Jaén

tesis doctoral

Abstract

This Memory entitled "Opsensores en Flujo Continuo. Nuevas Contribuciones y Estrategias" has been developed in the Department of Physical and Analytical Chemistry of the University of Jaén under the investigation lines of the Analytical Chemistry area about Flow-through Spectroscopic Sensors.

It presents the development of six flow-through optosensors for the determination of organic compounds with incresing interest in pharmacological and environmental fields. According to the used type of detection they are possible to be divided in photometric and fluorimetric sensors.

FLUORIMETRIC SENSORS

Monoparameter sensors are those that allow the determination of only one analyte, here they have been developed two for the analysis of diuretics, amiloride and triamterene. Also it has been developed a multi-sensor for the simultaneous determination of a-naphthol, o-phenylphenol and thiabendazole in natural waters. The three sensors are based on the measurement of analyte intrinsic fluorescence so they do not need previous derivative reactions.

In all cases an wide study of the experimental variables that can affect to this type of systems has been made: chemical variables, retention-detection unit variables, as well as FIA variables. The values adopted in each case are optimized always looking for the maxima sensitivity and selectivity of the proposed system. For monoparameter sensors, it was made an interference study from those substances that accompany generally to the analytes in real samples to which it is tried to apply. The following step was to find a calibration equation that allowed to relate the values of the analytical signals to the concentration of the samples. In the case of the monoparameter sensors a univariate calibration was made, nevertheless for the multi-sensor one, the calibration was multivariant using the method of regression by partial least squares.

Finally, the proposed luminescent sensors were applied to diverse nature samples, drugs and sanguineous serum in the case of the monoparameter ones and natural waters fo the multi-sensor. The results confirm the validity of the proposed sensors.

SPECTROPHOTOMETRIC SENSORS

All of the sensors with photometric detection that have been developed are multi-sensor, which determine more of a analite simultaneously using an only injection of sample.

It is developed a biparameter sensor for the simultaneous determination of thiamine and piridoxine, and two triparameter ones for the determination of a) paracetamol, caffeine and propyphenazone, and b) acetaminophen, acetilsalicilyc acid and caffeine, respectively.

The primary target is the simultaneous determination of the analytes, reason why the initial study consisted of the search of a strategy, that had not been developed to date for spectroscopic flow-through sensors, that allowed the sequential arrival of the analytes to the detection zone. This was obtained by means of the use of a precolumn on line, packed with a suitable solid support that retained the analytes temporarily allowing a time difference in their arrival to the sensor zone. According to this, the study of the experimental variables was directed to the separation of the analytes and not solely to obtain higher possible sensitivity, than on the other hand it is not a priority factor when the real samples to which it is tried to apply the method are drugs. Once established the suitable working conditions for each sensor, they were calibrated, using mixture samples of the analytes. From this form the concentration intervals are obtained in which the law of Lambert Beer is fulfilled that relates the absorbance, analytical signal, with the concentration.

The studies of interferences were made to know the answer sensor in the presence of the organic and inorganic compounds that accompany generally to the analytes in drugs and, in their case, to eliminate the interferentes properly.

Finally, the proposed sensors were applied to the determination of the corresponding analytes in pharmaceuticals from the Spanish Pharmacopoea, obtaining satisfactory results that validate the described methods.

UNIVERSIDAD DE JAÉN

OPTOSENSORES EN FLUJO CONTINUO. NUEVAS CONTRIBUCIONES Y ESTRATEGIAS

ANA DOMÍNGUEZ VIDAL

tesis doctoral

A mis padres

A mis hermanas

La sabiduría es tener sueños lo bastante altos para no perderlos de vista mientras se persiguen

(W. Faulkner)

Alguna vez leí que quien siente gratitud y no la expresa es como quien envuelve un regalo y no lo da, por eso quiero aprovechar esta oportunidad para dar las GRACIAS.

Quisiera expresar mi más profunda admiración y gratitud a los Dres. Antonio Molina Díaz y Pilar Ortega Barrales por su continua dedicación y apoyo, siempre y aœn más en los momentos difíciles. Por creer en mi y darme la primera oportunidad de conocer la investigación y quererla.

También desde estas líneas quiero agradecer a muchos vuestra contribución para que este trabajo llegue a buen fin, algunos estuvisteis conmigo en los principios y a otros Dios os puso a mi lado a lo largo del camino. Gracias a los que me alentasteis a seguir, a los que me habéis enseñado mucho, a los que pasasteis horas buscando conmigo una solución, a los estuvisteis cuando necesitaba un abrazo, a quienes hemos compartido tantas horas dentro y fuera del laboratorio, a los que la química les gusta, pero de lejos, a los que no me habéis dejado sola, a los que me habéis empujado estos últimos meses, a todos GRACIAS.

Y a mi familia, siempre y por todo, GRACIAS

Indice

I.Resumen 6
II. Introducción y Justificación 9
III.Objetivos 19
IV. Antecedentes 21
1. Métodos automáticos de Análisis 22
2. Análisis por Inyección en flujo 24
3. Espectroscopía en Fase Sólida 33
4. Sensores Químicos 37
5. Analitos 42
V. Discusión conjunta de Resultados 58
1. Reactivos e Instrumentación 59
2. Estudios preliminares 61
3. Configuración del sistema FIA 66
4.Variables Experimentales 68
Variables de la unidad de retención detección 69
Variables químicas 72
Variables del sistema FIA 78
Variables Instrumentales 81
5. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos 83
Calibración Univariante 83
Calibración Multivariante 90
6. Estudio de los posibles interferentes 101
7. Aplicaciones Analíticas 108
VI. Conclusiones y Perspectivas 118
VII. Anexo 121

I. Resumen

Esta Memoria presenta el desarrollo de seis sensores espectroscópicos en flujo continuo para la determinación de compuestos orgánicos de interés en los campos farmacológico y medioambiental. Según el tipo de detección empleado se pueden dividir en fotométricos y fluorimétricos.

SENSORES FLUORIMÉTRICOS

Se han desarrollado dos sensores monoparámetro, es decir, que permiten la determinación de un analito, para el análisis de sendos diuréticos, amilorida y triamtereno.

Asimismo se ha desarrollado un multisensor para la determinación simultánea de

α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol en aguas naturales.

Los tres sensores se basan en la medida de fluorescencia intrínseca de los analitos por lo que no precisan reacciones derivadoras previas.

En todos los casos se ha realizado un amplio estudio de las variables experimentales que pueden afectar a este tipo de sistemas: variables de tipo químico, variables de la unidad de retención-detección, así como variables del sistema FIA. Se optimizan los valores adecuados en cada caso buscando siempre la máxima sensibilidad y selectividad del sistema propuesto.

Para los sensores monoparámetro se realizaron estudios sobre las interferencias que pueden producir aquellas sustancias que acompañan generalmente a los analitos en las muestras reales a las que se pretende aplicar.

El siguiente paso fue encontrar una ecuación de calibración que permitiese relacionar los valores de las señales analíticas con la concentración de las muestras. En el caso de los sensores monoparámetro se realizó una calibración univariante, sin embargo para el multisensor, la calibración fue multivariante empleando el método de regresión por mínimos cuadrados parciales.

Finalmente, los sensores luminiscentes propuestos se aplicaron a muestras de diversa naturaleza, fármacos y suero sanguíneo en el caso de los monoparámetro y aguas naturales en el caso del multisensor. Los resultados confirman la validez de los sensores propuestos.

SENSORES ESPECTROFOTOMÉTRICOS

Los tres sensores con detección espectrofotométrica que se han desarrollado son multisensores, determinan más de un analito simultáneamente empleando una única inyección de muestra.

Se desarrolla un sensor biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina, y dos triparámetro para la determinación de a) paracetamol, cafeína y propifenazona, y b) paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína, respectivamente.

El objetivo principal es la determinación simultánea de los analitos, por lo que el estudio inicial consistió en la búsqueda de una estrategia, que no había sido desarrollado hasta la fecha para sensores espectroscópicos en flujo, que permitiese la llegada secuencial de los analitos a la zona de detección. Esto se consiguió mediante el empleo de una precolumna on line, empaquetada con un soporte sólido adecuado que retenía temporalmente los analitos permitiendo un desfase temporal en su llegada a la zona de detección.

Según esto, el estudio de las variables experimentales estuvo encaminado a la separación de los analitos y no únicamente a conseguir la mayor sensibilidad posible, que por otra parte no es un factor primordial cuando las muestras reales a las que se pretende aplicar el método son fármacos.

Una vez establecidas las condiciones adecuadas de trabajo para cada sensor, se calibraron los sensores para los analitos correspondientes, empleando disoluciones de muestras mezcla de los analitos. De esta forma se obtienen los intervalos de concentración en los que se cumple la ley de Lambert Beer que relaciona la absorbancia, señal analítica, con la concentración.

Los estudios de interferencias se realizaron para conocer la respuesta del sensor en presencia de los compuestos orgánicos e inorgánicos que generalmente acompañan a los analitos en los fármacos y, en su caso, eliminar convenientemente los interferentes.

Finalmente, se aplicaron los sensores propuestos a la determinación de los analitos correspondientes en preparados farmacéuticos de la Farmacopea Española, obteniéndose resultados satisfactorios que avalan los métodos descritos.

II. Introdución y Justificación

Esta Memoria forma parte de la línea de investigación desarrollada por el Grupo de Investigación "Química Analítica de la Universidad de Jaén", del Plan Andaluz de Investigación (PAI), cuyo objetivo principal es la puesta a punto de nuevos métodos de análisis químico que permitan la determinación de compuestos químicos en muestras reales de diferente naturaleza.

En concreto esta Memoria pretende contribuir al desarrollo de los sensores espectroscópicos en flujo continuo no segmentado, basados en la integración de la retención de la especie de interés sobre un soporte sólido, con la detección espectroscópica de la misma, posibilitando la determinación de diversos analitos así como de mezclas de ellos.

En 1976 Yoshimura[1] 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 sorbida sobre la fase sólida. 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. Más tarde también se usó la espectrofluorimetría para la determinación directa de especies retenidas sobre el soporte sólido[2], ampliándose así las posibilidades de la SPS. Mediante SPS se han determinado un amplio conjunto de elementos y compuestos[3,4,5,6,7].

Posteriormente, la SPS se implementó con la detección on-line[8] dando lugar a la metodología SPS-FIA. De esta manera, las ventajas de la SPS (principalmente

[1] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi Talanta 23 (1976), 449.

[2] C.A. Heller, R.R. McBride, M.A. Ronning Anal. Chem. 49 (1977) 2251.

[3] F. Capitán, G. Sánchez-Palencia, A. Navalón, L.F. Capitán-Vallvey, J.L. Vílchez Anal. Chim. Acta 259 (1992) 345.

[4] A. Molina-Díaz, J.M. Herrador-Mariscal, M.I. Pascual-Reguera, L.F. Capitán-Vallvey Talanta 40 (1993) 1059.

[5] M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey Fresenius J. Anal. Chem. 349 (1994) 722.

[6] P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz Anal. Chem. 70 (1998) 271.

[7] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz J. Pharm. Biomed. Anal. 20 (1999) 247.

[8] K. Yoshimura, Anal. Chem. 59 (1987) 2922.

sensibilidad y selectividad), se sumaron a las ventajas intrínsecas del FIA (rapidez, comodidad, automatización, menor consumo de reactivos y de soporte sólido, etc.). En estos sistemas SPS-FIA, la separación y retención de la especie de interés sobre la fase sólida tiene lugar en la misma área de detección y simultáneamente con ésta. La medida directa de la especie de interés concentrada en la zona misma de detección sin necesidad de requerir una previa elución antes de la medida (que es lo que se hace clásicamente cuando se mide la señal en solución y que conlleva inevitablemente una dilución de la especie a medir) proporciona un notable incremento en la sensibilidad y un descenso en los límites de detección. A su vez, la separación de la especie de interés del resto de la matriz al ser retenida en el soporte activo contribuye a exaltar muy significativamente la selectividad, 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 extraordinariamente bajo con incremento sustancialmente extraordinario de los límites de detección comparados con la respectiva metodología FIA en ausencia de soporte sólido.

Por consiguiente, los procesos de separación / retención, concentración y detección ocurren en estos sistemas simultáneamente en el tiempo y en el espacio. Ocasionalmente, además, la reacción derivadora (cuando es necesaria) puede ocurrir también simultáneamente sobre el soporte sólido, por lo que estos sistemas en tales casos integran separación/retención, preconcentración, reacción y detección. Estos sistemas son compatibles con detectores espectroscópicos moleculares (no destructivos).

La microzona de la fase sólida donde se monitoriza continuamente la detección está integrada (no conectada) en el detector y a su través fluye un flujo continuo de portador. El bolo de muestra es insertado en esta corriente y la radiación interacciona directamente con la zona sensora integrada en el área de detección. Estos dispositivos, basados en la interacción de la radiación con la superficie sólida integrada en el detector se llaman optosensores en flujo[9] o sensores espectroscópicos en flujo.

Así estos dispositivos son puestos en contacto directo con la muestra proporcionando (idealmente) una respuesta rápida, reversible y continua[10] que es transducida vía un detector espectroscópico molecular no destructivo.

Las primeras aplicaciones de los sistemas SPS-FIA estaban dirigidas a analitos inorgánicos[11,12], así como las primeras aplicaciones en modo batch[13,14]. Después

[9] J. Ruzicka, E.H. Hansen Anal. Chim. Acta 173 (1985) 3.

[10] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro Analyst 118 (1993) 593.

[11]K. Yoshimura Analyst, 13 (1988) 471.

[12] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel Anal. Chim. Acta 234 (1990) 345.

[13] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi Talanta 23 (1976) 449.

[14] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi Talanta 25 (1978) 579.

fueron desarrollados sensores de este tipo para analitos orgánicos (mayoritariamente principios activos de fármacos). Los más sencillos son aquellos sensores basados en la medida de una propiedad intrínseca del analito (absorbancia, fluorescencia), que evitan la necesidad de reacciones derivadoras.

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 (principalmente sensibilidad y selectividad) comparadas con los respectivos métodos espectroscópicos convencionales.

La señal analítica medida en los sensores en flujo continuo está directamente relacionada con la concentración de analito en la muestra inyectada. En el caso de los sensores espectrofotométricos, la Absorbancia (en realidad, atenuación) medida sobre el soporte sólido, consta de varios componentes:

$$A = A_A + A_R + A_S \quad (1)$$

donde,

A_A = absorbancia del analito o su derivado retenido en el sólido

A_R = absorbancia del sólido (soporte sólido + reactivo, si lo hay)

A_S= absorbancia de la solución intersticial entre las partículas del sólido (puede ser despreciada frente a los otros términos).

El empaquetamiento de las partículas del sólido activo afecta a los valores de A_A y A_R. 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 $A_R + A_S \approx A_R$. Por tanto el pico obtenido al paso del analito A_A corresponde a la diferencia entre el valor experimental medido A y $A_R + A_S$. 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 batch, aunque cada medida se realiza con una misma cantidad de soporte sólido en la célula de medida, el empaquetamiento es diferente en cada caso lo que origina medidas 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 la resina absorbe luz).

La absorbancia neta del analito viene dada por

$$A_A = \varepsilon_R \, b_R \, C_R \quad (2)$$

siendo,

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

b_R = longitud media de paso óptico (cm)

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

Cuando se inyectan en el sistema un volumen determinado (V, l) de una muestra conteniendo una concentración C_0, mol l^{-1}, de analito, la concentración sobre la fase sólida (C_R, mol kg^{-1}) será: $C_R = C_0\ V / m_r$ (m_r = masa de sólido ,kg) suponiendo un valor alto del coeficiente de distribución (como suele ser lo habitual). Por tanto,

$$A_A = \varepsilon_R\, b_R\, V\, C_0 / m_r \qquad (3)$$

Por consiguiente, manteniendo V y m_r constantes, existe una relación lineal entre la señal analítica y la concentración inicial, C_0 del analito en la solución de muestra inyectada, siendo $\varepsilon_R\, b_R\, V\, m_r$ la pendiente de la recta de calibración.

De esta ecuación se desprende una importante característica de estos sensores en flujo: manteniendo C_0 constante, A_A crece conforme crece V. Por tanto, cabe esperar una relación lineal entre A_A 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 el volumen de ésta.

En sensores fluorimétricos también 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[15]:

$$I = 2.303\Phi_F \frac{1}{1+2sb_R} I_0 \varepsilon_R b_R C_R \qquad (4)$$

ϕ_F = rendimiento cuántico de fluorescencia
I_0 = intensidad del haz de excitación
s=coeficiente de dispersión
ε_R, b_R, C_R igual que antes

Por tanto,

$$I = 2.303\Phi_F \frac{1}{1+2sb_R} I_0 \varepsilon_R b_R \frac{VC_0}{m_r} \qquad (5)$$

es decir, 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 fotométricos.

El soporte sólido requerido para los sensores en flujo debe reunir ciertos requisitos:

[15] Z. Zweidinger, J.D. Winefordner, Anal. Chem. 42 (1976) 639.

- Tamaño de partículas adecuado que evite sobrepresiones en el sistema.
- Resistente al flujo continuo y que garantice reproducibilidad en la respuesta del sensor.
- Químicamente inerte a los componentes de las soluciones del flujo.
- 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).

Además, la cantidad a usar, m_r, debe ser la mínima posible que permita la geometría de la célula y el diseño del haz de luz del detector, pues la señal, de acuerdo con las ecuaciones (3) y (5), es inversamente proporcional a la cantidad de soporte sólido empleado.

Por ello, 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.

Por su parte, la célula ideal para un sensor en flujo debe reunir dos requisitos:

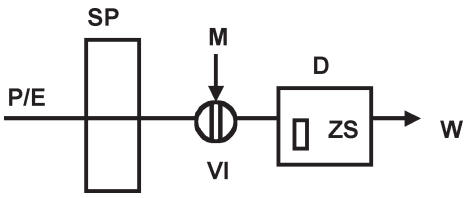
- Conseguir la concentración del producto de interés sobre el soporte en un área de la célula tan pequeña como sea posible.
- El haz de radiación debe incidir sobre esta área sin perder luz en las proximidades de la zona citada.

Tras la medida, la zona sensora tiene que ser regenerada para quedar lista para la siguiente determinación haciendo que el sensor sea reutilizable. La implementación de este paso de regeneración es un requerimiento clave e importante.

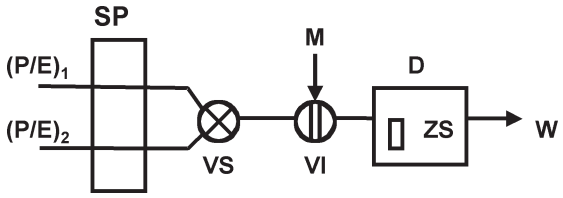
Para ello se emplea una disolución adicional de eluyente, que se hace llegar a la zona sensora mediante inyección de un volumen definido en el sistema, o usando una válvula de selección. Esta disolución se utiliza cuando el portador no puede eluir por sí mismo la especie que se mide, el analito o su producto de reacción, de la zona sensora, y permite mayor sensibilidad, porque la preconcentración es más efectiva pero ofrece menor frecuencia de muestreo y suele acortar la vida del sensor si el soporte es una resina intercambiadora.

Las configuraciones FIA empleadas en los sensores espectroscópicos en flujo continuo se muestran a continuación.

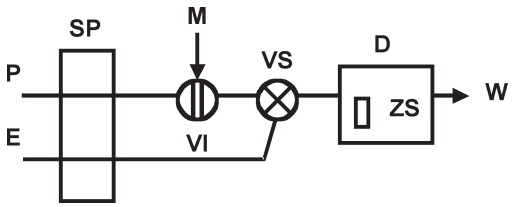
— La más sencilla es una configuración monocanal en la que la solución portadora (P/E) actúa también como solución eluyente. El analito es eluido en cuanto la cola del bolo alcanza el sensor (ZS), por lo que se origina una señal transitoria.



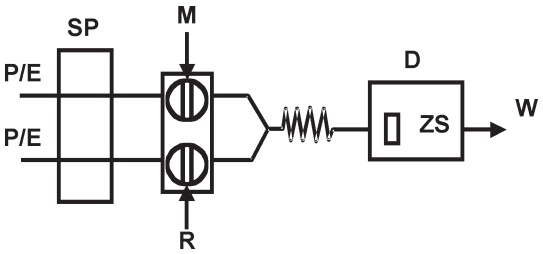
— Usando dos soluciones portador/eluyente adecuadas y una válvula de selección previa a la inyección, se pueden determinar dos analitos secuencialmente, originando cada uno una señal transitoria en la misma y única zona sensora.



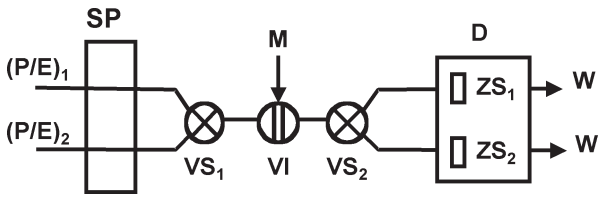
— Si la especie es retenida tan fuertemente que el portador no puede eluirla, tiene que usarse una solución eluyente adicional. Entonces hay que usar una válvula adicional de inyección o de selección (colocada lo más cerca posible de la zona sensora). Esta configuración acorta la vida del sensor si la zona sensora es una resina intercambiadora.



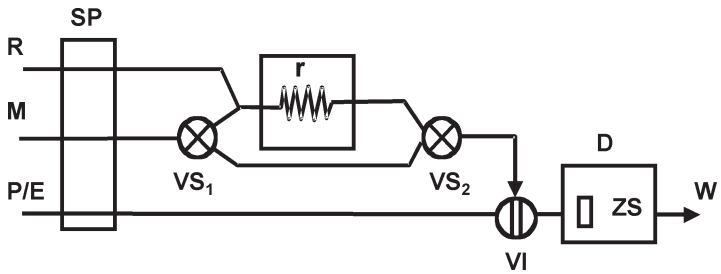
— Inyección doble sincronizada de muestra y reactivos. Esta configuración se usa cuando se requiere una derivación previa, por lo que también se usa un reactor para completar la reacción antes de que el bolo alcance la microzona sensora.



— El uso combinado de dos zonas sensoras (ZS_1 y ZS_2) y un espectrofotómetro de doble haz permite la determinación secuencial de los analitos usando dos soluciones de portador / eluyente y dos válvulas de selección.



— El siguiente manifold se ha usado para la determinación directa de un analito e indirecta de otro, que puede transformarse previamente en el primero. En la determinación directa, la muestra pasa a través de VS_1 y VS_2 hasta la válvula de inyección (VI), con la cual se inserta en la corriente de portador. En la determinación indirecta, la muestra confluye con el reactivo y sufre la transformación oportuna (hidrólisis) en el reactor (r) sumergido en un baño termostatizado y después se inyecta con VI.



La espectroscopía molecular es una técnica no destructiva perfectamente compatible con los sensores ópticos en flujo. La espectrofotometría UV-visible, 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. Por ello, también es la técnica de detección más empleada en los optosensores en flujo. No obstante, la región UV adolece de escasa selectividad para poder usarse en análisis espectrofotométrico convencional pues los componentes que acompañan a los analitos generalmente absorben radiación haciendo imposible su determinación. Sin embargo, el soporte sólido activo actúa en la zona de detección exaltando fuertemente la selectividad tal como se ha señalado anteriormente, excluyendo del área de detección las especies no retenidas en las condiciones de trabajo, potenciando la utilización de la región UV con satisfactorios resultados en un buen número de sensores para análisis orgánico[16]. Así, puede obviarse la necesidad de reactivos derivadores, simplificándose la combinación del sensor y disminuyéndose los costos por análisis. De hecho, la mayor parte de los sensores espectroscópicos en flujo continuo desarrollados por el "Grupo de Química Analítica de la Universidad de Jaén" utilizan detección fotométrica en la región UV.

[16] A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, J. Pharm. Biomed. Anal., 28 (2002) 399.

La fluorescencia molecular sigue en importancia a la espectrofotometría como técnica de detección para sensores en flujo en cuanto al número de sensores desarrollados. Frente a la primera, tiene el inconveniente de que el número de analitos que pueden detectarse basándose en su fluorescencia nativa es mucho más reducido, pero, en cambio, ofrece alta sensibilidad, buena selectividad y excelentes límites de detección. La incorporación del soporte sensor a la zona de detección, contribuye también a incrementar sensibilidad y selectividad por las mismas razones anteriormente apuntadas.

Los sensores espectroscópicos basados en fenómenos de fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) son aún más escasos[17,18,19]. Dadas las exigencias intrínsecas de esta técnica de detección. También debe mencionarse la escasez, aún mayor de sensores quimioluminiscentes.

Por último, debemos mencionar la existencia de sensores en flujo que emplean la espectroscopía vibracional[20,21] como técnica de detección, si bien han sido menos explotados.

El creciente número de trabajos publicados en las últimas décadas sobre desarrollo y aplicaciones de sensores químicos y bioquímicos en flujo es un claro índice de la vitalidad desplegada por los investigadores en esta área. De los diferentes tipos de sensores en flujo que se encuentran descritos[22], los optosensores en flujo son objeto de investigación del grupo de investigación "Química Analítica de la Universidad de Jaén", del departamento de Química Física y Analítica de dicha Universidad. Esta Tesis Doctoral se enmarca dentro de la línea de investigación de dicho Grupo, sobre sensores espectroscópicos en flujo continuo. Hasta la fecha en que se inició la parte experimental de esta Tesis Doctoral se habían desarrollado por el Grupo, principalmente sensores monoparámetro[23,24,25,26], es decir, aquellos que responden solo a un analito en cada inyección, o bien, a varios analitos de una misma familia[27], pero siempre individualmente, uno en cada inyección. A su vez, la transducción era casi exclusivamente fotométrica (UV).

---

[17] R.M. Cuenca Trujillo, M.J. Ayora Cañada, A. Molina Diaz, J. AOAC Int., 85 (2002) 1268

[18] F. Alava Moreno, M.J. Valencia González, A. Sanz Medel, M.E. Diaz Garcia, Analyst, 122 (1997) 573.

[19] B. S. Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, Anal. Chim. Acta, 395 (1999) 1.

[20] P. Ortega, M.J. Ayora, A. Molina, S. Garrigues, M. de la Guardia, Analyst, 124 (1999) 579.

[21] A. Edelmann, B. Lendl, J. Am. Chem. Soc. 124 (2002) 14741.

[22] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Flow-Through (Bio)chemical sensors, Elsevier (1994)

[23] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz Anal. Chim. Acta 376 (1998) 227.

[24] A. Molina Díaz, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova Fresenius J. Anal. Chem. 363 (1999) 92.

[25] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, A. Molina-Díaz Anal. Sci. 15 (1999) 985.

[26] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 59.

[27] A. Ruiz Medina, M.G. García Marín, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz Microchem. J. 65 (2000) 325.

Tan sólo tres sensores biparámetro habían sido desarrollados, todos ellos operando en modo secuencial, es decir, la determinación se lleva a cabo mediante dos inyecciones y la respuesta del sensor corresponde: a) a sólo un analito cada vez[28]; o b) primeramente a un solo analito y luego a la suma de los dos[29,30]. Sin embargo, sensores biparámetro simultáneos no habían sido desarrollados, es decir, aquellos en que solo se precisa una inyección de muestra para determinar los dos analitos.

Dos sensores triparámetro habían sido desarrollados[31,32] para determinación simultánea de tres principios activos de fármacos en cada caso. La detección era fotométrica (UV) y se aplicaba un tratamiento quimiométrico mediante regresión por PLS a los espectros UV adquiridos mediante un espectrofotómetro de diodo array, mientras que los analitos avanzan a través de la zona sensora con un comportamiento diferencial respecto a su cinética de retención-elución en dicha zona.

[28] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz Anal.Chim. Acta 404 (2000) 131.

[29] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz Anal. Chim. Acta 394 (1999), 149.

[30] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Fresenius J. Anal. Chem. 365 (1999) 619.

[31] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, L.F. Capitán-Vallvey, Talanta 49 (1999) 691.

[32] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 983.

III. Objetivos

Con los trabajos desarrollados en esta Memoria, se pretende aportar nuevas contribuciones al campo de los sensores espectroscópicos multiparámetro en flujo continuo con detección espectrofotométrica UV: por primera vez se desarrollan sensores espectrofotométricos biparámetro y triparámetro con determinación simultánea (una única inyección).

Se basan en una sencilla estrategia, la separación on-line de uno (sensores biparámetro) o dos (triparámetro) componentes, mientras que el otro pasa hacia el detector donde origina una señal transitoria porque el portador que lo conduce a la microzona sensora es capaz de actuar, a su vez, de eluyente. Después el(los) restante(s) analito(s) retenido(s) on line en la minicolumna, son sucesivamente eluídos de ésta con sendos y apropiados eluyentes que los transportan a la microzona sensora y desarrollan sucesivamente una señal transitoria pues a su vez, también los eluyen de la misma.

Son los sensores multiparámetro descritos por primera vez para determinaciones simultáneas.

Por otro lado, se hacen tres aportaciones al campo de los sensores con detección fluorimétrica:

En primer lugar se desarrollan dos sensores monoparámetro para la determinación de sendos diuréticos en fármacos y suero sanguíneo. Como se ha comentado en la introducción debe destacarse que son escasos los sensores monoparámetro fluorimétricos descritos.

En segundo lugar, se desarrolla un sensor fluorimétrico triparámetro para la determinación simultánea de tres pesticidas en aguas. Se usa una regresión por mínimos cuadrados parciales a partir de los espectros derivados de primer orden, que a su vez se obtienen de los espectros de orden cero, adquiridos conforme los analitos avanzan simultáneamente por la microzona sensora. Es el primer sensor fluorimétrico triparámetro que existe.

La presente Memoria constituye así, una respuesta al reto lanzado a la comunidad científica hace unos años[1] respecto a la necesidad de desarrollar sensores en flujo que puedan aplicarse al análisis de muestras reales en los campos Farmacológico y Medioambiental.

[1] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Analyst, 118 (1993) 593.

IV. Antecedentes

1. MÉTODOS AUTOMÁTICOS DE ANÁLISIS

Uno de los principales progresos de la Química Analítica durante los últimos tiempos ha sido la aparición de sistemas analíticos automáticos que proporcionan datos analíticos con una mínima intervención del operador.

En un principio, estos sistemas se diseñaron para satisfacer las necesidades de los laboratorios clínicos en los que se determinan, de manera rutinaria, del orden de treinta o más especies diferentes con fines de diagnóstico y prevención. Cada año se realizan centenares de millones de análisis clínicos, de ahí la necesidad de mantener su coste a un nivel razonable. Estas dos consideraciones motivaron el desarrollo de los primeros sistemas analíticos automáticos.

Hoy en día, dichos instrumentos se aplican en áreas tan diferentes como el control de procesos industriales y la determinación rutinaria de un amplio espectro de especies en el campo del medio ambiente (aire, aguas y suelos), la industria farmacéutica y agrícola.

Dentro del contexto apropiado, los métodos automáticos presentan ventajas económicas importantes debido a sus menores costes laborales. Una segunda ventaja importante es su rapidez, que es significativamente más alta que la de los dispositivos manuales. La tercera ventaja de la automatización consiste en que un analizador bien diseñado puede producir, por lo general, resultados más reproducibles durante largos períodos de tiempo, de lo que lo haría un operador empleando un procedimiento manual.

Los sistemas automáticos y automatizados se diferencian en la intervención del operador que tenga lugar, así los **sistemas automáticos** son aquellos que realizan unas acciones previamente programadas (por el operador) para ser llevadas a cabo en unos momentos determinados del proceso sin intervención humana, En este caso el sistema no toma ninguna decisión por si mismo, sigue siempre la misma secuencia programada de operación y no tiene incorporado ningún sistema de retro-alimentación (feed-back). Los **sistemas automatizados** realizan la acción de automatizar, son sistemas que llevan incorporado un elemento de "feed-back" que toma decisiones en determinados momentos de la operación sin la intervención humana, son sistemas autocontrolados y su secuencia operacional puede variar según la situación.

1.1. Tipos de sistemas analíticos automáticos

Los sistemas analíticos automáticos son de dos tipos generales, *discontinuos* y *continuos*, encontrándose en ocasiones, una combinación de ambos:

• ***Discontinuos***, en los que la muestra es colocada y mantenida de forma separada en el interior de un recipiente individual en el que permanece durante al menos la mayor parte del procedimiento analítico, que comprende diferentes etapas de dilución, adición de reactivo(s), calentamiento, etc, en puntos predeterminados del ciclo analítico. Por último, una vez alcanzado el equilibrio químico (o estado estacionario), cada muestra alcanza la célula de medida de un detector apropiado.

• ***Continuos***, el sistema permanece estacionario mientras que es la solución de la muestra la que se mueve a través del mismo. Para ello, las muestras son introducidas de manera sucesiva y a intervalos regulares desde sus recipientes individuales al interior de una conducción (tubo) a través de la cual se mueven hasta que el análisis se ha completado. De este modo, las muestras forman parte de una corriente que se mueve continuamente, en la que se añaden reactivos en puntos predeterminados a velocidades de flujo fijadas. La corriente procesada fluye finalmente a través de la célula de un detector apropiado en donde se realizan las medidas y se registra la señal transitoria continuamente.

En la tabla[1] se muestra la clasificación de los métodos continuos automáticos basados en el modo en que se elimina la posible interferencia mutua entre las muestras sucesivas.

Tabla. Métodos automáticos continuos

Flujo	Introducción de muestra		Naturaleza del flujo	Denominación
	Procedimiento	Tiempo		
Segmentado	Aspiración	Secuencial	Continuo	Análisis en flujo segmentado (SFA)
No segmentado	Inyección	Secuencial	Continuo	Análisis por inyección en flujo (FIA)
		Secuencial	Discontinuo	Métodos cinéticos a flujo detenido
	Aspiración	Continua	Continuo	Análisis en flujo completamente continuo (CCFA)
		Secuencial	Continuo	
		Secuencial	Discontinuo	Análisis en flujo con dispersión controlada (CDFA)

[1] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, Automatic Methods of Analysis, Elsevier, 1998

Existen, pues, dos grupos generales, sistemas de ***flujo segmentado*** que se caracterizan porque las muestras son transportadas a través del sistema hacia el detector por medio de un flujo acuoso, que contiene burbujas de aire muy próximas entre sí. El objetivo de las burbujas de aire es evitar la dispersión excesiva de la muestra, promover la mezcla de muestras y reactivos, y limpiar las paredes del tubo, impidiendo así la contaminación mutua entre muestras sucesivas.

Los sistemas de ***flujo no segmentado*** se caracterizan por la ausencia de las burbujas de aire en el flujo y por su gran simplicidad técnica. En ellos la muestra se introduce secuencialmente por inyección o inserción en una corriente ininterrumpida de portador.

A estos sistemas hay que añadir el Análisis por Inyección Secuencial[2] (SIA) que durante los últimos años ha adquirido un gran impulso. EL SIA se basa en la aspiración secuencial de muestra y reactivo en un reactor (holding coil) mediante una válvula múltiple de selección. Posteriormente se cambia el sentido del flujo impulsando la mezcla hacia el detector.

Esta Memoria se desarrolla sobre las bases del Análisis en Flujo Continuo con inyección de la muestra por lo que dedicaremos a él un apartado más extenso.

2. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

Los métodos de inyección en flujo en su estado actual, fueron descritos por primera vez a mediados de la década de los setenta por Ruzicka y Hansen[3] en Dinamarca y Stewart y colaboradores[4] en Estados Unidos. El término inglés de *Flow Injection Analysis* (del que proviene el acrónimo FIA, que se empleará en adelante) se mantiene por razones históricas, puesto que Ruzicka y Hansen[5] empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo; actualmente se realiza por inserción, generalmente, con válvulas rotatorias y también con inyector proporcional.

El análisis por inyección en flujo supone una importante innovación metodológica en Química Analítica caracterizándose por un fundamento simple, material de laboratorio económico, un manejo sencillo y cómodo, y una gran capacidad para obtener unos resultados sorprendentes por su rapidez, exactitud y precisión. El FIA tiene una versatilidad que la distingue de la mayor parte de las nuevas técnicas analíticas, ya que puede adaptarse a todo tipo de necesidades sin cambios técnicos complejos, y es posible la intervención directa del operador en su funcionamiento, optimizando el propio sistema técnico y controlando las variables químicas.

---

[2] J. Ruzicka, G. D. Marshall, Anal. Chim. Acta, 237 (1990) 329.

[3] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Anal. Chim. Acta, 78 (1975) 145.

[4] K. K. Stewart, G. R. Beecher, P.E. Hare, Anal. Biochem, 70 (1970) 167.

[5] J. Ruzicka, E.H. Hansen, Flow Injection Analysis, J. Wiley, New York, 1981.

2.1. Características esenciales del FIA

Los rasgos esenciales del análisis por inyección en flujo son:

- El flujo no está segmentado por burbujas de aire, ésta es la esencial diferencia entre esta metodología y el análisis en flujo segmentado, SFA.
- La muestra, concretamente un volumen bien definido de solución de la misma, es inyectada o insertada directamente en el flujo en lugar de ser aspirada en el mismo.
- La muestra inyectada se transporta a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dispersión o dilución que experimenta la muestra en su transporte a lo largo del sistema, desde el punto de inyección hasta el punto de detección, puede ser fácilmente controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema. Aunque la mezcla de muestra y reactivos sea incompleta, es sin embargo reproducible, originando un gradiente de concentración que varía a lo largo del sistema como una función del tiempo.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que se registra convenientemente.
- En el momento en que se registra la señal no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogeneización de una porción del flujo) ni el equilibrio químico (reacción química completa). Por ello las técnicas FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.
- El tiempo de operación debe de ser altamente reproducible pues las medidas se realizan en condiciones de no-equilibrio y por tanto pequeñas variaciones del mismo pueden producir graves alteraciones de los resultados.

2.2. Características de los métodos FIA

Como se ha indicado anteriormente, la metodología FIA, muestra una serie de características destacables desde el punto de vista de los resultados. Éstas son, sensibilidad, selectividad, precisión, sencillez, rapidez, economía y versatilidad.

Sensibilidad: En general los métodos FIA son algo menos sensibles que las técnicas manuales por dos razones: a) cuando se hace uso de reacciones derivadoras, al ser el tiempo de reacción corto, se consiguen rendimientos parciales de reacción; b) al existir una dispersión física o dilución de la muestra en el portador, no se alcanza la máxima señal posible (bolo sin diluir).

Debido a las numerosas posibilidades que ofrece esta técnica son diversas las modificaciones que pueden hacerse en los montajes FIA para paliar esta característica negativa:

- 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.
- 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 reaccionante se encuentra en el reactor, permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.
- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración del analito a partir del bolo de muestra. Inicialmente esta opción se llevó a cabo colocando el soporte sólido on line antes del sistema de detección[4]. Después, la retención de la especie se realizó en la misma zona de detección (integración de retención y detección) originando los llamados sensores en flujo continuo. Finalmente, la combinación de las dos opciones también ha sido desarrollada. Los primeros sistemas de estas características que combinan el empleo de a) una retención/separación on-line mediante una precolumna con b) la retención/detección mediante el uso de un soporte sólido en la célula de medida, constituyen una de las contribuciones de esta Tesis Doctoral al campo de los métodos automáticos, concretamente en el área de los sensores en flujo continuo.

Selectividad: La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera semiautomática o 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 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).

Además, esta característica se ve aún más exaltada en los métodos desarrollados en esta Memoria por el uso de un soporte sólido que nos permita la fijación selectiva sólo del analito en estudio, excluyendo del sistema de detección a todas aquellas especies que en las condiciones de trabajo no pueden retenerse en el soporte sensor.

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 originar fluctuaciones en la señal FIA (modo de inyección, fluctuaciones de la temperatura, cambios en la concentración de reactivo o portador, falta de sincronización entre el detector y registrador, 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 incomparablemente superior respecto a las técnicas

manuales. La existencia 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, limitando el ancho de los picos.

Es indudable que factores como volumen de muestra, volumen interno del reactor y caudal son decisivos al establecer la velocidad de muestreo. Deben de 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 sólo es tarea sencilla el uso de un montaje FIA para análisis rutinarios, 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 un analito 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 que hoy en día tiene la sociedad y cuya resolución compete a la Química Analítica. 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.

2.3. Componentes básicos de un sistema FIA

Según el artículo de Ruzicka[2], existen una serie de condiciones ideales que debe cumplir un analizador de inyección en flujo, estas condiciones se cumplen, haciendo que un sistema FIA elemental esté constituido por una serie de elementos de características bien definidas. La siguiente figura muestra las unidades que componen este sistema FIA elemental y a continuación se comentan las principales características de cada una de ellas.

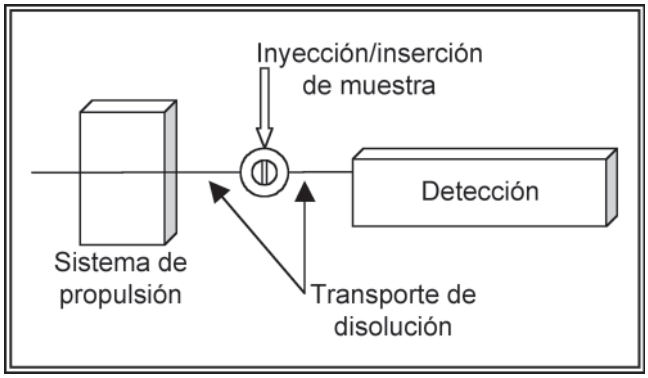


Figura IV.1. Esquema de los componentes de un sistema FIA elemental

- **Sistema de propulsión** de la corriente portadora a través de las unidades del sistema. Una característica del FIA es la baja presión necesaria para obtener los caudales adecuados que generalmente oscilan entre 0.5-4 ml min^{-1}. El sistema propulsor debe cumplir una serie de requisitos derivados de la propia técnica FIA.
  - Debe proporcionar un caudal constante y perfectamente reproducible, para que el tiempo de residencia y la dispersión, directamente relacionados con el caudal, se mantengan inalterables a lo largo del estudio.
  - Debe dar lugar a un flujo libre de impulsos, en el caso de que existan impulsos deben ser de la mínima magnitud posible.

  Las unidades propulsoras que se pueden utilizar son de varios tipos, bombas, sistemas de presión, gravedad... siendo el sistema más utilizado la bomba peristáltica.
- **Sistema de inyección o inserción** de la muestra en la corriente portadora. El sistema de inyección debe reunir los siguientes requerimientos:
  - Debe insertar un volumen de muestra exactamente medido y de forma reproducible. El sistema debe permitir poder insertar volúmenes variables, ya que esto hará el sistema más versátil.
  - La muestra debe ser incorporada a la corriente de portador de forma que este último no sea perturbado.
  - Su manejo debe ser fácil, cómodo y rápido, de modo que se consiga una frecuencia de muestreo alta. Es también deseable que pueda controlarse mediante un motor eléctrico, ya que esto dará la posibilidad de automatizar la técnica.

  Aunque la primera unidad de inyección empleada fue una simple jeringa y una aguja hipodérmica, en la actualidad los sistemas de inyección más empleados son la válvula rotatoria y el inyector proporcional.
- **Sistemas de transporte y reacción**, cuyos objetivos, son, a parte del lógico de transportar la corriente de fluido a lo largo del sistema, conectar entre sí los diferentes elementos.

Son tubos de pequeño diámetro, 0.1-2 mm, de un material que ha de ser químicamente inerte, así como termoestable, los materiales más empleados son teflón, polietileno y polipropileno.

- **Sistema de detección** que permita la medida continua de una propiedad de la muestra proporcionando información cuantitativa y cualitativa.

  Cabe distinguir entre la medida directa de una propiedad de la especie disuelta en la muestra inyectada, o la necesidad de una reacción adicional que origine 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. La elección de una u otra técnica depende del problema a resolver, del volumen de muestra y de su concentración. En este último aspecto, si la muestra es concentrada, la inyección de muestra da resultados más satisfactorios que la inyección de reactivo, mientras que con muestras diluidas es preferible la situación inversa.

  Para ser adecuado como sistema de medida en la técnica de inyección en flujo, un detector 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 más usados en FIA abarcan los más variados tipos existentes dentro de los métodos analíticos: ópticos y electroquímicos. A continuación se hace un repaso de ellos y de sus principales características para finalmente fijarnos en los sistemas de detección que se emplean en los trabajos que se desarrollan en esta Memoria.

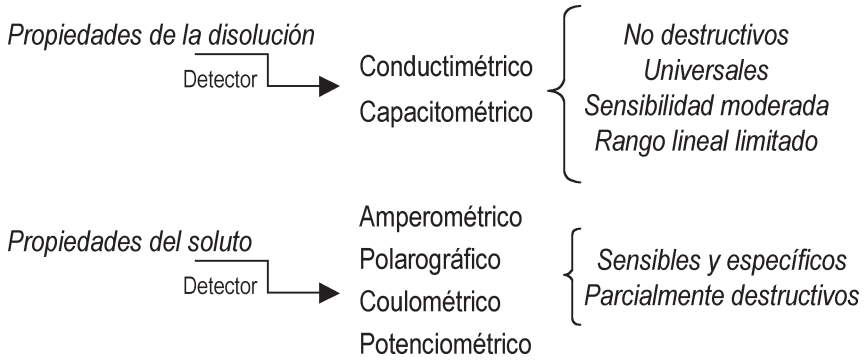
  - Detectores Electroquímicos

    Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos por su sensibilidad, selectividad y amplio rango de respuesta lineal. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en volumen, los hace muy atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. El principal inconveniente que plantean este tipo de detectores, lo constituye el material del electrodo.

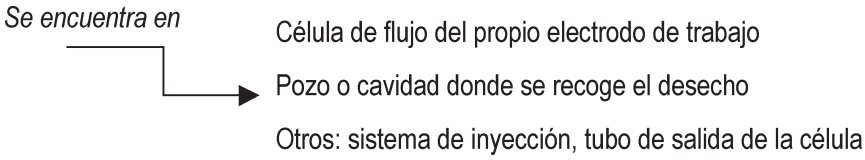
    El envenenamiento de la superficie en el caso de electrodos sólidos debido a la adsorción, se manifiesta en una pérdida de estabilidad a causa de la pasivación y consecuente disminución de la señal.

    Los detectores electroquímicos pueden clasificarse atendiendo a varios criterios, según cuál sea la base de la medida, la situación del electrodo de referencia o la célula de flujo:

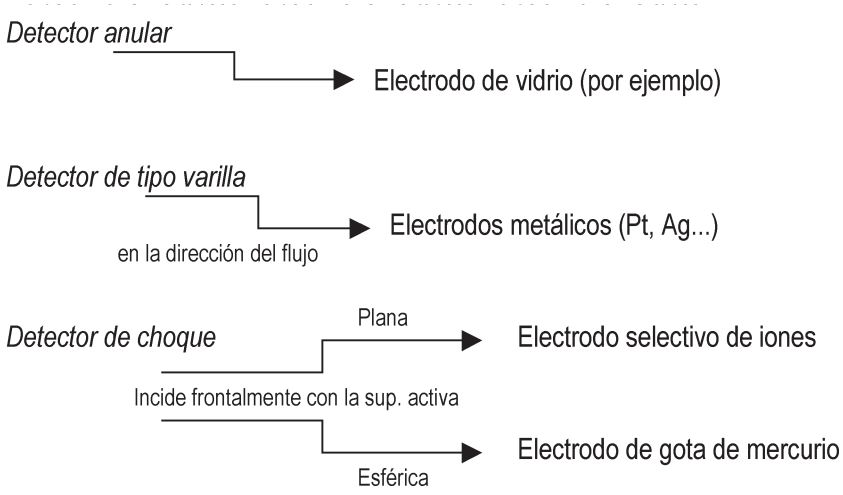
- Según la base de la medida



- Según la posición del electrodo de referencia



- Según la forma de la superficie activa



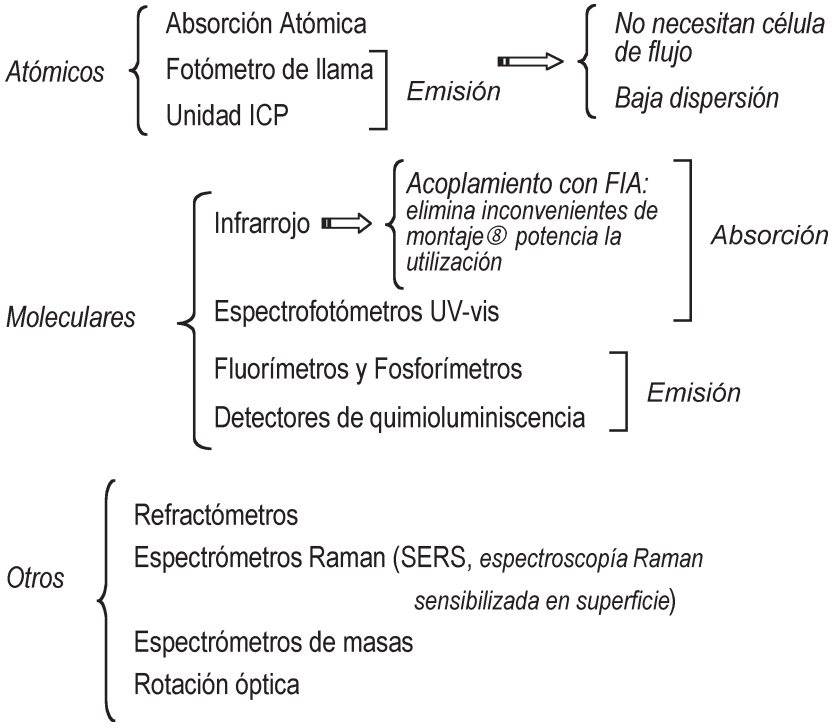
- *Detectores Ópticos*

Los detectores ópticos son, con mucha diferencia, los sistemas de detección mas empleados en FIA, particularmente aquellos que se basan en la absorción molecular, los cuales suponen las dos terceras partes de las aplicaciones de FIA, seguidos por los detectores de fluorescencia molecular.

La principal razón para esta abundancia de métodos en los que se utilizan detectores de tipo óptico es, sin duda, el elevado número de especies que pueden seguirse por técnicas de este tipo, bien por sus propiedades intrínsecas o bien porque el producto de su reacción con una sustancia

adecuada sea apto para este tipo de medidas. A continuación se muestra una clasificación de los detectores ópticos que se emplean en mayor o menor medida en FIA.

Las técnicas de detección empleadas en los trabajos desarrollados en esta Memoria son la espectrofotometría de absorción UV-vis y la fluorimetría



Espectrofotometría de absorción UV-vis

Como en otros campos de la Química Analítica, los espectrofotómetros de absorción molecular, son los detectores más empleados en FIA. Este sistema de detección ha sido muy importante en FIA debido a la existencia de gran cantidad de reacciones selectivas coloreadas[6,7,8] utilizables para todo tipo de compuestos y elementos y también a la gran cantidad de compuestos que presentan bandas representativas en la zona del espectro ultravioleta[9]. En cambio, el empleo de la región UV ha sido muy escaso dada la baja selectividad que ofrece. En el Departamento de Química

[6] K. Grudpan, J. Jakmunee, Y. Vaneesorn, S. Watanesk, Talanta 46 (6) (1998) 1245.

[7] A.V. Pereira, O. Fatibello-Filho, Anal. Chim. Acta 366 (1998) 55.

[8] A. Molina-Díaz, I. Ortega-Carmona, M. I. Pascual-Reguera, Talanta 47 (1998) 531.

[9] C. Sánchez-Pedreño, M. S. Garcia, M. I. Albero, J. Rodriguez, J. Pharm. Biomed. Anal., 11 (1993) 933.

Física y Analítica de esta Universidad, el grupo de Investigación "Química Analítica de la Universidad de Jaén" (reconocido por el Plan Andaluz de Investigación con la referencia FQM 323) viene desarrollando durante los últimos años métodos FIA con detección UV sin necesidad de reacciones derivadoras, merced a la considerable mejora introducida en la selectividad por el empleo de un soporte sólido activo colocado en la zona irradiada. Varios de los métodos expuestos en esta Memoria suponen contribuciones en este campo.

A pesar de la enorme aplicación de este sistema de detección en FIA, el diseño de las células de medida no ha tenido un desarrollo paralelo, puesto que las células de flujo comerciales ya existentes se utilizan con buenos resultados para este fin. Estas células son de dos tipos principalmente, pero el material dependerá, en todo caso, de la zona del espectro donde se precise medir (cuarzo o vidrio óptico especial):

- Tipo en U, en la que el flujo entra y sale por la parte superior.
- Tipo en Z, donde el flujo entra por la cara inferior, saliendo por la superior. Es un modelo bastante menos utilizado, ya que es más difícil de adaptar a los espectrofotómetros usuales.

Espectrofluorimetría

Las ventajas de la medida de la fluorescencia son la razón por la que esta técnica ha sido ampliamente utilizada[10,11]. Estas ventajas son selectividad, bajo límite de detección, capacidad para la miniaturización y costo relativamente bajo. El principal inconveniente reside en que el efecto fluorescente lo manifiestan un número muy limitado de compuestos, sin embargo el campo de aplicación puede ampliarse en cierta medida mediante el uso de reacciones químicas sencillas[12]. El empleo de un soporte sólido activo en la zona de detección es aquí también una estrategia para exaltar la selectividad (además de la sensibilidad) y prescindir de reacciones derivadoras. Esta es otra línea del citado Grupo de Investigación.

En cuanto a las células de flujo empleadas en fluorimetría, son similares en material (en este caso sólo pueden ser de cuarzo) y forma, a las utilizadas en espectrofotometría, aunque en este caso, debido a las características intrínsecas de la técnica presentan tres ventanas en tres caras de la célula, mientras que la cuarta cara es completamente opaca.

W. Baumann[13], en 1982, consiguió poner a punto el láser como fuente de excitación aplicada al FIA, haciendo posible la determinación de niveles de concentraciones realmente bajos, así como de pequeños volúmenes. Así, la incorporación del láser

[10] P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou, Anal. Chim. Acta 438 (2001) 131.

[11] A. Ensafi, B. Rezaei, Microchem. J. 60 (1998) 75.

[12] J. A. Murillo Pulgarín, L. F. García Bermejo, Anal. Chim. Acta 333 (1996) 59.

[13] W. Baumann, Z. Anal. Chem., 310 (1982) 239.

a la detección fluorimétrica en sistemas FIA supone una mejora significativa en los métodos determinativos puestos a punto empleando esta fuente de excitación, por ejemplo permite la determinación[14] de concentraciones de peróxido de hidrógeno del orden de 10^{-10}M mediante inyecciones de volúmenes de 25ml.

3. ESPECTROSCOPÍA EN FASE SÓLIDA

La Espectroscopía en Fase Sólida (SPS) surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los "resin spot tests". A pesar de los numerosos trabajos sobre "resin spot tests" publicados desde que en 1954 Fujimoto[15] propusiera la referida técnica de microanálisis cualitativo, en ninguno de ellos se hizo un intento de cuantificación del analito.

Tuvieron que pasar más de dos décadas hasta que en 1976 Kazuhisa Yoshimura[16] diera a conocer los primeros métodos de determinación cuantitativa basados en la medida directa de la absorbancia de la especie coloreada sorbida en fase resina, que él llamó *Colorimetría de Cambio Iónico* y que más ampliamente debemos denominar *Espectrofotometría en Fase Sólida*.

La espectrofotometría en fase sólida es una metodología relativamente nueva y los métodos basados en ella ofrecen una alta sensibilidad y selectividad[17,18], 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 derivación, 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 espectrofotometría en fase sólida respecto al método 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 ng ml^{-1}. Se ofrece así la posibilidad de determinación de elementos traza por espectrofotometría sin que sea obligado el empleo de una preconcentración del analito, en el sentido que se requiere en la espectrofotometría convencional. Otras ventajas 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.

---

[14] T. A. Kelly, G.D. Christian, Anal. Chem, 53 (1981) 2110.

[15] M. Fujimoto. Bull. Chem. Soc., 27 (1954) 48.

[16] K. Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi, Talanta, 23 (1976) 499.

[17] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Anal. Chem., 70 (1998) 271.

[18] M.L.Fernández de Córdova, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz, Fresenius J. Anal. Chem., 357 (1997) 44.

Las primeras aplicaciones analíticas de la espectrofotometría en fase sólida estuvieron encaminadas a la determinación de iones metálicos en agua mediante resinas de cambio iónico con matrices de naturaleza aromática como soporte sólido[15], desde entonces se han ido desarrollando métodos para el análisis de analitos de carácter tanto inorgánico como orgánico, en muy diferentes tipos de muestras reales como agua, tejidos vegetales, alimentos, suelos, preparados farmacéuticos, etc.

Posteriormente se ha producido una extensión de esta metodología a la espectrofluorimetría, originando la Espectrofluorimetría en Fase Sólida[19] cuyos primeros métodos fueron desarrollados en "modo batch" por el grupo de investigación del PAI "Espectrometría en Fase Sólida" del departamento de Química Analítica de la Universidad de Granada[20,21,22].

3.1. Tipos de Soporte Sólido

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 retención-detección. El soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos:

I. El tamaño de las partículas debe ser suficientemente grande para permitir que las disoluciones circulen libremente y evitar sobrepresión en el sistema.

II. Debe ser mecánicamente resistente al flujo continuo: no deben producirse huecos, que provocarían variaciones en la superficie de contacto sólido-disolución, con el fin de garantizar la reproducibilidad del sensor.

III. Ha de ser químicamente inerte frente a los componentes de las disoluciones empleadas, portador, eluyente y otros reactivos, para asegurar la vida media del sensor.

IV. Debe ser de un material compatible con la naturaleza del sistema integrado de detección, en sensores espectrofotométricos debe ser suficientemente transparente para medidas de absorbancia.

V. El proceso de retención-elución debe ser suficientemente rápido, para conseguir altas velocidades de análisis. La selección del portador/eluyente va, por ello, ligado a la del soporte.

Existe una gran variedad de productos sintéticos y naturales que muestran las propiedades adecuadas, los más utilizados suelen ser **cambiadores iónicos**, **resinas adsorbentes sin grupos funcionales** y **sílice con fases enlazadas**.

---

[19] C.A. Heller, R.R. Mcbride, M.A. Ronning, Anal. Chem., 49 (1997) 2251.

[20] F. Capitán, A. Navalón, J.L. Vilchez, L.F. Capitán-Vallvey, Talanta, 37 (1990) 193.

[21] J.L. Vilchez, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, Fresenius J. Anal. Chem., 354 (1996) 470.

[22] J.L. Vilchez, J. Taofki, A. Navalón, Anal. Lett. 35 (2002) 279.

3.1.1. Cambiadores iónicos

Los polímeros de cambio iónico más importantes hoy en día son aquellos ***basados en el poliestireno***. Están constituidos por una matriz hidrofóba formada por cadenas lineales de poliestireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno. Los grupos cambiadores se encuentran enlazados al anillo aromático y 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):

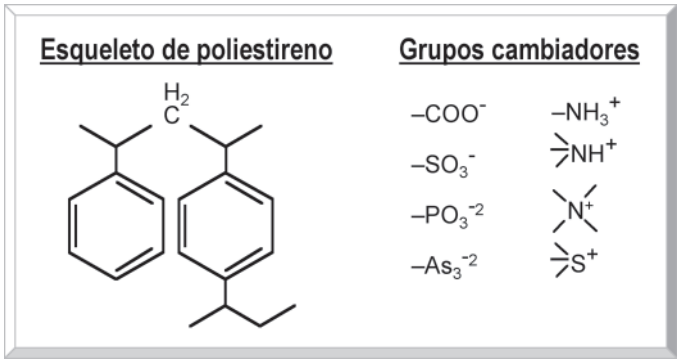


Figura IV.2. Resinas de cambio iónico I.

Son materiales porosos y poseen grupos hidrófilos, por lo que son afectados por las características del medio de reacción (pH, cte. dieléctrica, etc.) y al ponerlos en suspensión en agua o cualquier disolvente polar, lo absorben en su interior, se hinchan y se convierten en «geles». El grado de entrecruzamiento (relacionado directamente con el porcentaje de DVB) determina el tamaño de los microporos de la matriz, la capacidad de hinchamiento y la movilidad de los contra-iones en la resina. Esta última determina a su vez la cinética del proceso de cambio iónico.

Las resinas microporosas no pueden emplearse cuando lo que interesa es fijar una muestra compleja, de naturaleza orgánica. Es necesario en estos casos recurrir a las resinas «macroporosas o reticulares» que poseen una gran superficie interna y permiten un acceso más fácil de las moléculas reaccionantes y por tanto un cambio iónico más rápido que los polímeros convencionales tipo «gel».

Las resinas derivadas de ***polímeros de dextrano*** están formadas por polisacáridos que se obtienen entrecruzando dextrano con epiclorhidrina. Son adsorbentes polares con grupos no iónicos.

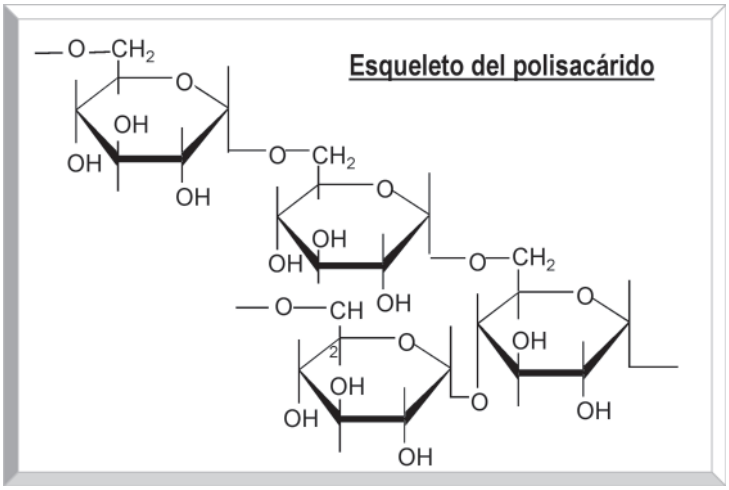


Figura IV.3. Resinas de cambio iónico II

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, ECTEOLA). La utilidad de estos cambiadores dependerá en gran medida del pH.

3.1.2. Resinas adsorbentes sin grupos funcionales.

Son resinas adsorbentes constituidas por cadenas de poliestireno entrecruzadas mediante moléculas de DVB (al igual que las resinas tipo Dowex), pero carentes de grupos cambiadores de iones. Las más utilizadas son las resinas macroporosas tipo Amberlita XAD.

Dado que no poseen grupos iónicos hidrofílicos, se afectan por las características del medio de reacción en mucha menor medida que las resinas cambiadoras de iones. 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.

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.

3.1.3. Sílice con fases enlazadas

Se trata de soportes constituidos por esferas 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. Presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio.

Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos (aromáticos o no) 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.

4. SENSORES QUÍMICOS

Un ***sensor químico*** ideal es un dispositivo analítico miniaturizado que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de la especie o especies de una muestra[23].

En términos generales está constituido por una microzona activa donde tiene lugar una o más reacciones (químicas o bioquímicas) y, a veces, también un proceso de separación[24], que está conectada o integrada en un sistema de detección. Como consecuencia, los sensores químicos en flujo, integran la detección con algún otro paso del proceso analítico: reacción y/o separación. Además, estos sistemas pueden implicar separaciones previas continuas no integradas y reacciones químicas situadas en módulos individuales.

La amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales, sin embargo establecer sus características generales, indispensables unas, deseables otras, es más fácil. Algunas de ellas coinciden con las características analíticas esenciales: exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad, reutilizabilidad en procesos irreversibles. Otras características se relacionan con el tiempo: respuesta en tiempo real, rapidez en los procesos reversibles y estabilidad. Otras características destacables son: simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo costo, posibilidad de trabajo con muestras complejas y, por último, necesidad de no interpretación de resultados por parte del operador.

La clasificación puede hacerse en función de un amplio conjunto de criterios diferentes: parámetro de medida, naturaleza, forma externa, relación de la zona sensora con el detector, modo de medida (continuo o discontinuo), respuesta a uno o varios analitos o naturaleza del detector.

Los sensores según el modo de medida pueden ser continuos o discontinuos, en esta Memoria, nos centraremos en los sensores ópticos en flujo continuo, es decir, sensores en los que la zona sensora se sitúa en el interior de una célula de flujo, ubicada en el seno de un detector espectroscópico no destructivo.

[23]M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro, Analyst 118 (1993) 593.

[24]M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro, Flow-through (bio)chemical sensors. Elsevier. çmsterdam, (1994)

4.1. Sensores Químicos en Flujo Continuo

En los sistemas analíticos de flujo continuo, la detección en la célula de flujo, las reacciones químicas y los procesos de separación que implican transferencia de materia entre dos fases tienen lugar en módulos diferentes, es decir, se llevan a cabo de forma secuencial. Existen cuatros formas de integrar estos pasos:

- Integrar la separación con la reacción analítica.
- Integrar la reacción química con la detección.
- Integrar la separación continua con la detección.
- Integrar la separación continua con la reacción química y la detección.

Los dispositivos que integran estos pasos en una célula de flujo se pueden considerar sensores pues poseen los principales requisitos exigibles. Hay tres tipos de sensores químicos (o bioquímicos) en flujo, según la posición de la microzona sensora en la que tiene lugar la reacción química y/o la separación y su relación con el detector: dos de ellos son sensores que usan sondas conectadas al instrumento, de forma que la zona sensora se encuentra incorporada al final de la sonda o colocada en la célula de flujo, y el contacto con la muestra se realiza por inmersión de la sonda en ella. El tercer tipo es un instrumento convencional, en el que la microzona sensora se ubica en una célula de flujo especial, y la introducción de la muestra se realiza por aspiración o inyección en la propia célula de flujo.

En adelante, nos centraremos en los sensores en flujo que integran separación y detección que es la modalidad empleada en los sensores que se estudian en esta Memoria. Los sensores de este tipo más frecuentemente empleados se basan en el uso de un material sorbente como una resina de cambio iónico, o sílice con fases enlazadas, empaquetado en la célula de flujo de un detector espectroscópico y en el que se retiene el analito o su producto de reacción. Son sensores irreversibles, reutilizables en los que a lo sumo tienen lugar dos pasos, retención y elución, de forma secuencial pero simultáneamente con la detección en cada determinación.

Los sensores espectroscópicos en flujo basados en la retención y medida de la absorbancia o fluorescencia intrínseca de un único analito, en la región UV-visible, se han desarrollado ampliamente durante los últimos años.

La implementación de la Espectroscopía en fase sólida con el Análisis por inyección en flujo (SPS-FIA) fue descrita por primera vez por Yoshimura[25], que desarrolló el primer sensor fotométrico para la determinación de cobre, utilizando una configuración monocanal con dos válvulas de inyección en serie, una para la muestra y otra para el eluyente (ácido nítrico concentrado), y donde la microzona activa estaba constituida por una resina AG50W-X12 ubicada en una célula de flujo comercial. Posteriormente se desarrollaron los primeros sensores fluorimétricos[26,27,28].

[25] K. Yoshimura, Anal. Chem. 59 (1987) 2922.

[26] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Talanta, 37 (1990) 1049.

[27] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 234 (1990) 345.

[28] K. Yoshimura, Analyst, 113 (1988) 471.

La integración SPS-FIA, combina las ventajas de la primera, con las que ofrece el FIA, rapidez, automatización, menor participación humana, etc, constituyendo una acertada combinación que ha dado buenos y prometedores resultados en la determinación de analitos de diferente naturaleza y ofreciendo características analíticas (sensibilidad, selectividad, reproducibilidad, frecuencia de muestreo) muy atractivas.

En sus inicios esta metodología se aplicó principalmente al análisis de compuestos inorgánicos[29,30,31]. Los sensores espectrofotométricos en los que la especie retenida es el producto de una reacción (previa a la retención o simultánea) son frecuentes, en su mayoría para metales, por ejemplo, cromo por reacción con 1,5-difenilcarbazida[32], níquel a través de su reacción con el reactivo PAN[33]; también se han descrito sensores para determinar otras especies como amonio mediante la retención del producto de la reacción de Berthelot[34], etc. Algunos autores han desarrollado sensores fluorimétricos para iones metálicos con derivación[35].

Los compuestos orgánicos han sido también estudiados bajo la óptica de los sensores en flujo continuo, en bibliografía se han descrito gran cantidad de sensores con detección principalmente espectrofotométrica[36,37,38,39,40]. Es interesante destacar que, en comparación, son escasos los sensores desarrollados con detección fluorimétrica[41,42,43,44]. Recientemente se ha publicado una revisión de las aplicaciones de este tipo de sensores al análisis de fármacos[45].

---

[29] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta 173 (1990) 345.

[30] K. Yoshimura, S. Matsuoka, Y. Inokura, U. Hase, Anal. Chim. Acta 268 (1992) 225.

[31] M. J. Ayora-Cañada, M. I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz Anal. Chim. Acta, 375 (1998) 71.

[32] K. Yoshimura, Analyst, 113 (1988) 471.

[33] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, Fresenius J. Anal. Chem., 363 (1999) 59.

[34] M. De la Torre, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Talanta 39 (1991) 869.

[35] M. de la Torre, F. Fernández Gámez, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Analyst, 116 (1991) 81.

[36] F. Alava-Moreno, M.J. Valencia-González, M.E. Díaz-García, Analyst, 123 (1998) 151.

[37] M. L. Fernández de Córdova, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, Anal. Chim. Acta 369 (1998) 263.

[38] Y. Huang, C. Zhang, X. Zhang, Z. Zhang, Fresenius J. Anal. Chem., 365 (1999) 729.

[39] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz, Anal. Sci. 15 (1999) 985.

[40] M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 22 (2000) 59.

[41] K. Yoshimura, S. Matsuoka, T. Tabuchi, H. Waki, Analyst, 117 (1992) 189.

[42] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Microchemical J., 44 (1991) 215.

[43] Z.L. Gong y Zhang Z.J., Anal. Chim. Acta 339 (1997) 161.

[44] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz, Fresenius J. Anal. Chem., 363 (1999) 265.

[45] A. Molina-Díaz, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdova, J. Pharm. Biomed. Anal., 28 (2002) 399.

En ocasiones, al incremento de sensibilidad derivado de la preconcentración *in situ*, que tiene lugar en el soporte empaquetado en la célula de flujo, se ha unido una etapa de preconcentración en una columna de cambio iónico insertada en la configuración FIA. Es el caso de la determinación de bismuto descrita por Yoshimura[46] en el primer sensor propuesto de esta naturaleza. En él, se efectúa una preconcentración previa del analito, como clorocomplejo, en una columna rellena con una resina de cambio aniónico (Dowex 1x8). En otras ocasiones la columna previa se usa para eliminar interferencias[47].

4.1.1. Multisensores

Los sensores que permiten la detección simultánea de más de un analito son técnicamente más complejos que los sensores monoparámetro (principalmente debido a la necesidad de que el detector sea capaz de proporcionar información multidimensional, en un período de tiempo compatible con las características del sensor) sin embargo presentan indiscutibles ventajas.

Algunos autores han utilizado separaciones previas al sistema sensor, colocando, por ejemplo, el sistema a la salida de un cromatógrafo de líquidos de alta resolución[48]. Sin embargo es interesante destacar aquellos sensores capaces de resolver mezclas complejas de analitos sin necesidad de llevar a cabo una separación previa, que han tenido escasísimo desarrollo.

Una multideterminación consiste en la determinación de dos o más analitos sobre una muestra, pudiendo ser secuencial o simultánea:

- Multideterminación Secuencial:

  Determinación de *n* analitos a partir de *n* inyecciones de muestra. En bibliografía encontramos algunos ejemplos de estos sensores para la determinación de dos analitos (sensores biparámetros)[49, 50,51,52].

[46] K. Yoshimura, Bunsei Kagaku 36 (1987) 656.

[47] M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz, Anal. Chim. Acta. 375 (1998)71.

[48] M.T. Tena, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, J. Chromatogr. Sci. 30 (1992) 269.

[49] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Anal. Chim. Acta, 394 (1999) 149.

[50] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova and A. Molina Díaz Fresenius J. Anal. Chem. 365 (1999) 619.

[51] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández-de Córdova, M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz Anal. Chim. Acta, 404 (2000) 131.

[52] M.L. Fernández de Córdova, P. Ortega Barrales, G. Rodríguez Torné, A. Molina Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 11 (2003) 669.

- Multideterminación Simultánea:

  Determinación de n analitos a partir de una única inyección de muestra. En bibliografía se encuentran descritos sensores para la determinación de mezclas de principios activos en fármacos[53,54], y también para especies contaminantes en aguas[55], en ambos es necesario un tratamiento posterior de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). Otro multisensor descrito emplea la medida a diferentes longitudes de onda[56].

En esta Memoria se proponen cuatro multideterminaciones simultáneas, en una de ellas se empleará asimismo una regresión por PLS, y en las otras tres se potenciará la diferencia en la cinética del proceso de retención-elución de los analitos mediante el empleo de una precolumna on line empaquetada en cada caso con el mismo soporte sólido que la célula de medida. De esta forma se consigue que los analitos alcancen la zona de medida de manera secuencial, sin embargo el sensor se considera simultáneo porque con una única inyección o inserción de muestra se determinan todos sus componentes. Debemos destacar que estos son los primeros multisensores descritos basados en este principio.

4.2. Regeneración del sensor

Para que el sensor sea reutilizable es necesario que una vez desarrollada la señal, la microzona activa se regenere y quede dispuesta para un nuevo análisis, siendo éste un paso clave para el funcionamiento del sensor. Se puede conseguir de dos formas:

- El procedimiento más simple de regeneración se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente, desplazando al analito, o su producto de reacción, de los sitios activos de la resina. Permite frecuencias de muestreo altas y asegura una mayor duración del soporte cuando es una resina de intercambio iónico.
- Se emplea una disolución 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. Esta solución se utiliza cuando el portador no puede eluir por si mismo la especie que se mide. Permite mayor sensibilidad de la zona sensora, porque la preconcentración es más efectiva, pero ofrece menor frecuencia de muestreo y suele acortar la vida del sensor si el soporte es una resina intercambiadora.

---

[53] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, L.F. Capitán Vallvey, Talanta 49 (1999) 691.

[54] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 21 (1999) 983.

[55] S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Díaz, Talanta (2003) en prensa.

[56] B. Fernández Band, F. Lázaro, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta, 229 (1990) 177.

En el caso de que la microzona activa del sensor esté formada por un soporte sólido con un reactivo permanentemente inmovilizado habrá que evitar que el eluyente produzca la desorción del mismo inactivando el sensor[57].

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.

4.3. Sensores propuestos

Esta Memoria pretende contribuir al desarrollo de nuevos sensores espectroscópicos, fluorimétricos y espectrofotométricos, en flujo continuo.

Como se ha comentado anteriormente los sensores que responden a un único analito se denominan sensores monoparámetro, mientras que aquellos que responden a dos o más se denominan sensores multiparámetro. La detección espectrofotométrica ha sido casi exclusivamente empleada para el desarrollo de sensores monoparámetro, por lo que se abre un amplio campo de acción en el desarrollo de sensores multiparámetro empleando este tipo de detección. En esta Memoria se desarrollan sensores que responden a dos o tres analitos, es decir sensores bi y triparámetro, de los que se encuentran pocos en bibliografía siendo los trabajos publicados para esta Memoria los primeros que aparecieron en bibliografía.

En cuanto a los sensores con detección luminiscente, no han sido desarrollados tan ampliamente como los espectrofotométricos, de modo que se proponen dos sensores monoparámetro que contribuyen a ampliar el escaso campo de sensores fluorimétricos. Asimismo se propone el desarrollo de un sensor triparámetro con detección luminiscente con calibración multivariante para, de este modo, enriquecer la presente Memoria con la aplicación de las nuevas técnicas de tratamiento de datos al campo de multisensores fluorimétricos.

5. ANALITOS

Uno de los objetivos de esta memoria es desarrollar métodos de análisis aplicables al control analítico farmacológico o medioambiental, para ello se seleccionaron analitos de interés en estos campos para desarrollar los sensores indicados. A continuación se describe el interés de cada uno de los analitos ordenados en función del tipo de sensor desarrollado para su determinación (mono o multiparámetro).

[57] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Diaz, Anal. Chim. Acta, 375 (1998) 71.

5.1. Sensores monoparámetro: Diuréticos

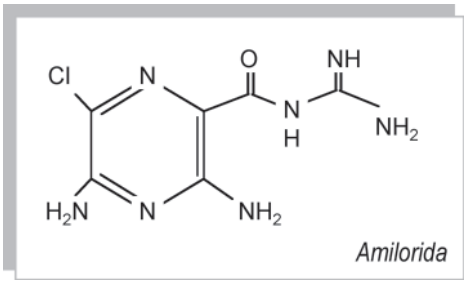
Como se ha indicado, se pretenden desarrollar dos sensores monoparámetro con detección luminiscente, por ello se seleccionaron dos analitos que fueran susceptibles de ser determinados mediante la medida de su fluorescencia nativa. Los analitos seleccionados fueron dos diuréticos: *Amilorida* y *Triamtereno*. Los diuréticos se definen como aquellas sustancias que mejoran la secreción renal de agua y electrolitos y se emplean para el tratamiento de los problemas de hipertensión sanguínea así como para diversos desórdenes orgánicos, como por ejemplo la insuficiencia cardiaca, resultado de la retención de líquido por el cuerpo. Los diuréticos se dividen en cuatro tipos o clases, dependiendo del sitio del nefrón (unidad funcional del riñón) donde bloquean o impiden la reabsorción tubular de sodio:

- Diuréticos proximales: bloquean la anhidrasa carbónica
- Diuréticos de asa: actúan en la rama ascendente del asa de Henle.
- Diuréticos tipo tiazidas o distales: actúan en el túbulo distal y en el segmento conector.
- Diuréticos antikaliuréticos (ahorradores de potasio): actúan en el tubo distal y colector cortical y en células sensibles a aldosterona.

Los diuréticos "ahorradores de potasio" se introdujeron en 1962 considerándose la espironolactona como el primer diurético de este tipo. Los otros dos diuréticos ahorradores de potasio son amiloride y triamtereno, que son el objeto de nuestro trabajo. Operan en las células principales del túbulo cortical (y posiblemente en tubo colector cortical). La entrada de sodio en estos segmentos, es a través de canales de sodio sensibles a la aldosterona. La reabsorción preferente del sodio catiónico crea un gradiente eléctrico que favorece la secreción de potasio y protones. Por tanto, la inhibición de la reabsorción de sodio en este sitio, puede conducir a hiperkalemia y acidosis debido a la reducción simultánea en la secreción de potasio y protones.

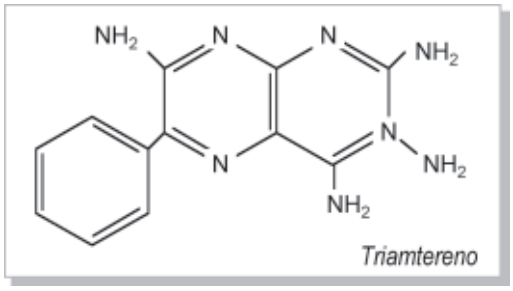
Ambos fármacos se diferencian de la espironolactona en que no inhiben la aldosterona, puesto que actúan en ausencia de ella. Los efectos electrolíticos netos de la Amilorida y el Triamtereno son similares entre sí y con los de la espironolactona. Tienen el riesgo de producir hiperkalemia si se emplean solos, por lo que generalmente se combinan con benzotiadiazinas, para proteger al paciente de la hipokalemia que suelen producir estas últimas.

La **amilorida**, (N-amidino-3,5-diamino-6-cloropirazina-2-carboxiamida) es el compuesto más potente de las pirazinoilguanidinas, su característica especial consiste en su basicidad moderadamente fuerte (pK_a=8.7), mientras que la mayor parte de los diuréticos son ácidos débiles. Su estructura química se muestra a continuación:



Este diurético ahorrador de potasio funciona reduciendo el número de canales de Na^+ de la membrana luminal del tubo contorneado distal y comienzo del colector. Se elimina con la orina sin metabolización.

El **triamtereno**, (6-fenil-2,4,7-pteridinotriamina), actúa bloqueando los canales de sodio a nivel del túbulo distal de la nefrona. Tiene una biodisponibilidad del 55%, las concentraciones plasmáticas máximas se obtiene a las 2-4 h, que coincide así mismo con el tiempo requerido para que aparezca su acción, y la duración de esta es de 8 h. El grado de unión a proteínas plasmáticas es del 60 %, se metaboliza en el hígado a hidroxitriamtereno, se elimina mayoritariamente con la orina, el 7-10% en forma inalterada. Presenta la siguiente estructura química:



En bibliografía se han encontrado numerosos procedimientos para la separación y determinación de diuréticos, tanto en fármacos como en fluidos biológicos siendo la técnica más empleada la cromatografía de líquidos[58,59].

En el caso de mezclas de diuréticos que incluyen amilorida, se emplean generalmente espectrofotometría[60,61,62,63], técnicas electroanalíticas[64,65] y HPLC con detección

[58] R. Ventura, T. Nadal, P. Alcalde, J.A. Pascual, J. Segura, J. Chromatogr. A 655 (1993) 233.

[59] J. Barbosa, D. Barrón, J.L. Beltrán, S. Butí, Talanta 45 (1998) 817.

[60] J.J.Berzas Nevado, C.C. Guibertau, F.Salinas, Talanta 39 (1992) 547.

[61] E. Nevisn, O.Feyyaz, Anal. Lett. 30 (1997) 1503.

[62] A. Y. Golcu, S. Serin, Sci. Pharm., 66 (1998) 351.

[63] R.S.A. Lapa, J.L.F.C. Lima, J.L.M. Santos, Anal. Chim. Acta, 407 (2000) 225.

[64] M.B. Barroso, R.M. Alonso, R. Jiménez, Anal. Chim. Acta, 305 (1995) 332.

[65] E. Gonzáles, A. Becerra, J.J. Laserna, J. Chromatogr. B, 687 (1996) 145.

fotométrica[66,67] y fluorimétrica[68,69]. Normalmente, la determinación de amilorida a niveles terapéuticos por cromatografía líquida requiere tediosos procedimientos preliminares como extracción y preconcentración en un disolvente orgánico[70].

El triamtereno, como en el caso de la amilorida, se determina generalmente en mezclas de diuréticos[71,72,73] y ha sido determinado mayoritariamente por espectrometría de fluorescencia[74], electroforesis capilar[75] y HPLC[76,77].

5.2. Sensor biparámetro: Vitaminas

El desarrollo del sensor biparámetro se aplicará a la determinación de dos vitaminas hidrosolubles que comúnmente se encuentran asociadas en los preparados farmacéuticos, *Tiamina y Piridoxina*.

Desde la antigüedad se sabía que el consumo continuado de alimentos en conserva, provocaba una serie de enfermedades que se curaban al incluir en la dieta alimentos frescos. No obstante, el conocimiento de las vitaminas tuvo lugar como consecuencia de los progresos de la química, y alcanzó su máximo desarrollo en los finales del siglo XIX y principios del siglo XX. Las **vitaminas** participan en la formación de hormonas, células sanguíneas, sustancias químicas del sistema nervioso y material genético. Por lo general actúan como catalizadores, combinándose con las proteínas para crear metabólicamente enzimas activas que a su vez producen importantes reacciones químicas en todo el cuerpo.

Las 13 vitaminas identificadas se clasifican de acuerdo con su capacidad de disolución en grasa (vitaminas liposolubles) o en agua (vitaminas hidrosolubles). Las vitaminas liposolubles, A, D, E y K, suelen consumirse junto con alimentos que contienen grasa y, debido a que se pueden almacenar en la grasa del cuerpo, no es necesario tomarlas diariamente. Las vitaminas hidrosolubles, las ocho del grupo B y la vitamina C, no se pueden almacenar y, por tanto, se deben consumir con frecuencia.

---

[66] E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández, G. Ramis-Ramos, M.C. García çlvarez Coque, Analyst, 117 (1992) 843.

[67] K. Murat, E. Nevin, J. Pharm. Biomed. Anal. 19 (1999) 477.

[68] R. Oertel, K. Richter, D. Dobrev, A. Berndt, T. Gramatte, Pharmazie, 49 (1994) 700.

[69] S. Carda-Broch, J.S. Esteve-Romero, M.C. García çlvarez Coque, Anal. Chim. Acta, 375 (1998) 143.

[70] M. S. Yip, P. E. Coates,J. J. Thiessen, J. Chromatogr. B, 307 (1984) 343.

[71] R. Oertel, K. Richter, T. Gramatté, W. Kirch, J. of Chromatography A, 797 (1998) 203.

[72] F. García Sánchez, A. Fernández Gutiérrez, C. Cruces Blanco, Anal. Chim. Acta, 306 (1995) 313.

[73]E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernandez, M.C. García-Alvarez-Coque, J. Pharm. Biomed. Anal. 11 (1993) 711.

[74] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alanón Molina, P. Fernández López, Anal. Chim. Acta, 326 (1996) 117.

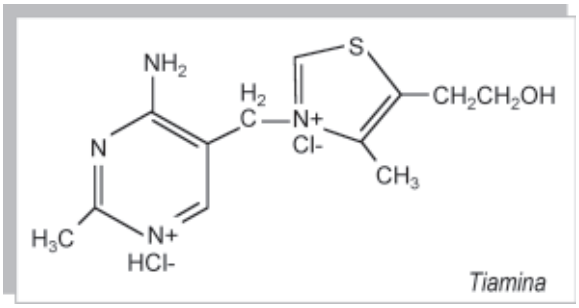
[75] E. Gonzáles, A. Becerra, J.J. Laserna, J. Chromatogr. B, 687 (1996) 145.

[76] K.J. Swart, H. Botha, J. Chromatogr. 413 (1987) 315.

[77] E. Bonet-Domingo, M.J. Medina-Hernández, G. Ramis-Ramos, M.C. García çlvarez Coque, J. Chomatogr. 582 (1992) 189.

La **tiamina**, aneurina, o vitamina B_1 fue aislada en 1932 por Windaus y sus colaboradores a partir de la levadura y determinaron su fórmula exacta. Windaus, en Alemania (1934) y Williams, en Estados Unidos (1934), establecieron su estructura y en 1936, Williams logró sintetizarla.

Su estructura está constituida por un anillo pirimidínico sustituido unido mediante un puente metileno a un núcleo tiazólico: cloruro-hidrocloruro de 3-(4-amino-2-metil-5-pirimidilmetil)-5-(β-hidroxietil)-4-metiltiazolio.



Tiamina

Su actividad biológica es la de coenzima en dos tipos de reacciones catalizadas enzimáticamente en la corriente principal del metabolismo de los glúcidos, en las que se transfieren grupos aldehídos. Para llevar a cabo esta actividad, la tiamina, debe convertirse en el pirofosfato de tiamina biológicamente activo, tras su absorción por el organismo.

En cuanto a los métodos para su determinación, el método espectrofotométrico más difundido se basa en su diazotación y copulación en medio básico[78,79]. Existen otros métodos espectrofotométricos indirectos que se basan en la reacción entre el ión sulfuro generado a partir del azufre del núcleo tiazol de la vitamina, con: Pb(II)-EDTA[80], con Zn(II) en medio básico y posterior reacción con p-(N,N-dietil)-anilina en presencia de dicromato para dar azul de metileno[81].

Los métodos fluorimétricos se basan en la oxidación en medio básico de la vitamina B_1 a tiocromo, el cual presenta una fuerte fluorescencia azul en el UV lejano, esta fluorescencia se mide después de una extracción con isobutanol para separar el pigmento de sustancias que podrían interferir en el ensayo.

Para la determinación de Vitamina B_1 en preparados farmacéuticos, también se han empleado sistemas de flujo continuo, FIA[82,83,84], cuyos resultados son tan satisfactorios como los obtenidos manualmente[85].

---

[78] H.W. Kinnersley, R.A. Peters, Biochem. J. 28 (1934) 667.

[79] E.R. Kirch, O. Bergeim, J. Biol. Chem., 143 (1942) 575.

[80] J.M. Lopez Gimenez, F. Bosch Serrat, An. R. Acad. Farm., 53(2) (1987) 261.

[81] V. Nirmalchandar, N. Balasobramania, Indian Drugs, 26(5) (1989) 233.

[82] X.-Q. Guo, J.-G. Xu, Y-Z. Wu, Anal. Chim. Acta, 276(1) (1993) 151.

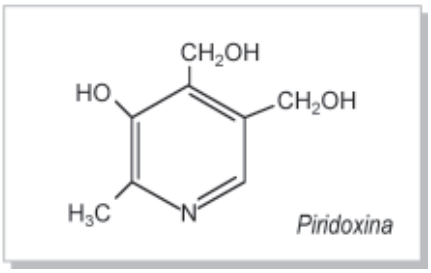
[83] T. Perez-Ruiz, C. Martinez-Lozado, V. Tomas, I. Ibarra, Talanta, 39(8) (1992) 907.

[84] P. Ortega Barrales, M. L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Anal. Chim. Acta, 376 (1998) 227.

[85] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Anal. Chem. 70 (1998) 271.

La **piridoxina** es necesaria para la absorción y el metabolismo de aminoácidos. También actúa en la utilización de grasas del cuerpo y en la formación de glóbulos rojos o eritrocitos.

Desde las investigaciones de Harris, Heyl y Folkers, se conoce la pluralidad de las vitaminas B_6, la piridoxina o piridoxol, el piridoxal, y la piridoxamina. La vitamina fue aislada en 1938 a partir de la levadura y del salvado de arroz por Kuhn, que propuso el nombre de *adermina*, al año siguiente se obtuvo sintéticamente y se adoptó el nombre común de piridoxinas, debido a su estructura química.



Se trata de un anillo piridínico sustituido en el carbono 4, en la piridoxina (piridoxol), el sustituyente es un alcohol primario, mientras que en los otros vitámeros, se trata de un aldehído, en el piridoxal; y de una amina, en la piridoxamina.

La piridoxina cristaliza en prismas incoloros con punto de fusión a 160ºC, es soluble en agua, alcohol y acetona, es poco soluble en los disolventes orgánicos, es estable a la acción del calor y de los ácidos y bases concentrados, pero es inestable a la acción de la luz. El piridoxal y la piridoxamina son termolábiles.

Los tres compuestos se interconvierten directamente o por medio de fosforilación enzimática en presencia del ATP, y tienen la misma actividad. Actúan como coenzimas en varios mecanismos del metabolismo de los aminoácidos (descarboxilación, transaminación, desulfuración, síntesis de la alanina, conversión de triptófano en nicotinamida) y de los lípidos (transformación, almacenamiento y utilización de ácidos grasos). Por lo demás, es un factor

de crecimiento indispensable para bacterias y levaduras. En los mamíferos acelera el desarrollo.

Se han descrito algunos sensores espectrofluorimétricos para algunos vitámeros de la vitamina B_6, Chen et al[86] propusieron un sensor fluorimétrico para determinar piridoxal, basándose en la formación de un complejo con Be (II), que exhibe fluorescencia a 450 (λ_{exc}=360). El complejo se retiene sobre C_{18} empaquetada en una célula de flujo. Esta misma reacción sirve al autor como base para la resolución de mezclas de piridoxal, piridoxal 5-fosfato, y ácido piridóxico mediante espectrofluorimetría sincrónica derivada[87]. En bibliografía podemos encontrar otros

[86] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Microchem. J. 44 (1991) 215.

[87] D. Chen, M.D. Luque de Castro, M. Valcárcel, Anal. Chim. Acta. 261 (1992) 269.

métodos fluorimétricos FIA para la determinación de piridoxina[88], Ruiz Medina et al[89], desarrollaron un sensor fluorimétrico basado en la medida de la fluorescencia nativa cuando es retenida transitoriamente sobre un soporte sólido en el interior de una célula de flujo.

En cuanto a la espectrofotometría, también utilizada para la determinación de piridoxina[90,91]. M.J. Ayora et al.[92] proponen un sensor sencillo mediante su retención sobre una resina de cambio iónico y la medida de su absorbancia intrínseca a 290 nm.

Las vitaminas generalmente se encuentran en la farmacopea como complejos vitamínicos, por ello resulta interesante desarrollar métodos de determinación en los que sea posible la detección y cuantificación de dos o más de estos compuestos.

En la bibliografía encontramos que en el caso de mezclas de vitaminas se ha aplicado la espectrofotometría derivada[93,94] y derivada de orden cero[95], ya que con ellos se eliminan satisfactoriamente las interferencias debidas a los excipientes y al resto de las vitaminas. Otros métodos empleados, a parte de los ya citados, para la determinación de alguna de estas dos vitaminas en presencia de otras del mismo grupo B, son HPLC[96] y electroforesis capilar[97].

5.3. Multisensores espectrofotométricos

Se aborda por primera vez el desarrollo de dos sensores triparámetro con detección espectrofotométrica para la determinación de analitos que se encuentren asociados generalmente en los fármacos. Encontramos que los antiinflamatorios generalmente se asocian entre sí, así como con la cafeína, por lo que se propone la determinación de estas asociaciones: *paracetamol-cafeína-propifenazona* y *paracetamol-ácido acetilsaliciílico-cafeína.*

Los analgésicos son aquellos fármacos que alivian el dolor sin producir pérdida de conciencia. Forman un gran grupo que abarca desde los derivados del opio, como la morfina o la codeína, hasta los no opiáceos, como la aspirina, el paracetamol y el ibuprofeno. Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un gran grupo de fármacos con acción antitérmica, analgésica y antiinflamatoria. Se clasifican en:

---

[88] G. G. Gao, G.Y. Yang, Senenyang Yaoxueyuan Xuebao, 9 (1992) 18; (Anal. Abst., 55 (1993) 8G247).

[89] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina Díaz, Fresenius J. Anal. Chem., 363 (1999) 265.

[90] M.N. Reddy, S.P. Rao, D.G.Sankar, Indian Drugs, 33 (1996) 569.

[91] M.K. Gupta, C.L. Jain, Indian drugs, 26 (1991) 275.

[92] M.J. Ayora-Cañada, M.I. Pascual-Reguera, A. Molina-Díaz, Inter. J. Pharm, 202 (2000) 113.

[93] B. Morelli, J. Pharm. Sci., 84(1) (1995) 34.

[94] Mohamed E. Addel-Hamid, Magda H. Barary, Analyst, 110 (1985) 831.

[95] B. Morelli, Anal. Lett., 27(14) (1994) 2751.

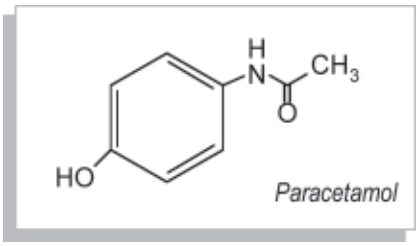
[96] P. Moreno, V. Salvado, J. Chromatogr., 870 (2000) 207.

[97] L. Fotsing, M. Fillet, I. Bechet, Ph. Hubertt, J. Crommen, J.Pharm. Biomed. Anal. 15(8) (1997) 1113.

- Salicilatos: *ácido acetilsalicílico*, salicilamida, diflunidal.
- Paraaminofenoles: *paracetamol*, fenacetina
- Pirazolonas: metamizol, fenilbutazona, *propifenazona.*
- N-aril-antranílicos: ácido mefenámico, ácido flufenámico.
- çcidos propiónicos: ibuprofeno, naproxeno, fenoprofeno, ketoprofeno.
- çcidos acéticos: diclofenaco, indometacina, aceclofenaco, kerotolaco.
- Oxicams: piroxicam, tenoxicam, meloxicam.
- Otros: nabumetona, nimesulida.

En general, estos fármacos actúan inhibiendo la síntesis de prostaglandinas al bloquear la enzima cicloxigenasa. Las prostaglandinas actúan como transmisores y mediadores en los procesos inflamatorios, en el dolor y en el control de los centros termorreguladores del hipotálamo, por lo que la función antipirética de estos fármacos se explica por su efecto periférico antiinflamatorio y por su efecto central termorregulador. También contribuyen a bajar la fiebre dos efectos secundarios de estos fármacos: la vasodilatación periférica y el aumento de la sudoración.

El **paracetamol**, N-(4-hidroxifenil) acetamida, N-acetil-p-aminofenol o acetaminofeno, es un compuesto de origen sintético derivado del p-aminofenol. Cristaliza en sistema monoclínico, tiene un sabor semiamargo y un olor característico. Es soluble en agua, metanol, etanol y acetona. Su estructura es la siguiente:



Con propiedades analgésicas y antipiréticas, fue utilizado por primera vez en medicina por Mering a finales del siglo XIX, aunque su mayor popularidad se alcanzó a mediados del siglo XX cuando se descubrió que era el principal metabolito activo de la acetanilida (miembro original de este grupo de drogas) y la fenacetina, y que resultaba menos tóxico.

El paracetamol, como analgésico, actúa bloqueando periféricamente los impulsos del dolor a través de la inhibición reversible de la ciclo-oxigenasa, enzima que interviene en la síntesis de prostaglandinas. En relación con su actividad antipirética, disminuye la fiebre por efecto directo sobre los centros termorreguladores del hipotálamo que aumentan la disipación del calor corporal.

Se considera el sustituto de la aspirina para su uso analgésico y antipirético en casos en que esta última esté contraindicada. Al igual que los salicilatos, el paracetamol alivia el dolor moderado especialmente somático (cefaleas, dismenorrea,

trastornos musculares, articulares y de nervios periféricos). En estudios comparativos encontramos que el paracetamol es algo menos potente que la aspirina como analgésico y algo más como antipirético. Se tolera mejor y presenta menos efectos secundarios por lo que ocupa el lugar de «analgésico doméstico común», sin embargo, en casos de enfermedad hepática o hepatitis viral está contraindicado; asimismo la sobredosis aguda causa daños hepáticos fatales.

Presenta una buena disponibilidad por vía oral (75-85%), se absorbe rápidamente en el tubo digestivo; la concentración máxima en plasma se encuentra entre 30 y 60 min después de su ingesta ya que se distribuye de manera relativamente uniforme en la mayor parte de los líquidos corporales. Se metaboliza en el hígado y se elimina mayoritariamente con la orina conjugado con el ácido glucurónico, menos de un 5% se excreta en forma inalterada. Su semivida de eliminación es de 1.5-3 h.

Se han propuesto diferentes técnicas para la determinación de paracetamol como componente individual o en presencia de otros compuestos, con los que constituye mezclas binarias y ternarias muy frecuentes en preparados farmacéuticos, técnicas cromatográficas[98,99,100,101], electroquímicas[102,103], espectrofluorimétricas[104,105,106] y espectrofotométricas[107,108].

También se han desarrollado sensores espectrofotométricos para la determinación, tanto de paracetamol[109] individualmente, como formando parte de mezclas binarias[110,111] y ternarias[112,113,114], siendo éstas últimas con calibración multivariante.

---

[98] G.G. Skellern, Analyst 106 (1981) 1971.

[99] E. Michael, M.E. El-Kommos, M.E. Kamala, Talanta 36 (1989).

[100] H.N. Dogan, Pharmazie, 51 (1996) 773.

[101] Viddesh R. Bari, U. J. Dhorda, M. Sundaresan, Talanta, 45 (1997)297.

[102] A, Falkowski, R. Wei, Anal. Lett. Part B, 14 (1981) 1775.

[103] R.N. Gupta, R. Pickersgill, M.Stefanec, Clin. Biochem., 16 (1983) 220.

[104] C.B. Walberg, J.Anal.Tox. 1 (1977) 79.

[105] G. Milch, É. Szabó, J. Pharm. Biomed. Anal., 9 (1991) 1107.

[106] J.Vilchez, R. Blanc, R. Avidad, A. Navalón, J. Pharm. Biomed. Anal. 13 (1995) 1119.

[107] N. Erk, J. Pharm. Biomed. Anal., 21 (1999) 429.

[108] M.S. Bloomfield, Talanta 580 (2002) 130.

[109] M.J.Ayora-Cañada, M.I.Pascual-Reguera, A.Ruiz-Medina, M.L.Fernández de Córdova, A.Molina-Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 22 (2000) 59.

[110] A.Ruiz-Medina, M.L.Fernández de Córdova, A.Molina-Díaz, Anal. Chim. Acta, 394 (1999) 149.

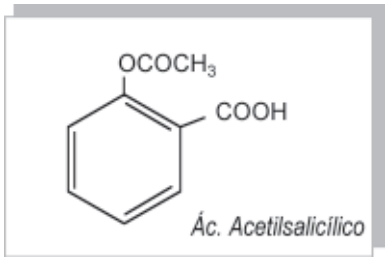
[111] A.Ruiz-Medina, M.L.Fernández de Córdova, M.J.Ayora-Cañada, M.I.Pascual-Reguera, A.Molina-Díaz, Anal. Chim. Acta, 404 (2000) 131.

[112] M.J.Ayora-Cañada, M.I.Pascual-Reguera, A.Molina-Díaz, L.F. Capitán-Vallvey, Talanta, 49 (1999) 691.

[113] A.Ruiz-Medina, M.L.Fernández de Córdova, A.Molina-Díaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 21 (1999) 983.

[114] G. Sala, S. Maspotch, H. Iturriaga, M. Blanco, V. Cerdá, J. Pharm. Biomed. Anal. 6 (1988) 765

El **ácido acetilsalicílico**, conocido comúnmente como aspirina, se elabora a partir del ácido salicílico obtenido de la corteza del sauce, utilizada, entre otros, por los antiguos griegos y los pueblos indígenas americanos para combatir la fiebre y el dolor. Sin embargo, el ácido salicílico es amargo e irrita el estómago. El químico alemán Felix Hoffman sintetizó en 1893 el derivado acetilado del ácido salicílico como respuesta a la petición de su padre, que tomaba ácido salicílico para el reumatismo. Su estructura química es la que se muestra:



En la actualidad, la aspirina es el primer fármaco de elección frente a la fiebre, el dolor leve a moderado, y la inflamación debida a la artritis o los traumatismos. Como analgésico es más eficaz que la codeína, sin embargo, la aspirina produce en ocasiones sangrados gastrointestinales insignificantes que con el tiempo pueden originar un déficit de hierro y un uso prolongado puede producir también úlceras gástricas. La aspirina no se debe administrar a niños que padezcan varicela o gripe, ya que eleva el riesgo de padecer el síndrome de Reye, una enfermedad muy rara y con frecuencia mortal que afecta al cerebro y a algunos órganos abdominales.

Al igual que el paracetamol, es un inhibidor de la ciclo oxigenasa lo que se traduce en una inhibición en la síntesis de las prostaglandinas. Su absorción es muy rápida y completa. La vida media del ácido acetilsalicílico es muy corta, de 15 a 20 min, puesto que se transforma rápidamente en la mucosa digestiva, hígado y plasma, en ácido salicílico por desacetilación, siendo su vida media de eliminación 2-3 horas. El grado de unión a las proteínas plasmáticas es del 80-90%.

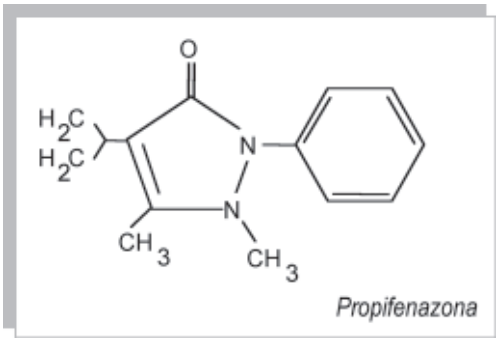
El ácido salicílico procedente de la hidrólisis del ácido acetilsalicílico o de los salicilatos, se elimina con la orina, parte metabolizado como ácido salicilúrico (80%) y parte en forma de glucurónidos (15%), la proporción que se excreta inalterada es pH-dependiente (orina ácida: 5%; orina alcalina: hasta un 85%).

El gran número de métodos publicados para la determinación de ácido salicílico o ácido acetilsalicílico en fluidos biológicos y fármacos, haciendo uso de una gran variedad de técnicas analíticas, no es sólo indicativo del gran interés que presenta la determinación de estos compuestos, sino también de los problemas que se encuentran para desarrollar un método que presente buena sensibilidad, selectividad y simplicidad en su determinación.

La determinación de ácido acetil salicílico se realiza normalmente mediante una previa hidrólisis de éste a ácido salicílico, para posteriormente determinar este último. La razón de ello se debe a la fácil tendencia a la hidrólisis del ácido acetil salicílico tanto en disolución como en fase sólida. Éstas técnicas son principalmente:

espectrofotométricas[115,116,117], fluorimétricas[118,119] y cromatográficas[120,121,122,123]. La espectrofluorimetría en fase sólida en modo batch ha sido usada para la determinación de este principio activo[124].

La **propifenazona**, 1,2-dihidro-1,5-dimetil-4-(1-metiletil)-2-fenil-3H-pirazol-3-ona, es un derivado pirazolónico, que también se encuadra dentro de los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs). Presenta la siguiente estructura química:



Tiene acción analgésica y antitérmica comparable a la del ácido acetilsalicílico. El mecanismo de la analgesia, como en los casos anteriores, consiste en la inhibición de síntesis de prostaglandinas al inhibir la ciclooxigenasa. La propifenazona es capaz de aliviar el dolor somático, ejerciendo poca influencia sobre el dolor visceral. El mecanismo de la acción antipirética es central, produciendo aumento de la termólisis, vasodilatación cutánea y sudoración.

La propifenazona se absorbe un 90% tras la administración oral. La unión a las proteínas plasmáticas es del 10 % al 20 %, siendo el volumen de distribución de 1.3 l/kg. Se metaboliza principalmente en el hígado, su principal metabolito, la propifenazona N-desmetilada se excreta a través de la orina (80%) y tan sólo un 0.6% del fármaco se excreta inalterado por la orina.

---

[115] Z. Kokot, K. Burda, J. Pharm. Biomed. Anal., 18 (1998) 871.

[116] M. Sena, J.C. Fernandes, L. Rover, R. J. Poppi, L. T. Kubota., Anal. Chim. Acta, 409 (2000) 159.

[117] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdova, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, Int. J. Pharm. 216 (2001) 95.

[118] S.A. Winfield, A.T. Rhys Williams, J. Pharm. Biomed. Anal., 2 (1984) 561.

[119] A. Navalón, R. Blanc, M. del Olmo, J.L. Vilchez, Talanta, 48 (1999) 469.

[120] A. Verstraeten, E. Roets, J. Hoogmartens, J. Chromatogr. A, 388 (1987) 201.

[121] F. Kees, D. Jehnich, H. Groebercker, J. Chromatogr. B, 677 (1996) 172.

[122] A. Abu-Qare, M. B. Abou-Dona, J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 939.

[123] J. T. Franeta, D.D. Agbaba, S. M. Eric, S. P. Pavkov, S.D. Vladimirov, M.B. Aleksic, J. Pharm. Biomed. Anal, 24 (2001) 1169.

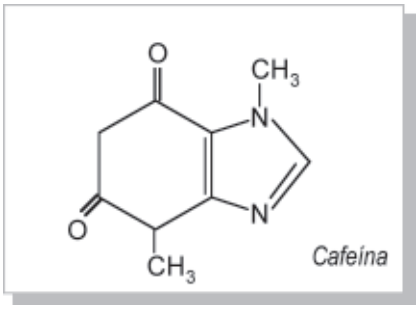
[124] S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Diaz, J. Pharm. Biomed. Anal., 31 (2003) 439.

Generalmente la propifenazona se encuentra asociada a otros principios activos, por lo que los métodos desarrollados para su determinación siempre lo son en presencia de otros compuestos. Nuevamente, las técnicas más utilizadas son las cromatográficas[125,126,127,128,129].

Los analgésicos generalmente se encuentran asociados en los preparados farmacéuticos entre sí, para aumentar el poder analgésico y antiinflamatorio, así como con otras sustancias que potencien sus efectos, la cafeína es una de estas sustancias.

La **cafeína,** 1,3,7-trimetilxantina**,** es un estimulante del sistema nervioso central en términos de reducir el sueño, cansancio y en parte el apetito.

Este compuesto aumenta la acción analgésica de fármacos analgésicos puros, y de antiinflamatorios no esteroidales por un efecto sinérgico. Combinando la cafeína con estos fármacos se consigue que el paciente no sólo se sienta aliviado, sino tonificado. Además tiene la sensación de estar un poco más despierto y menos congestionado.



[125] Y. Avranova, J. Pharm. Biomed. Anal. 7 (1989) 1221.

[126] S. Markovic, Z. Kusec, Pharmazie, 45 (1990) 935.

[127] G. Santoni, L. Fabbri, P. Gratteri, G. Renzi, S. Pinzauti, Inter. J. Pharm., 80 (1992) 263.

[128] A. M. Di Pietra, R. Gatti, V. Andrisano, V. Cavrini, J. Chromatogr. A, 729 (1996) 355.

[129] T. Ternes, M. Bonerz, T. Schmidt, J. Chromatogr. A, 938 (2001) 175.

La cafeína, presenta varias acciones farmacológicas sobre los diferentes tejidos que se resumen a continuación:

TEJIDOS	ACCIÓN
NERVIOSO	
Cortex	Euforia, antifatiga, estímulo moderado.
Médula	Estímulo respiratorio y vasomotor.
MUSCULAR LISO:	
Cardíaco	Elevación del ritmo cardiaco
Vasos sanguíneos	Vasodilatación periférica. Vasoconstricción central
Bronquíolos	Dilatación.
MUSCULAR ESQUELÉTICO	Estímulo
RENAL	Diuresis
TRACTO INTESTINAL	Incremento de la secreción gástrica.

La cafeína suele encontrarse, como hemos mencionado, asociada a otros compuestos en los preparados farmacéuticos de modo que los métodos para su determinación incluyen mayoritariamente esta posibilidad, así encontramos que las técnicas mas empleadas son las cromatográficas[130,131,132,133,134,135]. También se encuentran referencias sobre determinaciones espectroscópicas[136,137].

5.4. Multisensor espectrofluorimétrico

Se propone un multisensor con detección luminiscecente para la determinación de tres analitos empleados generalmente como pesticidas.

Durante los últimos treinta años, la lista de pesticidas, productos antiparasitarios empleados 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 es la causa principal por la que el análisis

[130] M. Sadek, A. Shanawany, A. Kheir, G. Rücker, J. Pharm. Biomed. Anal., 9 (1991) 87.

[131] M. Di Pietra, R. Gatti, V. Andrisano, V. Cavrini, J. Chromatogr. 729 (1996) 355.

[132] O.A. Ghosheh, D. Browne, T. Rogers, J. de León, L. P. Dwoskin, P.A. Crooks, J. Pharm. Biomed. Anal., 23 (2000) 543.

[133] J. P. Aucamp, Y. Hara, Z. Apostolides, J. Chromatogr. 876 (2000) 235.

[134] J.T. Franeta,D. D. Agbaba, S.M. Eric, S.P. Pavkov, S.D. Vladimirov, M.B. Aleksic, J. Pharm. Biomed. Anal., 24 (2001) 1169.

[135] M. Gil-Agustí, Ll. Monferrer-Pons, M.C. García-Alvarez-Coque J. Esteve-Romero, Talanta, 54 (2001) 621.

[136] E. Dinç, G. Kökdil, F. Onur, J. Pharm. Biomed. Anal., 26 (2001) 769.

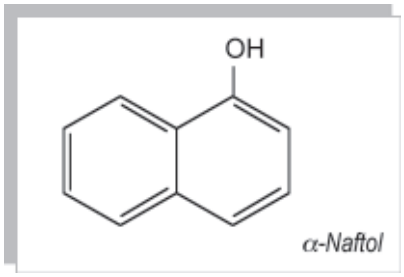
[137] Z. Bouhsain, S. Garrigues, M. de la Guardia, Analyst, 122 (1997) 441.

de pesticidas es uno de los campos de interés de la Química Analítica, así como la aparición de contaminantes procedentes de la utilización de este tipo de compuestos en el medio ambiente ha aumentado proporcionalmente con lo que se hace necesario el desarrollo de métodos analíticos sensibles y selectivos para controlar niveles residuales de pesticidas.

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 que los hongos o mohos perjudiciales, e ***Insecticidas***, para proteger a las plantas de las lesiones causadas por los insectos. Además de estos grupos principales, se encuentran otros como *acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas* y los *reguladores del crecimiento*.

En esta Memoria se han escogido dos fungicidas, tiabendazol y o-fenil fenol, aunque este último se emplea también como desinfectante, así como un insecticida, α-naftol.

El **α-naftol** (NFT) es el principal producto de hidrólisis de carbaril, un insecticida del grupo de los N-metilcarbamatos ampliamente utilizado en agricultura debido a su alta efectividad[138] contra numerosas plagas de insectos así como para su control en frutas y vegetales. El NFT también tiene utilidad como insecticida y, como el carbaril, actúa inhibiendo la enzima colinesterasa. Su estructura química es la que se muestra:

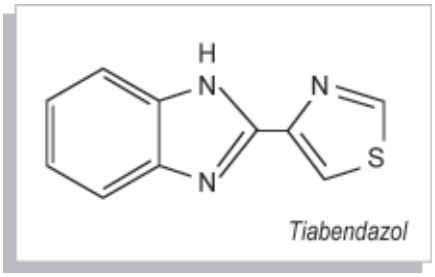


Es blanco con una leve tonalidad rosa, causa irritación severa de los ojos, la piel y el tracto respiratorio. Es un compuesto bastante estable químicamente en condiciones normales de presión y temperatura, aunque muy sensible a la luz y el aire por lo que debe preservarse de estas condiciones.

Los fungicidas se usan ampliamente en la industria y en agricultura para un gran número de propósitos que incluyen la protección de semillas y cultivos maduros contra las enfermedades producidas por hongos o mohos. El **tiabendazol** (TBZ), 2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol, es un fungicida sistémico empleado ampliamente

[138] J.J. D'Amico, F.G. Bolllinger, 1991, en "Synthesis and Chemistry of Agrochemical II, ACS Symposium Series 443. American Chemical Society, Washington, DC. pp. 300-320.

desde 1968 en el control de enfermedades de frutas y vegetales, tales como, mohos, plagas, manchas y podredumbres. Presenta la siguiente estructura química:

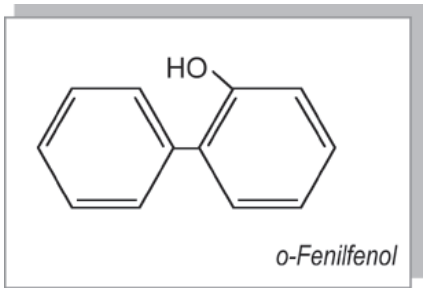


Tiabendazol

También se usa como antihelmíntico, fármaco utilizado para eliminar, en los humanos o en los animales, las infecciones producidas por parásitos helmintos: cestodos (tenias), nematodos (áscaris, oxiuriasis o enterobiasis, triquiuros), triquinosis, etc.

Desde hace cerca de 40 años se vienen utilizando disoluciones de o-fenilfenato sódico para el tratamiento poscosecha de enfermedades en cítricos, este tratamiento presenta dos beneficios claros, la inactivación de hongos y bacterias en la superficie de las frutas así como la deposición de **o-fenilfenol** (OPP), en las zonas más afectadas de modo que previene las infecciones durante el almacenamiento y transporte de las frutas.

El o-fenilfenol, se usa también directamente como fungida poscosecha, de ahí el interés en métodos de determinación sensibles y selectivos. La estructura química que presenta es la siguiente:



o-Fenilfenol

Tanto OPP como TBZ, son considerados aditivos alimentarios empleándose como conservantes y registrándose con los números E-231 y E-233, respectivamente

El análisis de pesticidas suele presentar dos tipos de problemas que derivan de la complejidad y diversidad de las matrices en que suelen encontrarse, así como de la baja concentración en la que generalmente se encuentran. Las técnicas analíticas que permiten desarrollar métodos con las características necesarias (selectividad y sensibilidad) son técnicas cromatográficas, electroforesis capilar de alta resolución y espectrometría ultravioleta y luminiscente.

Generalmente los métodos desarrollados para el análisis de pesticidas van dirigidos a la determinación de grupos de ellos, así métodos que incluyan los analitos que

nos ocupan, son mayoritariamente los cromatográficos[139,140,141,142,143,144], métodos espectroscópicos, fluorimétricos[145,146] y espectrofotométricos[147,148,149]. Existen métodos espectroscópicos en fase sólida, como los desarrollados para la determinación de tiabendazol[150,151] y mezclas con o-fenilfenol[152] y tiabendazol[153]. También se han desarrollado métodos FIA[154,155,156] y SIA[157,158]

Para la determinación simultánea de α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol en esta Memoria, se propone un sensor con detección fluorimétrica y un posterior tratamiento de los datos mediante calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS). El empleo de una fase sólida en la zona de detección aumenta la selectividad así como la sensibilidad del método por preconcentración de los analitos en la zona de medida. Es el primer multisensor fluorimétrico de estas características.

[139] J. Sherma, Anal. Chem. 67 (1995) 1R.

[140] A. Di Muccio, I. Camoni, M. Ventriglia, D. Attard Barbini, M. Mauro, P. Pelosi, T. Generali, A. Ausili, S. Girolimetti, J. Chromatogr. A, 697 (1995)145.

[141] A, Abad, M.J. Moreno, R. Pelegrí, M.I. Martínez, A. Saéz, M. Gamón, A. Montoya, J. Chromatogr. A, 833 (1999) 3.

[142] M.P. García de Llasera, M. Bernal González, Water Research, 35 (2001) 1933.

[143] M.J. Santos Delgado, S. Rubio Barroso, G. Toledano Fernández, L.M. Polo Diez, J. Chromatogr. A, 921 (2001) 287.

[144] M. Fernández, R. Rodríguez, Y. Picó, J. Mañes, J. Chromatogr. A, 912 (2001) 301.

[145] F. García Sánchez, A. Navas Diaz, M.C. Torijas, Anal. Chim. Acta, 414 (2000) 25.

[146] A. Navas Diaz, F. García Sánchez, M.M. López Guerrero, Talanta (2003) en prensa.

[147] A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, A. Zamoro, Anal. Chim. Acta, 258 (1992) 47.

[148] K.D. Khalaf, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, J. M. García, F. Jiménez, J.J. Arias, Microchemical J. 53 (1996) 461.

[149] A.B. Manjubhashini, G.K. Raman, A. Suresh Kumar, P. Chiranjeevi, Talanta, 59 (2003) 1015.

[150] L.F. Capitán Vallvey, R. Avidad, J.L. Vilchez, J. AOAC Int., 77 (1994) 1651.

[151] L.F. Capitán Vallvey, M.K. Deheidel, R. Avidad, Mikrochim. Acta, 130 (1999) 273.

[152] L.F. Capitán Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, J.L. Vilchez, Talanta, 40 (1993) 1695.

[153] L.F. Capitán Vallvey, M.K. Deheidel, I. de Orbe, R. Avidad, Analyst, 124 (1999) 49.

[154] K. Khalaf, A. Morales Rubio, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta, 280 (1993) 231.

[155] S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Díaz, Talanta, en prensa.

[156] M.J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Diaz, Anal. Chim. Acta, 459 (2002) 235.

[157] G. de Armas, E. Becerra, A. Cladera, J.M. Estela, V. Cerdá, Anal. Chim. Acta, 427 (2001) 83.

[158] G. de Armas, M. Mirón, J.M. Estela, V. Cerdá, Anal. Chim. Acta, 471 (2002) 173.

V. Discusión conjunta de resultados

Esta Memoria presenta el desarrollo de seis sensores, incluyendo mono y multiparámetro, para la determinación de analitos de interés en el campo farmacológico y medioambiental. El trabajo experimental desarrollado en todos los casos tiene una base común en el orden de ejecución de los estudios necesarios, sobre las variables y otros factores que pueden afectar a los sistemas propuestos. A continuación se expone un resumen de los estudios realizados siguiendo ese mismo orden.

1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Todos los reactivos utilizados en el trabajo experimental que supone esta Memoria fueron de calidad "para análisis". Asimismo siempre se emplearon precisiones de 0.1 mg en la pesada y material de vidrio volumétrico para la preparación de todas las disoluciones.

Las disoluciones estándar de los analitos para los diferentes estudios se prepararon disolviendo la cantidad apropiada en un disolvente que será siempre que sea posible, agua desionizada. En el caso de los diuréticos fue necesario emplear una mezcla disolvente de dimetilsulfóxido-agua desionizada al 20 y 25% (v:v) para triamtereno y amilorida, respectivamente. Para los pesticidas se empleó una disolución acuosa de metanol al 50%. Las disoluciones de trabajo se prepararon por adecuada dilución en agua desionizada.

La instrumentación necesaria en los trabajos propuestos es principalmente aquélla que se refiere a la composición del sistema FIA, a continuación se resumen todos los componentes empleados:

Sistema de propulsión:

Bomba peristáltica GILSON MINIPULS 3, consta de un tambor con una serie de rodillos sobre los que se comprimen unos tubos flexibles de silicona, a través de los que circula el flujo del sistema. Esta bomba tiene control de velocidad y proporciona un flujo libre de pulsos.

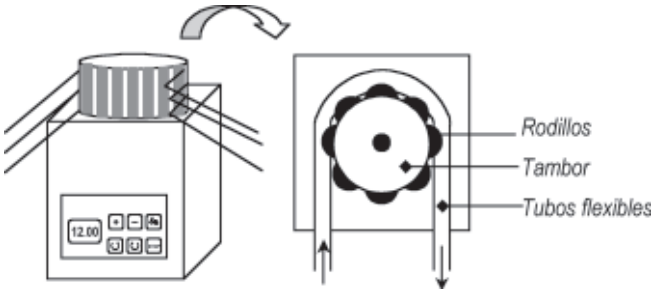


Figura V.1. Esquema de una bomba peristáltica, con detalle del tambor con los rodillos

Sistemas de inyección y selección (portador/eluyente):

Válvulas rotatorias REODHYNE tipo 50, de seis vías. La forma de conectar las válvulas es diferente según vaya a actuar como sistema de inserción de muestra (válvula de inyección) o si va a actuar permitiendo la elección entre dos corrientes de portador-eluyente (válvula de selección).

La válvula de inyección tiene dos posiciones, llenado y vaciado. La primera permite que se llene el bucle de muestra y la segunda lo inserta en la corriente de portador.

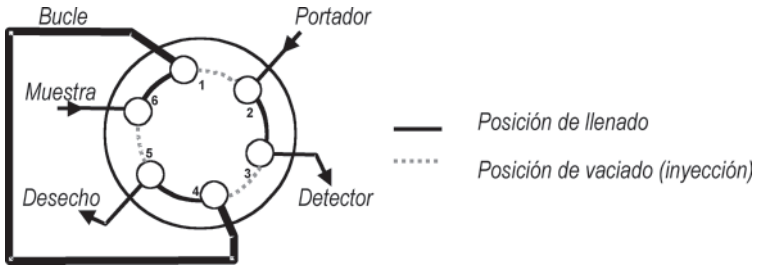


Figura V.2. Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de inyección

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

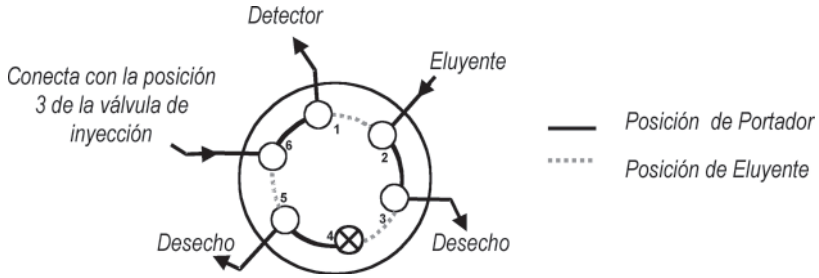


Figura V.3. Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de selección

Sistema de transporte:

Tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno. Las uniones se realizaron con conectores tipo OMNIFIT.

Sistema de detección:

Todos los trabajos presentados en esta Memoria utilizan detección óptica siendo espectrofotométrica en tres casos y espectrofluorimétrica en los otros tres. Las cubetas empleadas son células de flujo Hellma, 138-QS y 176.052-QS y se colocan dentro del detector correspondiente.

Los detectores empleados se indican a continuación:

Para los sensores con *detección espectrofotométrica* se emplearon dos equipos en función de las necesidades de cada trabajo. El sistema biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina se utilizó un espectrofotómetro diodo array MILTON ROY 3000 ARRAY controlado mediante ordenador 286 integrado en él y equipado con el programa informático de MILTON ROY Rapid Scan 2.01. Los sensores triparámetro fueron desarrollados mediante la utilización de un espectrofotómetro VARIAN CARY 50, con lámpara de descarga de xenon, monocromador Czerny-Turner de 0.25 m y detector de diodo de silicio, controlado mediante un ordenador equipado con el software Win UV.

Para los sensores con *detección luminiscente* se emplearon dos equipos diferentes, para los sensores monoparámetro se empleó un espectrómetro de luminiscencia Perkin Elmer LS-50, equipado con una lámpara de descarga de xenon (20 kW), monocromadores Monk-Gillieson y un contador de rodamina cuántica 101 para corregir los espectros de excitación. Para el sensor triparámetro con tratamiento por PLS, se empleó un Espectrofluorímetro Varian Eclipse, con lámpara de descarga de xenon de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner y dos detectores (referencia interna y muestra) mediante tubo fotomultiplicador R-928 sensible al rojo como estándar.

2. ESTUDIOS PRELIMINARES

Los sensores que se desarrollan en esta Memoria presentan detección de tipo óptico (optosensores), ya sea espectrofotométrica o espectrofluorimétrica. Al comenzar el desarrollo de cada uno de estos sensores es necesario estudiar las características espectrales de los analitos para determinar las condiciones óptimas de trabajo.

2.1. Sensores monoparámetro

Los dos sensores monoparámetro que se proponen usan detección luminiscente como se ha indicado anteriormente. Por ello es necesario obtener una descripción

completa de las características fluorescentes de los analitos, amilorida y triamtereno, para ello se realizaron los espectros de luminiscencia total.

Un espectro de luminiscencia total consiste en un espectro tridimensional que representa la intensidad relativa de fluorescencia frente a las longitudes de onda de excitación y de emisión. Otra forma de representar los espectros de luminiscencia total son las curvas de nivel o topogramas. En ellos, los dos ejes planos, OX y OY, representan las longitudes de onda de emisión y excitación, mientras que las intensidades se expresan como una serie de curvas de nivel. Este sistema presenta la ventaja de que es posible determinar el máximo con una gran precisión.

Las curvas de nivel obtenidas cuando el analito en estudio es la amilorida, para la que se propone un sensor monoparámetro, son las siguientes:

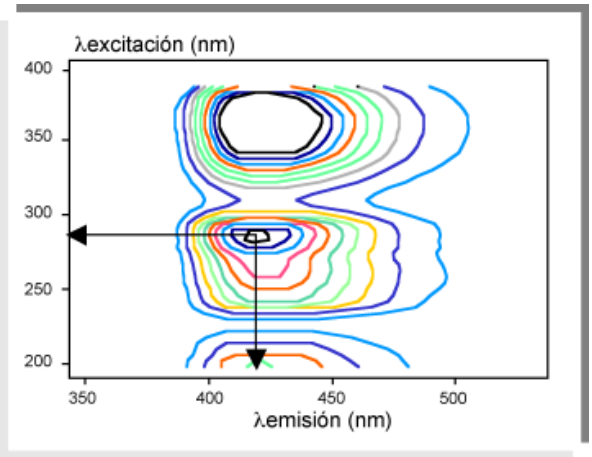


Figura V.4. Topograma correspondiente a una muestra de amilorida medida en disolución

Gracias a esta representación es fácil determinar cuáles son las longitudes de onda de excitación y emisión que proporcionan un máximo en la intensidad relativa de fluorescencia para la amilorida, siendo 291nm y 419nm, respectivamente. Estas serán las longitudes de onda seleccionadas para el trabajo.

El segundo sensor monoparámetro propuesto pretende también la determinación por fluorimetría de triamtereno, en este caso. Del mismo modo que en el caso anterior se estudiaron las propiedades fluorescentes de este analito obteniéndose las siguientes curvas de nivel.

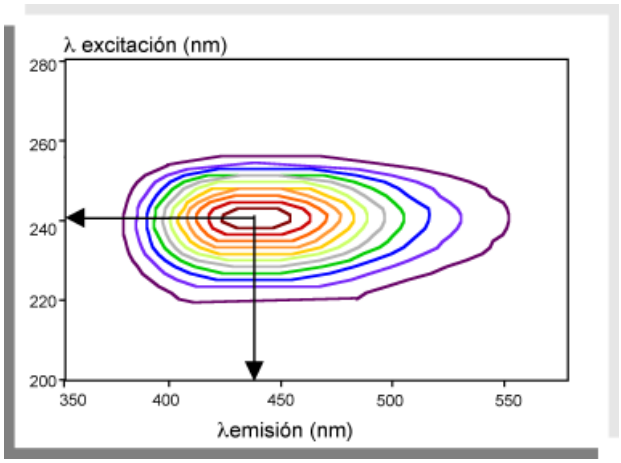


Figura V.5. Mapa de contorno de una muestra de triamtereno en disolución.

En este caso se observa que las longitudes de onda de excitación y emisión que producen la máxima señal analítica son 240 nm y 440 nm respectivamente. Estos valores fueron seleccionados para el desarrollo del trabajo.

2.2. Sensor Biparámetro: Tiamina-Piridoxina

Los tres sensores que se proponen con detección espectrofotométrica son multiparámetro, por ello es necesario realizar los espectros de absorción de todos los analitos para localizar una longitud de onda en la que se produzca la máxima absorción de cada uno de los analitos con la menor interferencia posible del resto.

Para el sensor biparámetro, se registraron los espectros de absorción de las dos vitaminas en disoluciones aisladas así como el espectro de absorción de una disolución mezcla de ambas. Como se observa en la

Figura V.6 existe un amplio solapamiento en la zona de máxima absorción de los analitos, que impide claramente la determinación conjunta de éstos por espectrofotometría convencional.

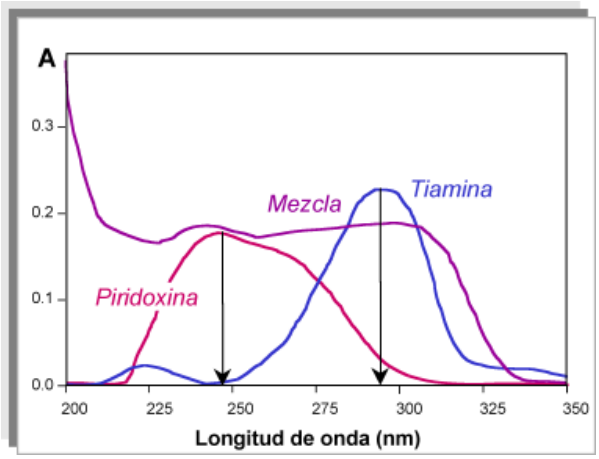


Figura V.6. Espectros de absorción en disolución de tiamina, piridoxina y la mezcla de ambas, la concentración empleada en todos los casos fue de 100μg ml^{-1} (paso de luz de 1mm).

La utilización de un soporte sólido en la célula de medida separa algo los máximos de absorción, pero no hasta el punto de permitir la utilización de la absorbancia intrínseca de las vitaminas como señal analítica para la resolución de la mezcla. Sin embargo, se puso de manifiesto un comportamiento diferencial en la cinética del proceso de fijación-elución de los analitos: la tiamina avanza más lentamente a través de la zona sensora. Esta diferencia es susceptible de ser potenciada mediante la utilización de una precolumna de la misma naturaleza del soporte sólido empleado en la célula de medida y el empleo de una disolución portadora adecuada, de forma que se retenga en ella el analito, tiamina en este caso, que presente una cinética más lenta. Esta modificación permite la resolución simultánea de la mezcla.

Asimismo se empleará un espectrofotómetro diodo array para medir simultáneamente a las dos longitudes de onda de máxima absorción de cada analito retenido sobre el soporte sensor, éstas serán, 255nm para la tiamina y 293nm para la piridoxina. Estos valores están algo desplazados respecto de los correspondientes en disolución (247nm y 290nm) mostrando un pequeño efecto batocrómico. Por consiguiente, el fiagrama mostrará un registro doble (uno para cada analito).

2.3. Sensores Triparámetro Espectrofotométricos

Como se ha comentado anteriormente se propone el desarrollo de dos multisensores que responden simultáneamente a tres analitos, siendo éstos dos analgésicos-antiinflamatorios y cafeína, los cuales aparecen generalmente asociados en los fármacos.

En los dos casos propuestos, paracetamol-cafeína-propifenazona y paracetamol-ácido acetilsalicílico-cafeína, se registraron los espectros de absorción en disolución de los analitos observándose un solapamiento que imposibilita la resolución de las mezclas propuestas por espectrofotometría convencional en disolución.

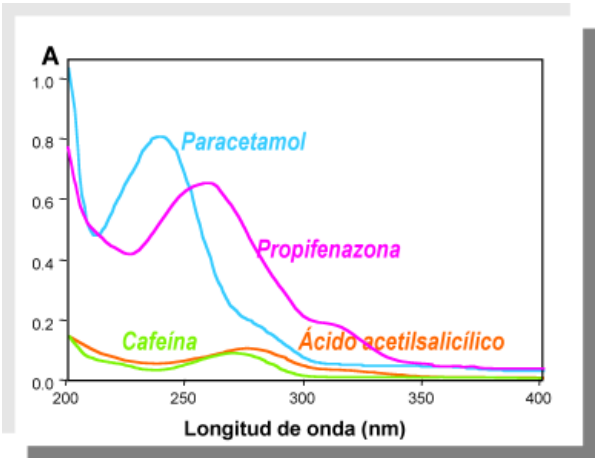


Figura V.7. Espectros de absorción en disolución de paracetamol, 60 μg ml^{-1}, cafeína, 5 μg ml^{-1}, ácido acetilsalicílico, 50 μg ml^{-1} y propifenazona, 50 μg ml^{-1}.

Así como ocurría con la cinética del sensor biparámetro, la posibilidad de hacer que los analitos lleguen secuencialmente a la zona sensora puede permitir la resolución de la mezcla, esto se consigue gracias a la retención simultánea on-line de dos de los analitos en una minicolumna empaquetada con C_{18} mientras que el primero llega a la zona sensora donde se detecta por medida de su absorbancia directa originando una señal transitoria. Posteriormente se eluyen secuencialmente los analitos retenidos en la minicolumna llegando asimismo a la célula de medida, desarrollando sus señales transitorias respectivamente.

La longitud de onda de trabajo se selecciona teniendo en cuenta el máximo de absorción del analito menos sensible, y fue, 275 nm para la mezcla PCT-CF-PFZ y 272 nm para la mezcla PCT-ASA-CF.

2.4. Sensor Triparámetro Luminiscente

Por último se propone un multisensor con detección luminiscente para la determinación simultánea de α-naftol, *o*-fenilfenol y tiabendazol. Se realizó un estudio de las propiedades fluorescentes de los tres analitos, empleando el sistema de flujo descrito en el apartado siguiente y midiendo a flujo detenido las señales obtenidas de los analitos en disolución así como retenidos en la microzona sensora (silicagel C_{18}).

Los espectros de emisión de los analitos retenidos sobre la fase sólida empleada, es decir, sobre silicagel C_{18}, se muestran en la figura siguiente.

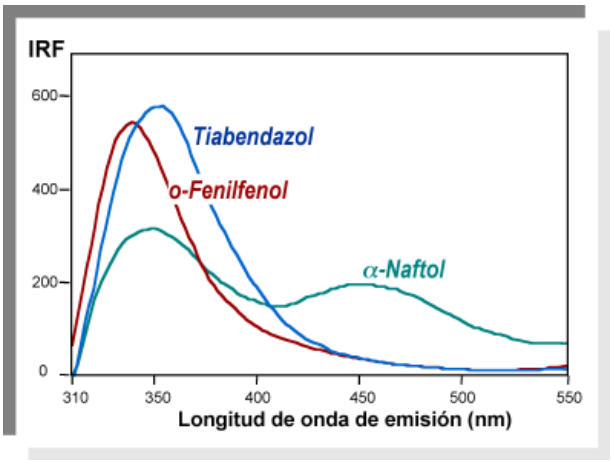


Figura V.8. Espectros de emisión en fase sólida de a-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol a una concentración de 0.5 μg ml^{-1} (λ exc=290 nm)

El solapamiento en los espectros de emisión impide trabajar empleando la fluorimetría convencional, de modo que se planteó la posibilidad de una separación on-line como en el resto de los sensores multiparámetro propuestos en esta Memoria, sin embargo ante la imposibilidad de fomentar la diferencia en la cinética de retención-elución entre ellos, se propuso emplear un método multivariante y enriquecer también de esta forma el interés de esta Memoria en las nuevas tendencias en el tratamiento de datos.

Se empleará una longitud de onda de excitación de 290 nm así como un intervalo de emisión de 325-435 nm.

3. CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA FIA

Los trabajos desarrollados en esta Memoria implican una integración de la espectroscopía en fase sólida con un sistema en flujo continuo. La *configuración del sistema por inyección en flujo* vendrá determinada, tanto por la existencia o no de una reacción química en disolución, como por la naturaleza del proceso de elución.

Si se pretende determinar un único analito, el mejor de los casos será aquél en el que el propio portador puede regenerar eficazmente el sensor, mientras que, en ocasiones, es necesaria la introducción de un eluyente apropiado, lo que requiere la elección de la configuración más conveniente.

La configuración FIA que se utiliza en los sensores luminiscentes (mono y multiparámetro) propuestos es una configuración monocanal en la que se efectúa la inserción de un volumen perfectamente conocido de la muestra en el flujo del portador a través de una válvula de inyección rotatoria a la que se ha conectado un bucle de volumen conocido. La *Figura V.9* muestra un esquema del sistema utilizado.

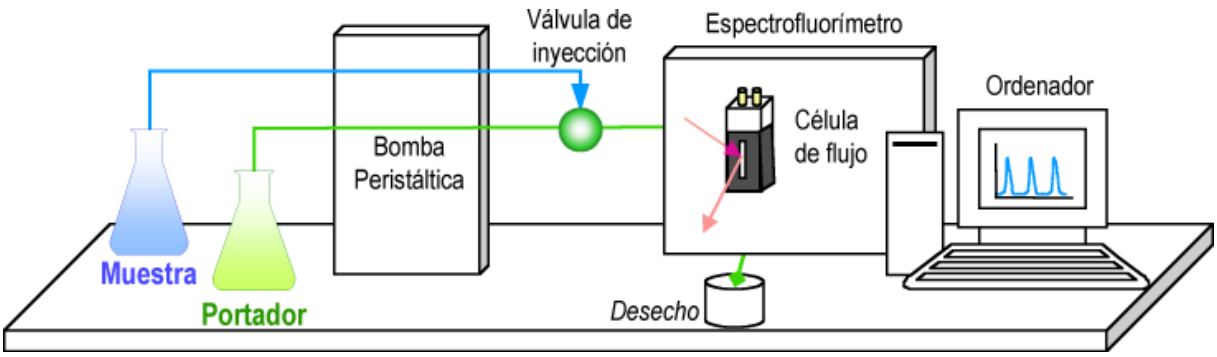


Figura V.9. Configuración FIA de los sensores luminiscentes (monoparámetro y multisensor para la determinación de pesticidas)

Para los **sensores monoparámetro**, el flujo del portador, (una disolución amortiguadora HAcO/NaAcO de pH 4.0, o bien una disolución acuosa de HCl a pH 2.0, para las determinaciones de amilorida y triamtereno respectivamente) transporta el bolo de muestra hasta ponerlo en contacto con la microzona activa del sensor. En estos casos el propio portador (convenientemente seleccionado) es capaz de eluir completamente el analito de la zona sensora regenerando de esta forma el sensor y dejándolo preparado para nuevas inyecciones de muestra.

El **sensor triparámetro** para la determinación de pesticidas, emplea también esta configuración puesto que no se pretende una separación previa de los analitos on-line, sino que se realizará posteriormente un tratamiento de los datos por el método

de mínimos cuadrados parciales (PLS). En este caso el flujo de portador, una disolución de metanol en agua desionizada al 20% (v:v), transporta el bucle de muestra compuesta por una disolución mezcla de los tres analitos, hacia la célula de flujo donde se retiene transitoriamente dando su señal analítica, que será una mezcla de las señales correspondientes a los tres analitos objeto de estudio. El propio portador es capaz de eluir los analitos retenidos en el soporte sólido aunque lentamente, y para agilizar el proceso se empleó una disolución eluyente algo más concentrada (MeOH en agua al 50% en volumen).

En el caso del **sensor biparámetro** para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina, el sistema FIA empleado consiste también en una configuración monocanal, sin embargo en este caso aparece un nuevo elemento: una minicolumna empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida. Esta minicolumna permite la retención transitoria de uno de los analitos, tiamina en este caso, permitiendo así la determinación de piridoxina sin interferencias.

El portador está constituido por la disolución amortiguadora ácido cítrico-citrato sódico 0.1 M a pH 3.0. Este portador actúa, además, como eluyente para la piridoxina cuya cinética en el proceso de fijación-elución es más rápida, por lo que este analito pasa por la precolumna sin apenas retenerse, mientras que la tiamina se retiene fuertemente en ella. Una vez ha sido eluída la piridoxina, por el propio portador, de la microzona sensible del sensor, se selecciona el eluyente, la disolución tampón ácido acético-acetato sódico 0.4 M a pH 4.8, mediante el giro de la válvula de selección, de forma que puede eluir la tiamina de la precolumna y transportarla hacia la célula de flujo para el desarrollo de su señal transitoria, pues la disolución tampón la eluye de la zona sensora.

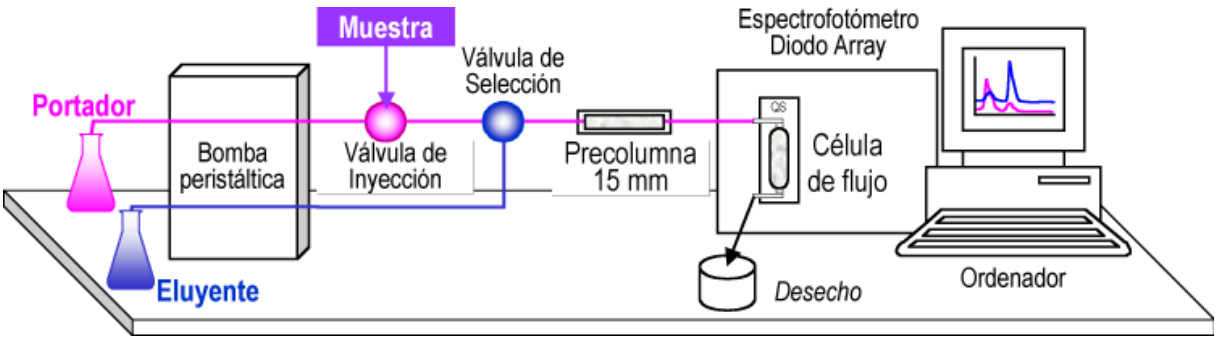


Figura V.10. Esquema FIA empleado en el sensor biparámetro

En los **multisensores espectrofotométricos** propuestos también se incluye la minicolumna empaquetada con el mismo soporte sólido que el usado en la zona sensora, en este caso, sílice-C_{18}, asimismo es necesario un canal adicional de eluyente que funciona de portador para el último de los analitos en abandonar la precolumna. Este portador/eluyente se conecta al sistema a través de una segunda válvula de selección, que permite elegir cuál de los eluyentes pasa a través de la columna.

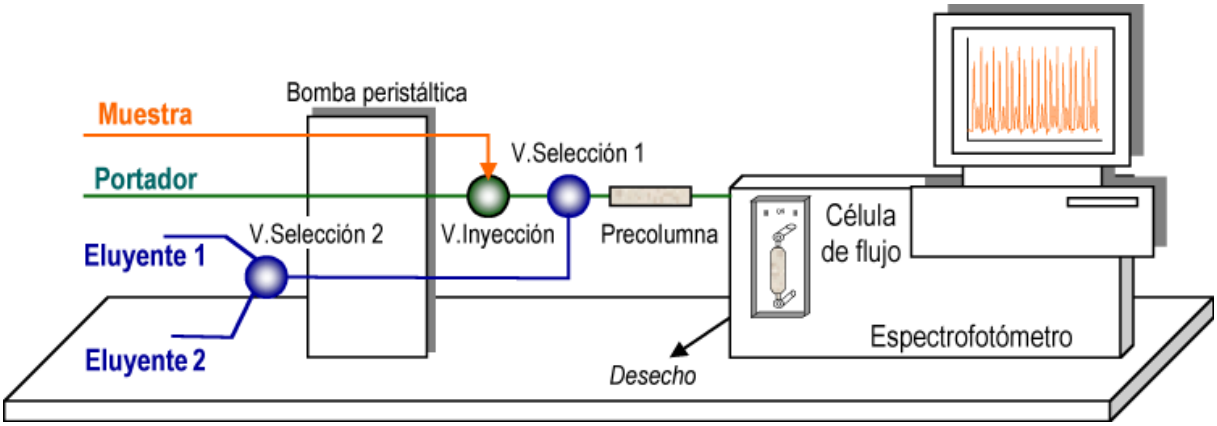


Figura V.11. Sistema diseñado para los sensores multiparámetro espectrofotométricos

En estos sensores el sistema que discrimina la cinética de los procesos de retención-elución es diferente en cada caso, para la determinación de PCT-CF-PFZ, el factor que favorece la retención-elución secuencial de los analitos en la precolumna es el porcentaje de metanol presente en el eluyente, sin embargo en la determinación de PCT-ASA-CF la secuenciación está influenciada por el pH, ambos casos se estudiarán más ampliamente en los apartados correspondientes.

El procedimiento experimental comienza cuando un volumen perfectamente conocido de muestra, conteniendo los tres analitos, se inserta en la corriente de portador. Al llegar a la precolumna dos de los analitos, CF y PFZ, en el primer caso, y ASA y CF en el segundo, son retenidos en ella, mientras que el PCT es transportado por el propio portador, sin apenas retenerse hacia la célula de medida, donde se desarrolla su señal analítica.

Girando una primera válvula de selección, se elige el eluyente que debe desorber convenientemente uno de los analitos, CF (con 10% MeOH) y ASA (NaAcO/HAcO pH 4.8), respectivamente, y lo transporta hacia la zona sensora midiéndose su señal analítica transitoria. A continuación, girando la segunda válvula de selección, otra disolución pasa a través del sistema eluyendo el último de los analitos de la precolumna, PFZ (con 50% MeOH) o CF (20% MeOH) y lo lleva hacia la zona de medida, desarrollándose su señal (también transitoria). Estas últimas disoluciones portadoras regeneran completamente la zona sensora así como la precolumna. Finalmente las válvulas se giran hacia su posición inicial quedando el sistema preparado para próximas inyecciones.

4. VARIABLES EXPERIMENTALES

En el desarrollo de los sensores espectroscópicos en flujo continuo se estudian una serie de variables experimentales que se clasifican en cuatro bloques fundamentales.

- *Variables de la unidad de retención-detección*
- *Variables químicas*
- *Variables del sistema FIA*
- *Variables instrumentales*

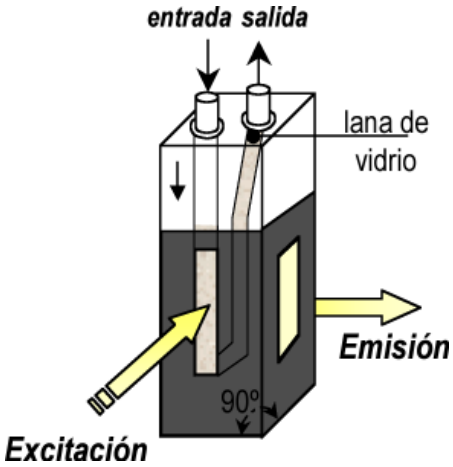
4.1. Variables de la unidad de retención-detección

4.1.1. Características de la célula de flujo

La célula de flujo es una parte esencial del sistema en flujo continuo porque contendrá la fase sólida en la que se produce la preconcentración y separación de los analitos, integrada con la detección.

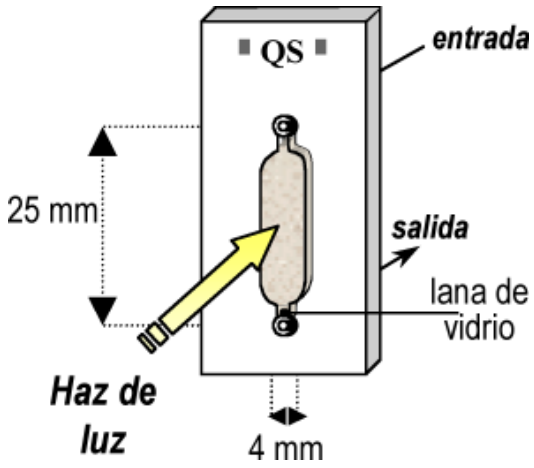
Como característica general, el camino óptico no debe ser superior a 2 mm para evitar que la absorbancia o IRF de la línea base sea demasiado alta, lo que provocaría dificultades en la detección. Por otra parte, el depósito interno de la célula de flujo, que ha de albergar el soporte sensor, debe ser lo menor posible con objeto de incrementar la sensibilidad, ya que el empleo de grandes cantidades de soporte sólido provoca una disminución de la señal, además de un aumento del tiempo de elución.

Es importante así mismo tener en cuenta el sistema de detección que se va a emplear en cada caso, que condicionará la estructura geométrica de la célula de flujo, para los sensores con **detección fluorimétrica** la célula tendrá forma de prisma rectangular de base cuadrada, para posibilitar la emisión en un ángulo de 90º respecto a la excitación incidente.



Tipo de detección	FLUORIMÉTRICA
Célula	Hellma 176.052 QS
Paso óptico	1.5 mm
Volumen interno	25 μl

La célula empleada en **detección fotométrica** es más plana puesto que la radiación se recoge en la misma dirección en que incide.



Tipo de detección	FOTOMÉTRICA
Célula	Hellma 138 QS
Paso óptico	1.0 mm
Volumen interno	50 μl

4.1.2. Naturaleza del soporte sólido

La utilización de un soporte sólido en la zona de detección es la clave de los sensores espectroscópicos en flujo. Dicho soporte retiene temporalmente los analitos en esa zona favoreciendo una preconcentración que aumenta la sensibilidad y selectividad del método. La elección del soporte sólido debe conjugar dos factores, la naturaleza química de los analitos que pretendemos retener sobre él (que condicionará en gran parte el tipo de soporte) y la transparencia del propio soporte en la zona del espectro en que se pretende trabajar en cada caso.

En general para los analitos de naturaleza iónica, susceptibles de ser retenidos sobre resinas cambiadoras de iones, emplearemos soportes tipo Sephadex ya que la naturaleza aromática de los cambiadores iónicos tipo Dowex los hace muy poco transparentes en la zona UV del espectro. Estos soportes pueden ser de ácido o base fuerte o débil. Se seleccionó la resina de ácido fuerte Sephadex SP C-25, con un tamaño de partícula de 40-120 μm, para analitos catiónicos. En los analitos de naturaleza no iónica es necesario emplear un gel de adsorción y la silicagel C_{18} de tamaño de partícula entre 55-105 μm, es la más empleada.

Lógicamente, en el caso de los sensores monoparámetro únicamente interesa la retención transitoria de un analito, por lo que se elegirá un soporte sólido de acuerdo con la naturaleza de dicho analito. Sin embargo, para los sensores multiparámetro, hay que conjugar la retención de varios analitos, que pueden ser de muy diferente naturaleza química, por ello será necesario seleccionar un soporte sólido que permita la retención transitoria de dichos analitos, así como que proporcione una buena sensibilidad para todos ellos.

También hay que tener en cuenta que en los multisensores, como se comentó previamente, se utilizó una precolumna empaquetada con un soporte sólido, para una retención secuencial de los analitos que permita una discriminación temporal en su llegada a la célula de medida, es necesario seleccionar dicho material que, conjugado con el uso del portador y eluyente(s) adecuado(s) deberán conseguir el propósito perseguido. En función de la naturaleza de los analitos, se emplearán

también resinas intercambiadoras o gel de sílice. Puesto que los analitos retenidos en la columna también deben ser retenidos en el soporte sensor, lo más conveniente, si no han de emplearse reacciones derivadoras (como es el caso presente), es emplear en la precolumna el mismo tipo de soporte que se utiliza en el sensor.

A continuación se resumen los soportes empleados en cada sensor:

Tabla V.1. Soportes sólidos empleados

SENSOR	SOPORTE SÓLIDO	
	Precolumna	Célula de flujo
Amilorida	-	Sephadex SP C-25
Triamtereno	-	Sephadex SP C-25
B_1-B_6	Sephadex SP C-25	Sephadex SP C-25
PCT-CF-PFZ	Silicagel C_{18}	Silicagel C_{18}
PCT-ASA-CF	Silicagel C_{18}	Silicagel C_{18}
NFT-OPP-TBZ	-	Silicagel C_{18}

4.1.3. Nivel de soporte sólido: célula de medida y precolumna

El nivel de soporte sólido en la célula de flujo viene determinado por la geometría del haz de luz del instrumento que se utiliza en la detección. Es necesario que la zona en la que incide el haz de luz esté completamente rellena de soporte para asegurar que la medida se realiza en fase sólida. En todos los casos rellenamos la célula de flujo hasta una altura suficiente para que dicho haz incida sobre la zona sensora, con unos mm por encima del límite superior del mismo, evitando niveles mayores por las razones antes descritas.

En esta Memoria se presentan tres sistemas para la resolución de mezclas binarias y ternarias; en estos casos, utilizando únicamente el soporte sólido empaquetado en la célula de flujo, las señales de los analitos se desarrollan al mismo tiempo haciendo imposible su determinación. Por lo general los analitos presentan un comportamiento diferente en su cinética de retención-elución en su paso por la fase sólida, esta diferencia puede potenciarse mediante la utilización de una precolumna rellena del mismo soporte sólido que la célula de flujo, consiguiendo de esta manera que los analitos alcancen la zona sensora de forma consecutiva, permitiendo su detección sin solapamiento de señales.

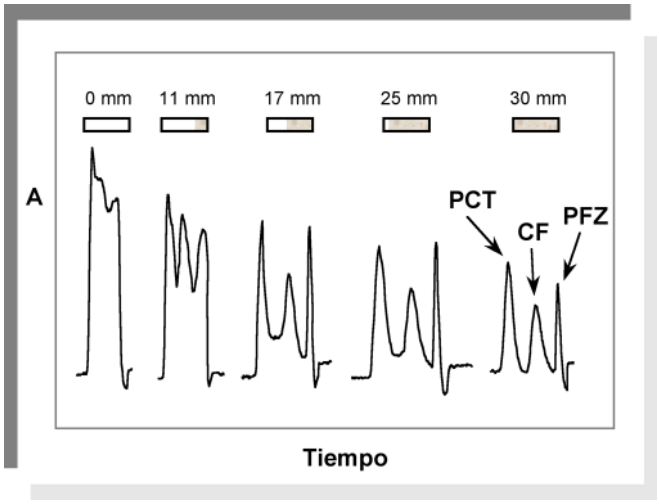


Figura V.12. Estudio de la influencia de la longitud de la precolumna en la separación de paracetamol, cafeína y propifenazona.

La *Figura V.12* muestra el estudio de la influencia de la longitud de la precolumna en la resolución de la mezcla ternaria PCT-CF-PFZ. Se puede observar que utilizando únicamente soporte en la célula de flujo (es decir, sin precolumna) las señales se solapan impidiendo la resolución de la mezcla, sin embargo aumentando la cantidad de soporte sólido en la columna se van separando las señales de los analitos, llegando finalmente a separarse completamente para una longitud de precolumna de 30 mm.

Este estudio se realizó de forma muy similar para el sensor biparámetro y para el otro multisensor espectrofotométrico, y se eligió siempre la longitud de precolumna mínima que permitiese la separación completa de los analitos, pues tomando valores superiores aumenta el tiempo de pico, disminuyendo innecesariamente la frecuencia de muestreo. Los valores seleccionados son los siguientes,

- *Sensor biparámetro (tiamina-piridoxina):* ***15 mm***
- *Sensor multiparámetro 1 (paracetamol-cafeína-propifenazona):* ***30 mm***
- *Sensor multiparámetro 2 (paracetamol-ácido acetilsalicílico-cafeína):* ***40 mm***

4. 2. Variables químicas

Como variables químicas se estudian la influencia que producen el pH, naturaleza y concentración de portador y eluyentes, en cada caso, sobre la señal analítica. También es necesario estudiar la influencia del pH de la muestra.

4.2.1. Influencia del pH del portador y del eluyente

El pH de las disoluciones portadoras y eluyentes puede influir en gran medida debido a la posible ionización de los analitos favoreciendo o perjudicando la retención

sobre el soporte sólido, en general la influencia más significativa de esta variable se presenta en los sistemas con analitos de naturaleza iónica y con soportes sólidos de intercambio catiónico o aniónico.

El estudio de esta variable es de gran importancia puesto que permite elegir un valor de pH al cual se obtenga la máxima retención de los analitos en la fase sólida obteniéndose de esta manera una mayor sensibilidad. También es posible emplear el pH como factor discriminante en la retención y/o elución de los analitos en los sensores multiparámetro.

La influencia del pH del portador se estudia manteniendo constantes las condiciones del sistema, tales como caudal, volumen de inyección y concentración de muestra. Se preparan disoluciones del respectivo portador a diferentes valores de pH, mediante adición de la cantidad necesaria de HCl o NaOH, 0.2 M. Al inyectar la muestra se registra la señal analítica y se comparan los valores de las señales obtenidas.

En los sensores monoparámetro para ***amilorida*** y ***triamtereno***, se realizó el estudio para seleccionar únicamente el pH óptimo para obtener una máxima señal analítica. Los resultados obtenidos fueron los siguientes:

- **Triamtereno**: la señal analítica sufre una pequeña disminución, prácticamente despreciable, al aumentar el pH, se seleccionó pH 2.0 como óptimo.

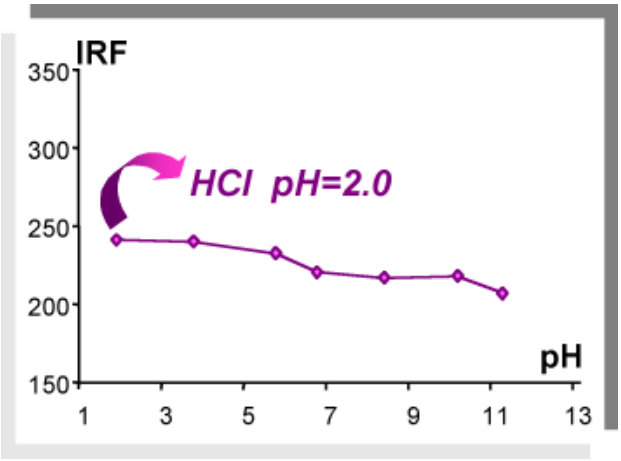


Figura V.13. Estudio de la influencia del pH del portador para el sensor monoparámetro para la determinación de triamtereno

- **Amilorida**: La máxima intensidad relativa de fluorescencia se encontró en el intervalo de pH 2-4. Este intervalo exigía la utilización de una disolución reguladora de pH. Se ensayaron dos disoluciones amortiguadoras y finalmente se seleccionó una disolución de tampón acético/acetato a pH 4.0, 0.4M.

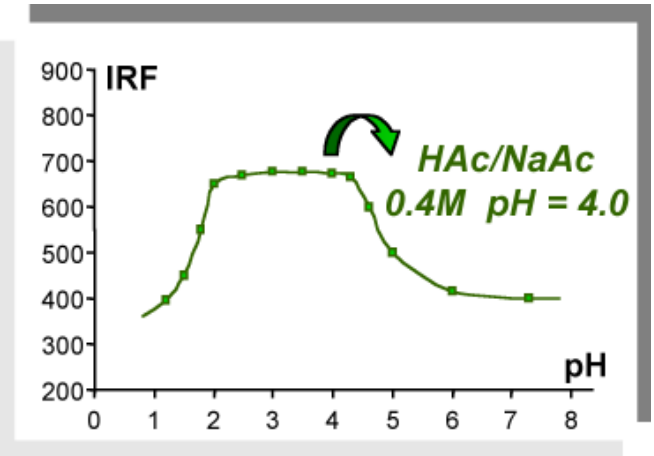


Figura V.14. Estudio de la influencia del pH sobre la IRF de amilorida.

En el caso del sensor biparámetro para la determinación simultánea de ***tiamina-piridoxina***, se utiliza como señal analítica la absorbancia a las longitudes de onda de máxima absorción para cada analito, 255 nm para la tiamina y 293 nm para la piridoxina. El estudio de la influencia del pH se realiza a las dos longitudes de onda, de esta forma, obtenemos el intervalo de pH para el cual cada analito tiene su máxima señal analítica.

En la *Figura V.16* se representan los valores de absorbancia obtenidos para cada analito, tanto a 255 nm como a 293 nm. Se seleccionó, pH 3.0 para la determinación de piridoxina y pH 4.8 para la de la tiamina.

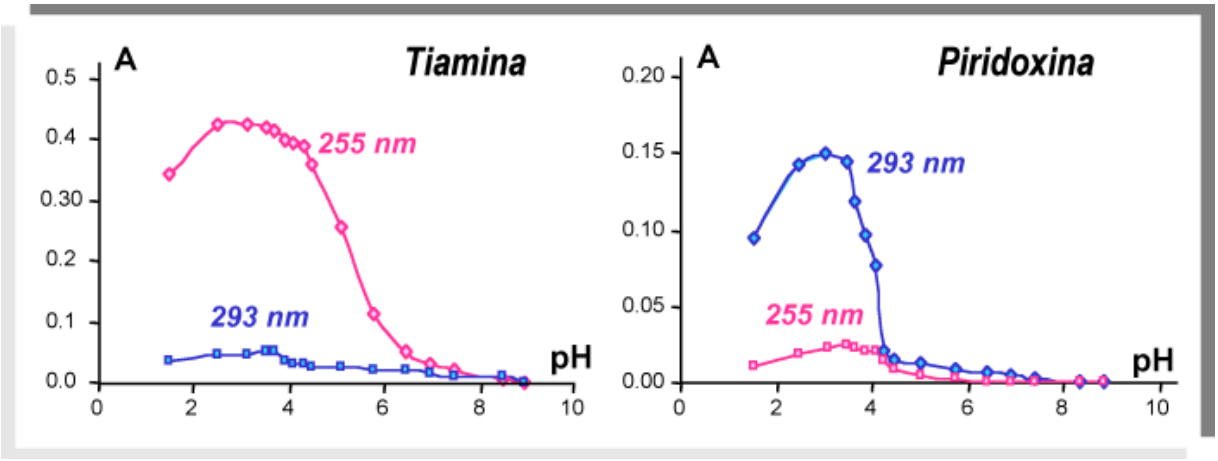


Figura V.16. Estudio de la influencia del pH para el sensor biparámetro a las longitudes de onda de máxima absorción de tiamina y piridoxina.

En el sensor triparámetro de ***paracetamol-cafeína-propifenazona***, las señales de cafeína y propifenazona no se ven afectadas con el cambio de pH coherentemente con su estructura no ionizable, sin embargo la señal del paracetamol decrece significativamente a partir de pH 10 por el proceso de desprotonación (pK_a=9.5).

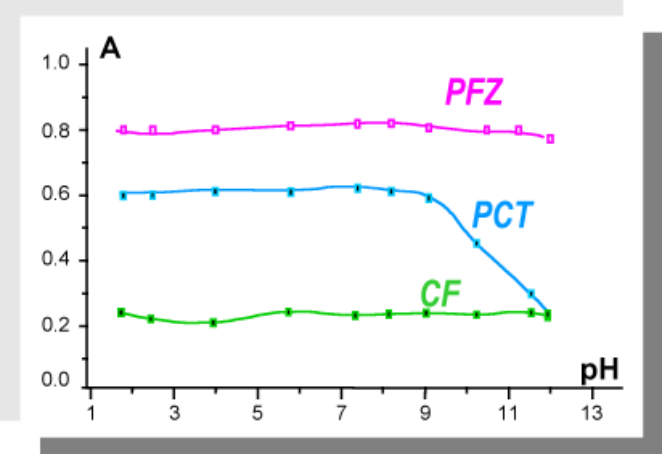


Figura V.17. Estudio de la influencia del pH para el sensor triparámetro para la determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona

Esta característica será muy útil en las muestras en las que la relación entre PCT y CF es tan elevada que no es posible determinarlos simultáneamente. Seleccionando un pH superior a 10 conseguimos disminuir la señal del PCT hasta hacerla similar a la de la CF. Por ello se seleccionan dos valores de pH, el propio del agua desionizada, cercano a 5.8, y 12.0 para las aplicaciones indicadas.

Para el sensor triparámetro de ***paracetamol-ácido acetil salicílico-cafeína***, la influencia del pH es clave puesto que su valor discrimina la retención de los analitos en la precolumna. Se observan dos casos:

- pH 1-2: El paracetamol se eluye de la precolumna y de la célula de flujo por el portador produciendo una señal transitoria. El ácido acetilsalicílico queda retenido temporalmente y la cafeína no se eluye hasta que se utiliza un portador metanólico.
- pH 3-10: En este intervalo de pH, el paracetamol y el ácido acetilsalicílico no se retienen en la precolumna y llegan a la célula de flujo simultáneamente impidiendo su determinación independiente. La cafeína sigue quedando retenida hasta el paso de un portador alcohólico.

A partir de estos resultados se eligió un primer portador consistente en una disolución acuosa a pH 2, que permita la determinación de paracetamol, empleando un pH superior, 4.8, para eluir el ácido acetilsalicílico de la precolumna permitiendo su determinación.

En el caso del sensor triparámetro para la determinación de ***α-naftol-o-fenilfenol-tiabendazol***, el estudio del pH indica que no existe ninguna variación significativa en las señales analíticas al utilizar disoluciones de diferentes pHs. Esto indica que no será necesario ajustar el pH de la disolución de portador.

4.2.2. Naturaleza y concentración de portador y eluyente

Como se indicó en los estudios del pH, debemos encontrar aquellas disoluciones portadoras que favorezcan las condiciones óptimas para cada sistema. En los sensores monoparámetro, interesa conjugar la retención, con la mayor sensibilidad posible y su compatibilidad con la máxima frecuencia de muestreo, sin embargo en los sensores multiparámetro es necesario, además, favorecer la diferencia en la cinética del proceso de retención-elución de los analitos.

También es necesario tener en cuenta que la naturaleza del soporte sólido condiciona las disoluciones empleadas, así para los soportes iónicos, se utilizarán disoluciones acuosas, mientras que para los soportes apolares como la C_{18} es necesario emplear disoluciones alcohólicas.

La forma más adecuada de llevar a cabo este estudio es elegir disoluciones amortiguadoras a los pHs seleccionados en el estudio anteriormente descrito, y utilizarlas como portador en sucesivas inyecciones de una muestra de concentración constante, se comparan las señales analíticas obtenidas en busca de aquella disolución que actuando como portador proporciona la máxima sensibilidad, esto es, la máxima señal analítica en cada caso. Una vez seleccionada la naturaleza de la disolución de portador, es necesario realizar un estudio de la concentración de ésta que proporciona asimismo mayores señales de absorbancia o fluorescencia en cada caso.

Como se ha indicado anteriormente en el caso de los sensores monoparámetro, el propio portador actúa como eluyente, regenerando el sensor tras el desarrollo de la señal transitoria correspondiente a la muestra, lo que permite nuevas inyecciones, este es el caso más sencillo. Este caso es también el del multisensor para la determinación de pesticidas, donde una única disolución metanólica actuaba de portador y eluyente, si bien para acelerar el proceso de elución se utilizaba también una disolución más concentrada en MeOH. Para poder eluir completamente los analitos una vez desarrollada la señal.

Sin embargo, en el caso de los multisensores (bi o multiparámetro), la selección de portador y eluyente es algo más complicada, puesto que son necesarios uno (sensor biparámetro) o más (sensores triparámetro) eluyentes para desorber los analitos de la precolumna, así como transportarlos hacia la zona de medida. El procedimiento consiste en que el portador transporta uno de los analitos hacia la célula de medida, quedándose retenidos el/los otro/s en la precolumna, posteriormente se selecciona, mediante giro de una válvula de selección, el primer eluyente, que eluirá el segundo analito de la precolumna y lo transportará hacia la microzona sensora, permitiendo su determinación. Finalmente, en el caso de multisensores triparámetro, tendremos al menos un analito retenido aún en la precolumna que es necesario desorber, para llevarlo a la célula de flujo y poder medir su señal analítica, para ello se selecciona un nuevo eluyente, mediante giro de otra válvula de selección. El procedimiento seguido implica la necesidad de buscar portador/ eluyentes que discriminen a su vez entre los analitos retenidos en la precolumna, obteniendo máxima señal analítica una vez alcancen la zona de medida.

Para el sensor biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina, se probaron una serie de disoluciones reguladoras a los pHs seleccionados (3.0 para piridoxina y 4.8 para tiamina) y se dio la circunstancia que únicamente mediante la conjunción de una disolución portadora de ácido cítrico-citrato sódico de pH 3.0, y una disolución eluyente de ácido acético-acetato sódico de pH 4.8, se conseguía la retención y posterior elución de tiamina en la precolumna, permitiendo la llegada secuencial de los analitos a la célula de medida.

En los casos de los multisensores para la determinación de analgésicos y cafeína, la propiedad que discrimina la retención-elución de la precolumna es diferente aunque en ambos casos está basada en la diferente naturaleza de los analitos. Para la determinación de PCT-CF-PFZ, el PCT es transportado por una disolución acuosa a través de la precolumna sin apenas ser retenido, sin embargo los otros dos analitos, CF y PFZ, quedan retenidos en la precolumna, dada su naturaleza apolar, siendo la concentración metanólica del eluyente la que discrimina la elución secuencial entre cafeína y propifenazona.

Sin embargo en la determinación de PCT-ASA-CF, es el valor del pH el que permite la discriminación entre PCT y ASA, haciendo que el segundo quede transitoriamente retenido en la precolumna a pHs bajos, permitiendo su separación del PCT, y eluido de ésta a pHs superiores (este hecho se subrayó en el estudio de la influencia del pH). Finalmente para eluir la CF es necesario nuevamente el empleo de una disolución metanólica. A continuación se resumen las disoluciones portador y eluyente seleccionadas en cada caso.

Tabla V.2. Resumen de las disoluciones portador/eluyente empleadas

	Portador	*Eluyente 1*	*Eluyente 2*
AML	NaAcO/HAcO, 0.4 M pH 4.0	-	-
TAT	NaCl-aq, 0.08 M pH 2.0	-	-
B_1-B_6	NaCitO/HCitO, 0.1 M pH 3.0	NaAcO/HAcO, 0.4 M pH 4.8	-
PCT-CF-PFZ	1) H_2O pH 5.8 2) NaOH pH 12	MeOH:H_2O(v:v) 10%	MeOH:H_2O(v:v) 50%
PCT-ASA-CF	HCl aq pH 2	NaAcO/HAcO, 0.1 M pH 4.8	MeOH:H_2O(v:v) 20%
NFT-OPP-TBZ	MeOH:H_2O(v:v) 20%	(MeOH:H_2O(v:v)50%)	-

4.2.3. Influencia del pH de la muestra

Generalmente cuando se emplean volúmenes de inyección pequeños, la influencia del pH de la muestra es prácticamente despreciable, y no se producen variaciones significativas en las señales de los analitos. De todas formas esta fue una variable estudiada en los sistemas que se presentan para confirmar esta hipótesis así como comprobar que se cumple aun cuando empleamos volúmenes mayores.

En todos los casos se corroboró que no se producen variaciones significativas por lo que para mayor comodidad se mantuvieron en cada caso los pHs propios de las muestras una vez preparadas por disolución para ser inyectadas.

4.3. Variables FIA

Una vez seleccionadas las variables químicas, se lleva a cabo el estudio de la influencia de las variables del sistema de inyección en flujo utilizado, siendo éstas, caudal y volumen de muestra inyectado.

4.3.1. Caudal

La modificación del caudal se realiza mediante el incremento de la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Para obtener su valor en ml min^{-1} basta con medir el tiempo que emplea un determinado volumen de disolución en salir del sistema hacia el deshecho, manteniendo fijas las variables químicas anteriormente optimizadas.

En general, un aumento de la velocidad de giro de la bomba, supone el aumento del caudal así como una disminución de las señales analíticas puesto que los analitos se desplazan más rápidamente por el sistema y la altura de la señal transitoria es menor.

La selección del caudal de trabajo se realiza comparando la influencia que el caudal ejerce sobre la señal analítica frente a la ejercida sobre la frecuencia de muestreo, de esta manera se busca una solución de compromiso que ofrezca una señal analítica elevada y una frecuencia de muestreo adecuada (lo más alta posible).

A modo de ejemplo se muestra la *Figura V.18* que representa el estudio de la influencia del caudal para el sensor desarrollado para la determinación de *triamtereno*.

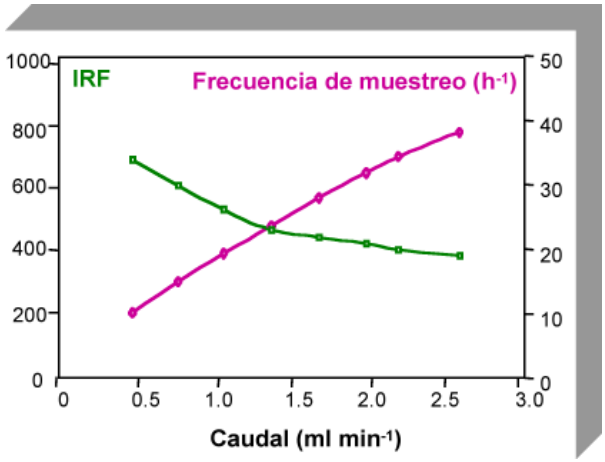


Figura V.18. Estudio de la influencia del caudal sobre la IRF y la frecuencia de muestreo para el sensor monoparámetro para la determinación de triamtereno.

En este caso se eligió un caudal de 2.0 ml min^{-1} como solución de compromiso pues presenta una disminución en la señal de un 39% frente al aumento en 78% en la frecuencia de muestreo (respecto del valor correspondiente al caudal más bajo ensayado).

Así se seleccionaron los caudales óptimos que se resumen a continuación:

- Amilorida: 1.54 ml min^{-1}
- Triamtereno: 1.98 ml min^{-1}
- Tiamina-Piridoxina: 0.95 ml min^{-1}
- PCT-CF-PFZ: 1.24 ml min^{-1}
- PCT-ASA-CF: 1.42 ml min^{-1}
- NFT-OPP-TBZ: 1.55 ml min^{-1}

Las frecuencias de muestreo oscilaban entre 9 y 30 muestras a la hora.

4.3.2. Volumen de muestra inyectado

El volumen de inyección puede modificarse empleando bucles de distinta longitud y por ello de distinto volumen, midiéndose la señal analítica que produce una misma concentración de analito.

Al aumentar el volumen de muestra inyectado se produce un aumento de la señal analítica, esto es, de la sensibilidad, debido a la fijación de una mayor cantidad de analito sobre la misma masa de soporte sólido (microzona activa). Este aumento es lineal, hasta un volumen determinado, por encima del cual, la señal tiende a estabilizarse al aumentar el volumen, esto se debe, a que en las condiciones optimizadas lo fueron para un volumen determinado de inyección. Al crecer éste considerablemente, se debería disminuir el caudal para conseguir la retención de todo el analito, salvo que el coeficiente de distribución presente un valor suficientemente elevado. Este resultado es general en los sensores espectroscópicos en flujo.

La dependencia de la señal con el volumen aumenta la versatilidad del sensor puesto que permite trabajar con amplios intervalos de concentración de analito, simplemente variando el volumen de muestra inyectado. Como es de esperar, el aumento del volumen de inyección se traduce en una disminución de la frecuencia de muestreo.

El estudio de la influencia del volumen de muestra inyectado se realizó para todos los analitos de cada sensor por separado, en las condiciones de trabajo propuestas. El intervalo de volumen utilizado fue de 40 μl hasta 2500 μl. La dependencia lineal se observa en algunos casos para todo el intervalo estudiado mientras que en otros la señal analítica tiende a estabilizarse a partir de un determinado volumen de inyección, debido a lo explicado anteriormente.

Como ejemplo se muestra la *Figura V.19*, que representa los resultados obtenidos para el sensor triparámetro de paracetamol (PCT), ácido acetilsalicílico (ASA) y cafeína (CF), en ella se observa que la señal analítica, absorbancia en este caso, es linealmente dependiente del volumen de inyección hasta un volumen de 1000 μl para el PCT y ASA y hasta 2000 μl en el caso de la CF (sólo se ha representado hasta 1500μl).

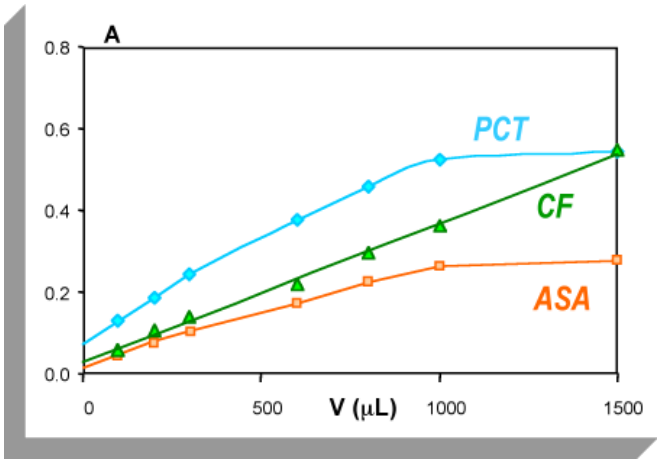


Figura V.19. Linealidad de la absorbancia con el incremento de volumen para el multisensor para la determinación de PCT-ASA-CF

Una vez establecido el intervalo de volumen para el que se cumple la linealidad es necesario seleccionar uno o más volúmenes de inyección para los que posteriormente se calibrará el sensor correspondiente, el volumen seleccionado siempre debe tomarse con el compromiso de una sensibilidad adecuada a la concentración de las muestras a las que se pretende aplicar, así como de una frecuencia de muestreo aceptable.

La *Tabla V.3* resume las ecuaciones de la dependencia de la señal analítica con el volumen inyectado, los valores límite para los que se cumple la ecuación y los volúmenes seleccionados para trabajar con cada sensor.

Tabla V.3. Influencia del volumen de muestra inyectado

	Ec. Lineal (v, μl)	*Intervalo de volumen*	*Volumen(es) seleccionado(s)*
Amilorida	RFI = 46 + 0.215 v r = 0.9993	40-1500 μl	100 y 600 μl
Triamtereno	RFI = 110 + 0.595 v r = 0.9982	40-2000 μl	300 y 1000 μl
S. Biparámetro			
Piridoxina	A = 0.0929+ $5.17 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9979	40-1500 μl	40 y 1000 μl
Tiamina	A = 0.0582+ $3.17 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9921	40-1500 μl	
S. Multiparámetro 1			
Paracetamol	A = 0.13+ $3.3 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9997	40-1500 μl	
Cafeína	A = 0.03 + $3.1 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9963	40-2500 μl	200 μl
Propifenazona	A = 0.25 + $4.0 \cdot 10^{-4}$ v r = 1	40-2500 μl	
S. Multiparámetro 2			
Paracetamol	A = 0.11 + $4.0 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9959	40-1000 μl	
Acetilsalicílico	A = 0.037 + $2.0 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9984	40-1000 μl	200 μl
Cafeína	A = 0.026 + $3.0 \cdot 10^{-4}$ v r = 0.9972	40-2000 μl	
S. Multiparámetro 3			
α-Naftol	IRF = 70 + 0.125 v r = 0.9897	40-750 μl	
o-Fenilfenol	IRF = 42 + 0.213v r = 0.9952	40-1000μl	500 μl
Tiabendazol	IRF= 34 + 0.314 v r = 0.9963	40-1000μl	

4.4. Variables instrumentales

Aquellos sensores cuyo sistema de detección es fluorimétrico requieren la optimización de dos variables instrumentales. Éstas son la anchura de las 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 intensidad relativa de fluorescencia (IRF) a diferentes valores de anchura de rendija. Cada estudio se realiza fijando la anchura de una de las rendijas, es decir, para estudiar como varía la fluorescencia con la rendija de excitación se fija la de emisión y viceversa.

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 rendijas de excitación y altas de emisión, teniendo en cuenta que si se abren mucho puede aumentar la señal de fondo. Este estudio se realizó para los tres sensores con detección luminiscente, y a continuación se muestra el estudio realizado para uno de los analitos, tiabendazol. En la

Figura V.19 se observa un aumento considerable de la señal al aumentar la anchura de la rendija de excitación. Se comprobó que este aumento de la IRF se debía a la señal de fondo en lugar de al analito, por ello se seleccionó un valor menor para el que la relación entre la señal del analito y el fondo fuera menor.

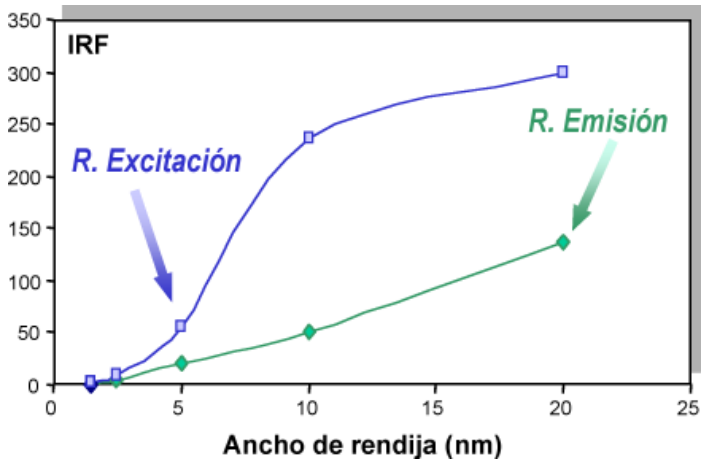


Figura V.19. Estudio de la influencia de la anchura de rendijas para tiabendazol

En la *Tabla V.4* se muestran los valores de anchura seleccionados para las rendijas de excitación y emisión para cada uno de los sensores.

Tabla V.4. Rendijas de excitación y emisión

SENSOR	R. Excitación	R. Emisión
Amilorida	2.5 nm	17 nm
Triamtereno	10 nm	20 nm
α-Naftol-o-Fenilfenol-Tiabendazol	5 nm	20 nm

En cuanto a la velocidad de barrido del espectro es de 240 nm min^{-1} para los sensores monoparámetro y 1200 nm min^{-1} para el sensor triparámetro con tratamiento por PLS, que son los valores por defecto del instrumento utilizado en cada caso. El voltaje del fotomultiplicador fue 700 V en todos los casos.

5. CALIBRACIÓN DE LOS SENSORES. PARÁMETROS ANALÍTICOS

El proceso de calibración es trascendental. Sólo si se aplican buenos métodos de calibración podrán obtenerse resultados satisfactorios en el análisis. La calibración puede ser univariante y multivariante.

Los métodos tradicionales de análisis instrumental que usan calibración univariante emplean relaciones sencillas entre los datos independientes, entendidos como los valores de concentración, y los datos dependientes, siendo éstos las señales espectrales. Típicamente, las ecuaciones de calibración relacionan estos dos tipos de datos. En esta Memoria se emplea este tipo de calibración en cinco de los sensores desarrollados. En el último se sigue una calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales.

5.1. Calibración Univariante

Los métodos univariantes son aquellos que resuelven una única ecuación basada en un único valor medido, es decir existe un valor de calibración por cada muestra.

Uno de los modelos más simples es la regresión lineal. En este modelo, la señal analítica, absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia, se relaciona con las cantidades de los constituyentes mediante una ecuación polinómica de primer grado. La técnica más empleada es la *regresión por mínimos cuadrados*, que se emplea para resolver la ecuación del modelo relacionando los datos de la señal analítica con cantidades conocidas de los constituyentes.

Una vez seleccionadas las condiciones óptimas de trabajo para cada sensor, es necesario comprobar la existencia de una relación lineal entre la señal analítica, absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia según los casos, y la concentración de cada uno de los analitos a determinar. Para ello se construyen las funciones de calibrado que consisten en representaciones de parejas de datos, de señal analítica y concentración. Para obtener los datos necesarios se preparan una serie de disoluciones patrón (ya sea, un analito individual o una mezcla) de diferente concentración, y se inyectan en el sistema siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, de esta forma se registran las correspondientes señales analíticas.

A continuación se muestran las gráficas de calibrado (A: absorbancia, IRF: intensidad relativa de fluorescencia) obtenidas para cada uno de los sensores que se calibraron siguiendo este modelo. Asimismo se indican las ecuaciones obtenidas en cada caso.

1. Sensores Monoparámetros:

Los dos sensores monoparámetro propuestos para la determinación de amilorida y triamtereno respectivamente, se calibraron de forma univariante, empleando dos volúmenes de inyección de muestra en cada caso para ampliar el rango de posibles aplicaciones.

El sensor para la determinación de **Amilorida** se calibró para 100 µl y 600µl de muestra. Tal como se observa en la figura, se obtiene una buena linealidad, descrita por los coeficientes de correlación muy próximos a 1 en los dos casos. También se muestra un fiagrama obtenido en la calibración con el volumen de inyección de 100µl.

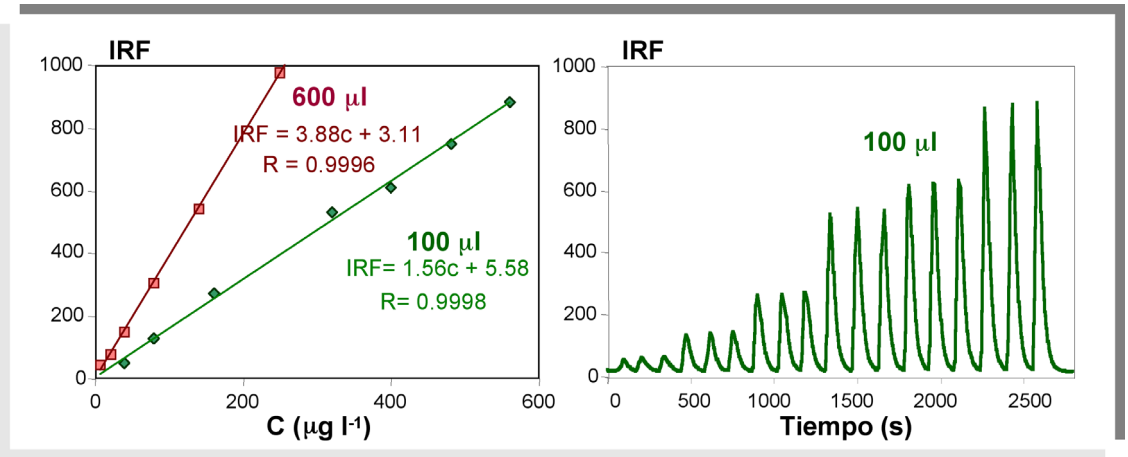


Figura V.20. Calibración para el sensor monoparámetro de amilorida, gráficas y ecuaciones. Fiagrama para 100µl.

La *Figura V.21* muestra las gráficas de calibración para **Triamtereno** para los dos volúmenes de inyección de muestra empleados, 300 µl y 1000 µl. Se observa que para el volumen superior se obtiene mayor sensibilidad, de acuerdo con lo expuesto con anterioridad, lo que facilita la aplicación del sensor en muestras en las que el triamtereno se encuentra en concentraciones muy bajas. A la derecha de las gráficas se muestra el fiagrama de la calibración para volumen de inyección de 300µl.

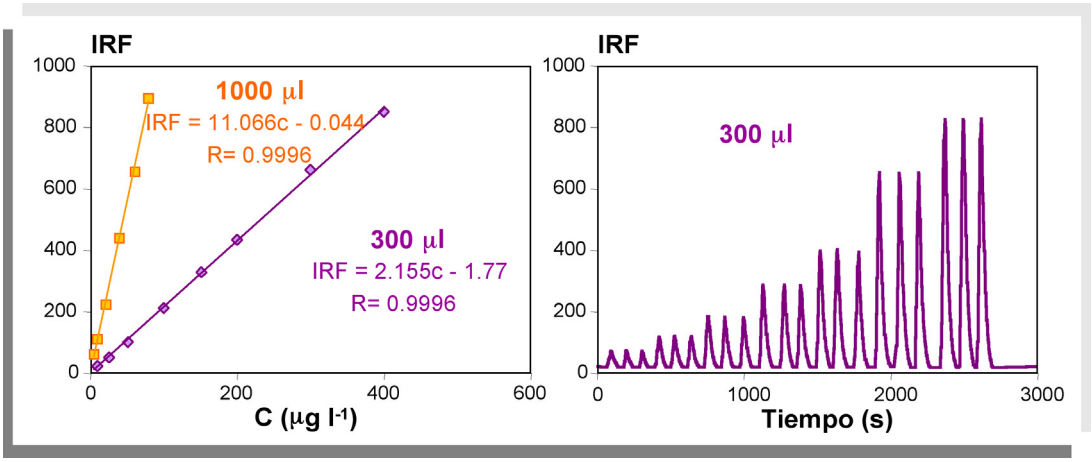


Figura V.21. Calibración para el sensor monoparámetro para triamtereno, gráficas y ecuaciones. Fiagrama para 300µl.

2. Sensor Biparámetro:

El sensor para la determinación de tiamina (B_1) y piridoxina (B_6) se calibró para dos volúmenes de muestra diferentes, 40 y 1000 μl., preparando muestras patrón que contuvieran diferentes concentraciones de ambos analitos. A continuación se muestran las gráficas obtenidas al representar la absorbancia a las longitudes de onda correspondientes en cada caso, 255nm para tiamina y 293 nm para piridoxina, frente a la concentración de analito.

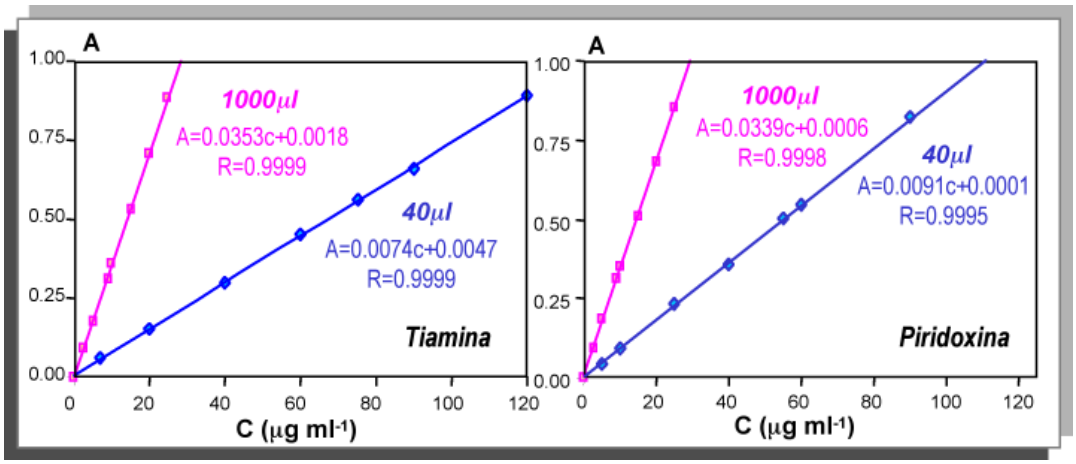


Figura V.22. Gráficas de calibración para el sensor biparámetro para tiamina y piridoxina.

El Rango dinámico lineal (RDL) se define como el intervalo de concentraciones para el que se cumple la linealidad entre la señal analítica y la concentración. Para este sensor, obtenemos que los RDL cuando el volumen de inyección es 40 μl son 7-130 μg ml^{-1} y 5-110 μg ml^{-1}, para tiamina y piridoxina respectivamente; cuando el volumen de inyección es de 1000 μl, el RDL es 2-30 μg ml^{-1} para ambos analitos.

3. Sensores Triparámetro Espectrofotométricos:

Los sensores que se proponen para la determinación de mezclas ternarias de analgésicos (paracetamol, PCT; propifenazona, PFZ y ácido acetilsalicílico, ASA) y cafeína (CF) se calibraron únicamente para un volumen de inyección que fue en ambos casos de 200 μl.

La señal analítica en este caso es la absorbancia de modo que hay que encontrar una relación lineal entre ella y la concentración de los analitos. Puesto que se pretende obtener un sensor para la determinación simultánea de tres analitos, se realizaron calibraciones simultáneas, es decir, se prepararon las disoluciones patrón conteniendo los tres analitos a distintas concentraciones y se inyectaron en el sistema como se ha indicado previamente.

Se muestra primero la *Figura V.23* que presenta parte del fiagrama obtenido al realizar la calibración para el sensor de ***paracetamol, cafeína y propifenazona***, así como las gráficas de calibrado obtenidas para cada uno de los analitos y sus

ecuaciones correspondientes (en el mismo color que la gráfica para facilitar su localización).

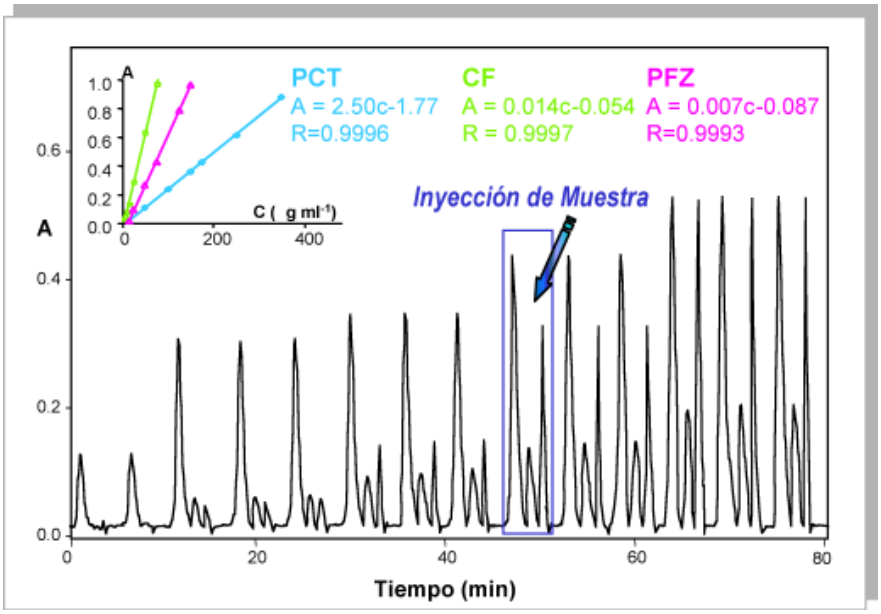


Figura V.23. Fiagrama de la calibración del sensor para PCT-CF-PFZ, figura interior, gráficas de calibración con las ecuaciones correspondientes.

En la figura aparece marcada la señal que corresponde a una inyección de muestra, compuesta por tres picos, correspondientes a los tres analitos determinados. A continuación se amplía esta zona para indicar cada unos de los analitos.

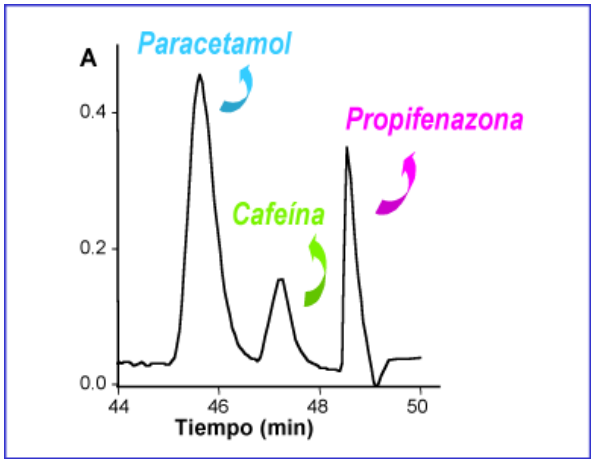


Figura V.23.b. Detalle del fiagrama, señal correspondiente a una inyección de muestra

Para este sensor ya se ha comentado la existencia de una diferencia importante entre las señales del PCT y la CF, que hace difícil su determinación simultánea en aquellos casos en los que la relación entre sus cantidades es muy elevada (44:1)

como ocurre en el caso de algunos preparados farmacéuticos. La elección de pH 12 para estos casos permite subsanar este problema, pero es necesario calibrar para este pH. Se da el caso de que aquellos fármacos en los que la relación PCT:CF es tan elevada, generalmente, no aparece la propifenazona como principio activo, de modo que no es necesaria la calibración de este analito para estos casos excepcionales, la *Tabla V.5* muestra los datos correspondientes a esta calibración adicional:

Tabla V.5. Calibración a pH 12.0 para el sensor PCT-CF

	PCT	CF
Intervalo dinámico lineal (μg ml^{-1})	50-750	4-60
Ecuación de calibración		
Ordenada en el origen	$-3.0\cdot10^{-3}$	$-2.0\cdot10^{-3}$
Pendiente (ml μg^{-1})	$1.3\cdot10^{-3}$	$1.5\cdot10^{-2}$
Coeficiente de correlación	0.9991	0.9995

Para el segundo sensor triparámetro para la determinación simultánea de ***paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína***, se procedió de un modo similar y se calibraron simultáneamente los tres analitos, obteniéndose las siguientes gráficas de calibrado, se muestran también las ecuaciones y los coeficientes de regresión.

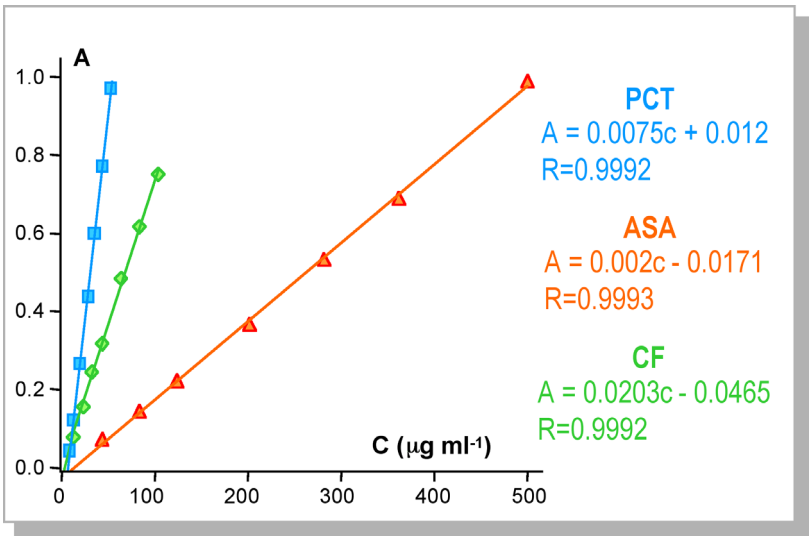


Figura V.24. Gráficas de calibración para el multisensor de PTC-ASA-CF

La *Figura V.25* siguiente muestra parte del fiagrama, a*bsorbancia vs tiempo*, obtenido en la calibración del sensor; se ha ampliado asimismo, los tres picos correspondientes a una inyección, señalándose los analitos a los que pertenecen.

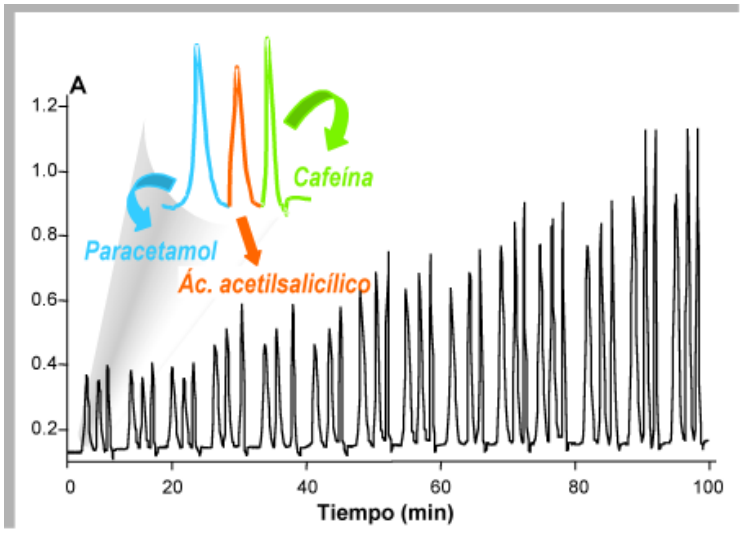


Figura V.25. Fiagrama del calibrado del multisensor de PCT-ASA-CF

La ***reproducibilidad*** de los sensores se evalúa preparando diez muestras, de igual concentración, que contienen el o los analitos correspondientes a cada sensor. Estas muestras son inyectadas en el sistema siguiendo el procedimiento experimental descrito para cada uno de ellos y se registra la señal analítica (absorbancia o intensidad relativa de fluorescencia en cada caso).

Un análisis estadístico de los datos proporciona la desviación estándar relativa (RSD) para cada sensor (*Tabla V.6*) y para cada uno de los volúmenes de inyección empleados. Como ejemplo, la *Figura V.26* muestra el fiagrama obtenido en el estudio de reproducibilidad del sensor biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina.

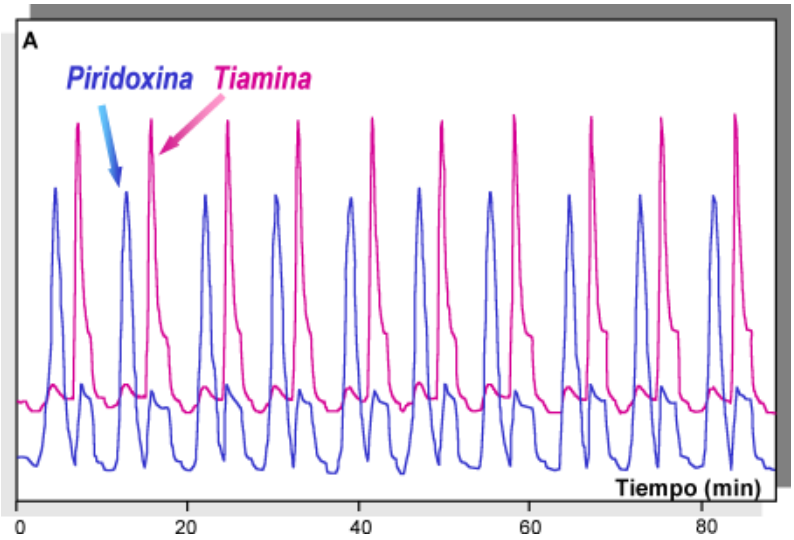


Figura V.26. Fiagrama del estudio de reproducibilidad del sensor biparámetro para tiamina y piridoxina.

Por el término de *límite de detección* se entiende la mínima concentración de analito, distinta del ruido de fondo, que puede detectarse. El *límite de cuantificación* es la mínima concentración de analito que puede determinarse con la precisión exigida. La concentración se relaciona con la señal analítica (Y) mediante la ecuación de la recta de calibrado, de modo que por definición[1,2] se admite:

$$\text{Limite de detección: } Y_L = Y_b + 3\sigma \;\rightarrow\rightarrow\; c_L = \frac{(Y_L - Y_b)}{m} = \frac{3\sigma}{m}$$

$$\text{Límite de cuantificación: } Y_Q = Y_b + 10\sigma \;\rightarrow\rightarrow\; c_Q = \frac{(Y_Q - Y_b)}{m} = \frac{10\sigma}{m}$$

Siendo,

Y_b: Señal analítica media obtenida para el blanco.

Y_L: Límite de detección (incertidumbre sobre el valor de Y cuando tiende a 0)

Y_Q: Señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

m: Pendiente de la recta de calibrado.

σ: Desviación estándar para el blanco.

c_L, c_Q: Límites de detección y cuantificación, respectivamente, en términos de concentración.

Para esta determinación se inyectaron diez muestras de blanco, es decir, muestras que contenían todos los componentes excepto los analitos. Se registra la señal analítica correspondiente y se aplican las definiciones propuestas. Los resultados obtenidos se encuentran en la *Tabla V.6*.

[1] Analytical Chemistry División, Spectrochimica Acta Part B, 242 (1978).

[2] ACS Commite on enviromental improvement, Anal. Chem., 52 (1980) 2242.

Tabla V.6. Parámetros analíticos

SENSOR	Volumen iny. (μl)	RSD (%) (n=10)	Límite Detección	Límite Cuantificación
Amilorida	100	0.59	0.92 μg l^{-1}	3.07 μg l^{-1}
	600	0.47	0.33 μg l^{-1}	1.10 μg l^{-1}
Triamtereno	300	0.87	0.95 μg l^{-1}	3.16 μg l^{-1}
	1000	0.42	0.17 μg l^{-1}	0.58 μg l^{-1}
S. Biparámetro				
Piridoxina	40	2.7	0.21 μg ml^{-1}	0.69 μg ml^{-1}
	1000	3.0	0.08 μg ml^{-1}	0.28 μg ml^{-1}
Tiamina	40	2.1	0.40 μg ml^{-1}	1.38 μg ml^{-1}
	1000	2.4	0.10 μg ml^{-1}	0.34 μg ml^{-1}
S. Multiparámetro 1 (pH 5.8)				
Paracetamol	200	3.5	7.5 μg ml^{-1}	25 μg ml^{-1}
Cafeína		3.7	0.65 μg ml^{-1}	2.2 μg ml^{-1}
Propifenazona		3.8	1.9 μg ml^{-1}	6.2 μg ml^{-1}
S. Multiparámetro 1 (pH 12.0)				
Paracetamol	200	3.1	12 μg ml^{-1}	40 μg ml^{-1}
Cafeína		2.7	0.9 μg ml^{-1}	3.0 μg ml^{-1}
S. Multiparámetro 2				
Paracetamol	200	1.9	0.5 μg ml^{-1}	1.7 μg ml^{-1}
Ac. Acetilsalicílico		3.4	0.8 μg ml^{-1}	2.7 μg ml^{-1}
Cafeína		1.2	0.3 μg ml^{-1}	1.0 μg ml^{-1}

5.2. Calibración Multivariante

Multisensor para la determinación de pesticidas

Durante el estudio de las variables experimentales en el caso del multisensor para la determinación simultánea de α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol, se buscaron, en un principio, las condiciones que favorecieran una discriminación entre los analitos, bien en las señales o bien en el tiempo, que permitiera la resolución de la mezcla.

Ante la imposibilidad de resolver la mezcla de pesticidas empleando una retención on-line previa a la detección como en el resto de los multisensores expuestos en esta Memoria, este multisensor se desarrolló empleando un método de calibración multivariante.

Los métodos multivariantes resuelven una serie de ecuaciones empleando muchas medidas por muestra para cada valor de calibración. La instrumentación actual permite disponer de gran cantidad de información en un tiempo muy corto, pudiendo obtenerse datos que implican dos o más variables (señales multivariantes). Tratando

estos datos mediante métodos apropiados de análisis multivariante puede obtenerse mucha más información acerca de la muestra, lo que permite, por ejemplo, la determinación simultánea de varios constituyentes de la misma[3,4,5,6].

Se han propuesto distintos modelos de calibración multivariante que presentan diferencias en los requisitos del modelo a aplicar y en los cálculos realizados en la etapa de calibración; los más utilizados son:

- análisis multicomponente clásico (CLS)
- regresión inversa por mínimos cuadrados (ILS)
- regresión por componentes principales (PCR)
- regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

En todos los casos, el objetivo que se persigue es relacionar la matriz *A* formada por el conjunto de (*n x p*) respuestas instrumentales, correspondientes a los *p* diferentes canales de medida, de los *n* patrones (conteniendo a los *r* analitos) sobre los que se confecciona la matriz de calibración (estos patrones deben cubrir el intervalo de concentración esperado para las muestras y medirse en las mismas condiciones que los problemas) con la matriz *C* formada por las concentraciones conocidas de los *r* analitos en las *n* disoluciones patrón. Este modelo, que se obtiene en la etapa de calibración, debe comprobarse con muestras de composición conocida en la etapa de validación, para finalmente, hacer uso de él con el fin de calcular las concentraciones de muestras cuya composición es desconocida en la etapa de predicción.

Los dos primeros métodos (CLS e ILS) establecen relaciones entre los datos espectroscópicos y las concentraciones basándose en la aditividad de las señales analíticas, determinada por el cumplimiento de la ley de Beer. Sin embargo, estos métodos están muy limitados[7], especialmente por problemas en la línea base, desviaciones de la ley de Beer, interacciones entre los componentes y fuertes solapamientos espectrales. Por ello, son los métodos basados en el cálculo de los llamados factores o componentes principales los más adecuados para resolver estos problemas.

Los factores o componentes principales, son combinaciones lineales de las variables originales del sistema en estudio, para describir la matriz *A*. Estos factores contienen diferente información; los primeros explican un mayor porcentaje de varianza del sistema, es decir, describen la mayor parte de las variaciones en los datos que forman la matriz *A*, mientras que los últimos describen variaciones en los datos que

[3] I. Durán Meras, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, F.Salinas, Analyst, 118 (1993) 807.

[4] J.M. García, A.I. Jiménez, J.J. Arias, K.D. Khalaf, M. de la Guardia, Analyst, 120 (1995) 313.

[5] R. Schindler, M. Watkins, R. Vonach, B. Lendl, R. Kellner, R. Sara, Anal. Chem., 70 (1998) 226.

[6] G. de Armas, M. Miró, J.M. Estela, V. Cerdá, Anal. Chim. Acta, 471 (2002)173.

[7] R.D. Bautista, F. Jiménez, A.I. Jiménez, J.J. Arias, Talanta, 40 (1993) 1687.

pueden ser debidas a ruido o errores experimentales, por ello es fundamental, como ya se verá, la selección del número de factores que deben ser incluidos en el modelo. La diferencia fundamental entre los modelos PCR y PLS consiste en que en PLS durante la etapa de calibración se utiliza la información referente a la matriz de concentraciones *C*, que se descompone también, mientras que en PCR únicamente se emplean los datos espectroscópicos (matriz *A*).

Los métodos de calibración multivariante han adquirido gran importancia en el análisis multicomponente, especialmente aquellos que utilizan PLS[8]. Este método ya ha sido aplicado satisfactoriamente en técnicas tales como fluorimetría[9,10], espectrofotometría[11,12], infrarrojo cercano[13] y análisis cinético[14].

Para la resolución de la mezcla de pesticidas que se propone empleamos el método de mínimos cuadrados parciales (PLS) puesto que presenta mayor robustez[15,16], de forma que los parámetros que definen o caracterizan el sistema no se ven fuertemente afectados por el número de muestras utilizadas en la etapa de calibración.

Este método fue introducido por H.Wold[17], adquiriendo gran aceptación en sus aplicaciones al análisis químico. Existen dos planteamientos distintos que se conocen como PLS-1 y PLS-2. En el algoritmo PLS-2 se calibran todos los constituyentes a un tiempo, lo que a veces supone cierta pérdida de precisión, especialmente para mezclas complejas; en cambio, en PLS-1 se asigna un factor a cada constituyente y se optimiza la matriz de calibración para cada uno de ellos obteniéndose generalmente resultados más precisos aunque el tiempo necesario es algo mayor, por ello para nuestro sistema se ha seleccionado este último algoritmo.

5.2.1. Linealidad entre IRF y concentración

El primer paso antes de abordar la resolución de la mezcla de a-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol es la comprobación de existencia de una relación lineal entre la señal analítica, intensidad relativa de fluorescencia en este caso, y la concentración de cada uno de los analitos para establecer los intervalos de concentración en que ésta se cumple.

---

[8] H. Wold, In system under indirect observation, ed. K.G. Joreskog, H. Wold, North Holland, Amsterdam, vol. 2, (1982).

[9] S. Ortega Algar, N. Ramos Martos, A. Molina Diaz, Talanta, (2003) en prensa.

[10] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, Anal. Chim. Acta, 449 (2001) 179.

[11] M.S. Boeris, J.M. Luco, R.A. Olsina, J. Pharm. Biomed. Anal., 24 (2000) 259.

[12] E. Dinç, C. Serin, F. Tugen-Demiröz, T. Duganay, Int. J. Pharm., 250 (2003) 339.

[13] F.J. Rambla, S. Garrigues, M. de la Guardia, Anal. Chim. Acta, 344 (1997) 41.

[14] J. Havel, J. Jiménez, R.D. Bautista, J.J. Arias León, Analyst, 118 (1993) 1355.

[15] S. Wold, A. Ruhe, H. Wold, W. Dunn, J. Sci. Stat. Comput. 5 (1984) 735.

[16] M. Otto, W. Wegscheider, Anal. Chem., 57 (1985) 63.

[17] H. Wold, Research paper in statistics, Ed. Wiley, Nueva York, 1966.

Para ello se construyeron las curvas de calibrado del sensor para cada uno de los analitos por separado, empleando las condiciones óptimas seleccionadas en el estudio de variables previo. Mediante la configuración FIA diseñada (*Figura V.9*), se inyectaron 500μl de disoluciones de distintas concentraciones de α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol, registrando la IRF a las longitudes de onda de 290nm y 350nm para excitación y emisión respectivamente (anchura de rendijas 5 y 20nm respectivamente).

Los intervalos de linealidad entre IRF y concentración que se obtuvieron para cada uno de los analitos son los siguientes:

α-Naftol: 2-1040 μg l^{-1} ***o-Fenilfenol:*** 2-400 μg l^{-1} ***Tiabendazol:*** 2-450 μg l^{-1}

La matriz de calibración para el análisis multivariante se construye trabajando en estos intervalos de concentración.

5.2.2. Resolución de la mezcla mediante PLS

El objetivo de este trabajo es la obtención de un modelo que permita predecir la composición de muestras que contengan los analitos estudiados, para ello es necesario establecer una matriz de calibración, es decir, un conjunto de muestras que contienen concentraciones conocidas de los compuestos que integran el problema dentro de los márgenes de concentración establecidos para cada uno de los analitos.

El programa informático empleado para el tratamiento de los datos mediante regresión por mínimos cuadrados parciales es ***TQ-Analyst v. 6.1.1*** de Termo Nicolet Corp.

MATRICES DE CALIBRACIÓN

Las muestras patrón preparadas para la calibración son mezclas ternarias y binarias de los analitos en estudio en diferentes concentraciones, así como muestras que sólo contienen uno de los analitos para facilitar en la etapa de predicción la detección de la ausencia de más de un componente.

Tabla V.7. Disoluciones empleadas para construir las matrices de calibración

	Concentración ($\mu g\ l^{-1}$)		
Muestra	***α-naftol***	***o-fenilfenol***	***Tiabendazol***
1	100	150	440
2	1040	300	30
3	0	400	20
4	0	0	120
5	120	0	4
6	160	180	160
7	5	50	290
8	15	200	220
9	220	280	40
10	300	230	0
11	900	140	2
12	0	250	0
13	380	60	280
14	420	2	340
15	30	40	400
16	500	120	250
17	540	220	100
18	150	340	80
19	640	160	140
20	700	30	15
21	60	240	180
22	800	10	300
23	600	0	0
24	1000	20	10
25	2	110	380

Para cada componente de la matriz de calibración, se registraron los espectros de emisión (λexc=290nm) desde 325 a 435nm durante el desarrollo del pico FIA, es decir, para cada muestra se registraron 30 espectros comenzando en el momento en que se inyectaba la muestra (t=0s) y a intervalos regulares de tiempo (4.8 s). De esta forma se consigue registrar los espectros mientras el bolo de muestra está pasando por la microzona sensora, permitiendo el seguimiento de los analitos durante el proceso de retención-elución.

A continuación se muestra en un diagrama tridimensional, a modo de ejemplo, los espectros en función del tiempo obtenidos para las muestras que contenían únicamente uno de los analitos, α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol, respectivamente.

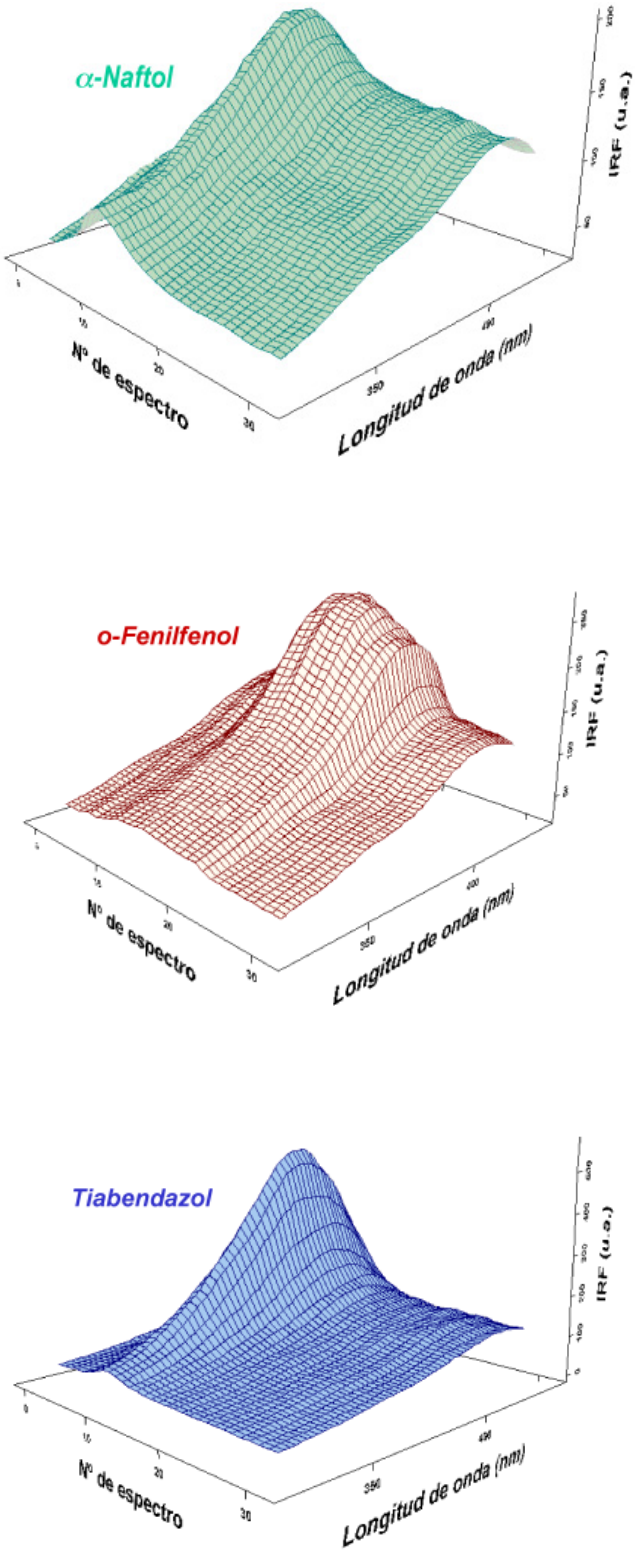


Figura V.27. Diagrama tridimensional de una inyección de α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol que representa los espectros en función del tiempo.

SELECCIÓN DE LAS MATRICES DE CALIBRACIÓN

Como los analitos van desplazándose a través de la zona sensora en un proceso continuo de sorción-desorción, hemos de establecer el tiempo óptimo al cual debemos realizar el espectro de la mezcla conforme ésta avanza a través de la microzona sensora. Tenemos, pues, una situación diferente respecto al caso convencional de resolución de mezclas en modo batch: la existencia de una variables adicional que puede ayudar a introducir un factor diferencial que facilite la discriminación espectral.

Por consiguiente, para cada una de las muestras de la matriz de calibración se van registrando los espectros a intervalos regulares de tiempo (cada 4.8 s). Se registraron 17 espectros a partir de t=19.2 s (que coincide con el espectro número 4 desde la inyección), momento en que el bolo de muestra comienza a llegar al detector. Después se procede a la elución de los componentes para regenerar el sensor. Tendremos, pues, 17 potenciales matrices de calibración. Se trata de seleccionar el tiempo óptimo, es decir, el espectro óptimo, para el cual la matriz de calibración tiene la mayor calidad de ajuste del modelo. Se trabajó con los espectros de emisión y también con sus derivadas de primer orden.

La evaluación de la calidad del ajuste del modelo se efectuó tomando en consideración el coeficiente de correlación, R, y el RMSEC, raíz cuadrada de la media de los cuadrados de los errores de la calibración.

$$R=\left(\frac{\sum_{i=1}^{n}(c_{m,i}-\bar{c})^2}{\sum_{i=1}^{n}(c_i-\bar{c})^2}\right)^{0.5} \qquad RMSEC=\left[\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(c_{m,i}-c_i)^2\right]^{0.5}$$

donde,

c_i: concentración teórica del analito i
$c_{m,i}$: concentración calculada por el modelo
n: nº total de muestras de la matriz de calibración

El coeficiente de correlación es una medida de la predicción del modelo sobre los valores de concentración de las muestras de la matriz de calibración, cuanto más próximo a 1 sea significa que los valores de concentración calculados son más próximos a los valores verdaderos. El RMSEC se refiere a la incertidumbre de la calibración para el componente seleccionado.

En todos los casos los mejores resultados se obtuvieron para las matrices que operaban con las derivadas de primer orden de los espectros, cuyos valores de R se representan a continuación y que tiene un comportamiento paralelo al RMSEC.

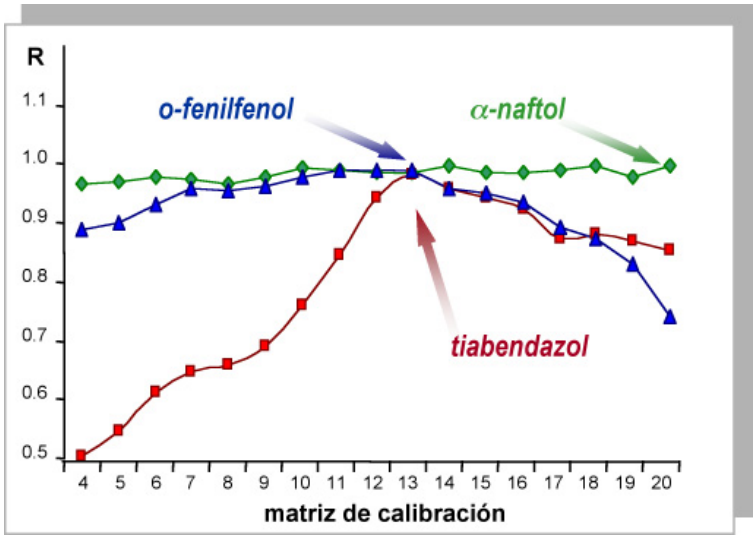


Figura V.28. Coeficientes de correlación obtenidos para las matrices en estudio

Como se puede observar en la figura, para o-fenilfenol y tiabendazol, los coeficientes de correlación mejoran al aumentar el número del espectro, es decir, mejoran con el avance en el desarrollo del pico FIA; esto se debe a que al llegar al máximo de la señal analítica las diferencias espectrales se acentúan y se relacionan mejor con la concentración. Este aumento en el coeficiente se produce hasta el espectro 13 a partir del cual comienzan a bajar, seguramente debido a que comienza la elución de los analitos.

Para el caso del α-naftol, el ajuste del modelo da muy buenos resultados para todos los tiempos estudiados, esto se debe a que el espectro de emisión de este analito presenta un hombro que comienza cerca de los 400 nm, de forma que las diferencias con los espectros de los otros analitos son más acentuadas permitiendo una buena predicción. La matriz que proporcionaba mejor resultado es la correspondiente al espectro número 20.

A continuación se indican los parámetros estadísticos obtenidos para las matrices seleccionadas como óptimas.

Tabla V.8. Parámetros estadísticos

Analito	Matriz	Tiempo	R	RMSEC
α-Naftol	20	96 s	0.9934	18.7
o-Fenilfenol	13	64.4 s	0.9809	22.7
Tiabendazol	13	64.4 s	0.9914	18.7

NÚMERO DE FACTORES ÓPTIMO

Una vez se han elegido las matrices con las que se va a trabajar es necesario seleccionar el número óptimo de factores para lo cual se realiza una validación

cruzada, es decir, se predice la concentración de cada una de las muestras patrón empleando una matriz de calibración que contiene todas las muestras excluyendo una cada vez. De esta forma se calcula el PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales de la predicción) para cada número de factores estudiado y para cada componente de la mezcla.

$$PRESS=\sum_{i=1}^{n}(c_{m,i}-c_i)^2$$

c_i: concentración teórica del analito i
$c_{m,i}$: concentración calculada por el modelo
n: nº total de muestras de la matriz de calibración

Otro parámetro muy útil es el RMSECV, que se define como la raíz cuadrada de la media de los errores de la validación cruzada y se calcula a través del PRESS:

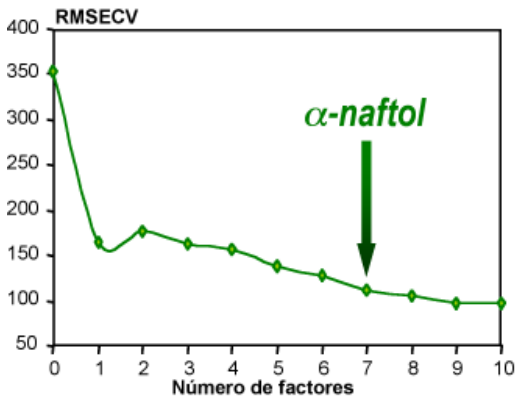
$$RMSECV=\sqrt{\frac{PRESS}{n}}$$

Ambos valores nos dan una idea de la bondad con que una matriz de calibración predice la concentración a medida que va a aumentando el número de factores del modelo, según esto distinguimos:

- infra-ajuste: al aumentar el número de factores se produce una disminución en el error de la predicción, esto indica que no se están considerando suficientes factores para modelar los componentes de interés.
- sobre-ajuste: cuando comienzan a incluirse factores que contienen ruido, suele producirse un aumento del PRESS tras alcanzar un valor mínimo.

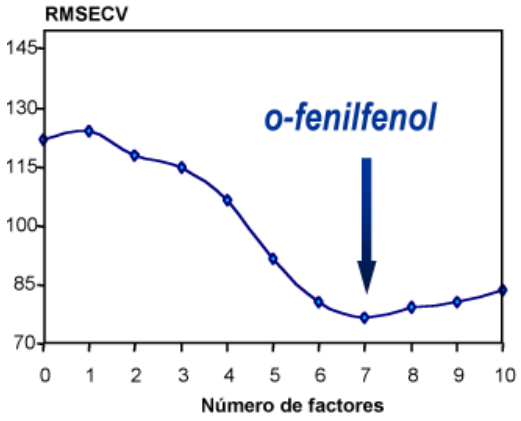
A continuación se muestran las gráficas que representan RMSECV frente al número de factores, y los valores obtenidos en el caso de las matrices seleccionadas.

Matriz número 20 (t=96 s)



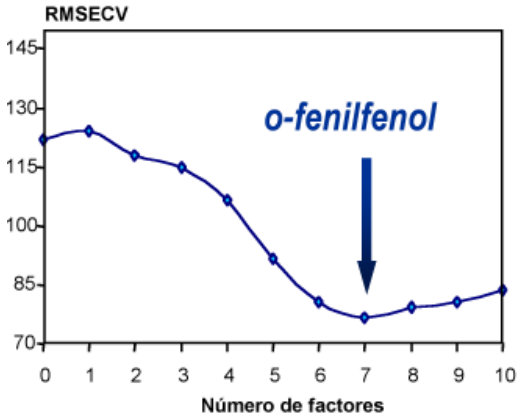
Factores	PRESS	RMSECV
0	3096971	351.96426
1	675235.6875	164.34546
2	774561.3125	176.01833
3	661865.0625	162.71018
4	607897.0625	155.9355
5	478712.2188	138.37807
6	403972.3438	127.11764
7	309466.4375	111.25942
8	274850.7813	104.85243
9	233435.4219	96.63031
10	234445.3594	96.83912

Matriz número 13 (t=62.4s)



Factores	PRESS	RMSECV
0	371205.59	121.85329
1	385966.66	124.25243
2	346880.41	117.79311
3	330876.22	115.04369
4	282953.69	106.38678
5	209481.03	91.53819
6	162123.05	80.52902
7	145899.3	76.39353
8	157122.77	79.27743
9	161696.86	80.4231
10	175513.83	83.78874

Matriz número 13 (t=62.4s)



Factores	PRESS	RMSECV
0	371205.59	121.85329
1	385966.66	124.25243
2	346880.41	117.79311
3	330876.22	115.04369
4	282953.69	106.38678
5	209481.03	91.53819
6	162123.05	80.52902
7	145899.3	76.39353
8	157122.77	79.27743
9	161696.86	80.4231
10	175513.83	83.78874

En general, suele seleccionarse el número de factores que proporciona el mínimo valor de PRESS y RMSECV, aunque siempre teniendo en cuenta que posiblemente ya en ese caso se presenta sobre ajuste. Este criterio se siguió tanto para el caso del OPP como del TBZ, ambos con la matriz número 13.

Sin embargo, para el NFT, con la matriz número 20, el hecho de emplear como número de factor óptimo el que aportaba menor valor del PRESS (9), a pesar de aumentar la correlación con las muestras estándar de la matriz, aumentaba considerablemente el error de predicción en la etapa de validación, por lo que se decidió tomar un valor menor.

El número de factores seleccionado es: 7 y 6 para o-fenilfenol y tiabendazol, respectivamente, empleando la matriz número 13, y 7 para el α-naftol, empleando la matriz número 20.

VALIDACIÓN DEL MODELO PROPUESTO

Una vez se ha seleccionado el modelo de calibración, debe comprobarse el grado de predicción que presenta frente a mezclas sintéticas de los analitos, que pueden ser ternarias y binarias, así como alguna muestra que contenga únicamente uno de los analitos. En nuestro caso empleamos 15 muestras para esta validación, la tabla siguiente resume los resultados obtenidos.

Tabla V.9. Validación de los modelos

	α-Naftol (μg l⁻¹)		***o-Fenilfenol (μg l⁻¹)***		***Tiabendazol (μg l⁻¹)***	
Muestra	C puesta	C encont	C puesta	C encont	C puesta	C encont
1	85	92	230	219	250	254
2	360	382	200	215	140	138
3	2	-	120	132	100	105
4	400	414	150	144	15	17
5	475	463	180	157	40	45
6	250	231	275	266	90	102
7	600	611	210	217	300	278
8	700	684	110	126	275	261
9	32	34	250	239	230	246
10	105	97	300	282	320	287
11	60	64	15	22	80	102
12	6	6	80	88	150	156
13	9	8	30	29	120	126
14	65	70	2	1	130	134
15	80	88	5	2	180	172

Una buena manera de evaluar la calidad de la predicción del modelo propuesto es a través del RMSEP, raíz cuadrada de la media de los errores estándares de predicción, que se obtiene a partir de la siguiente expresión:

$$RMSEP^2 = \frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n}(c_{m,i} - c_i)^2$$

c_i: concentración teórica del analito
$ic_{m,i}$: concentración calculada por el modelo
n: nº total de muestras de la matriz de calibración

Se puede calcular asimismo el error relativo de predicción, REP, a través del cociente entre el RMSEP y la media de las concentraciones puestas, así se obtuvieron los siguientes valores para cada componente.

Tabla V.9. Predicción del modelo

	RMSEP	***REP (%)***
α-Naftol	11.2	5.2
o-Fenilfenol	11.6	8.1
Tiabendazol	13.7	8.5

Los resultados obtenidos pueden considerarse satisfactorios, teniendo en cuenta las características del sistema propuesto, en el que la presencia de la fase sólida es muy importante y la cinética del proceso de avance a través de la zona sensora es un aspecto también decisivo.

6. ESTUDIO DEL EFECTO DE POSIBLES ESPECIES INTERFERENTES

Hasta el momento, el estudio descrito ha consistido en la optimización de las variables experimentales y factores que afectan a la respuesta de los sensores propuestos en esta Memoria. El último paso realizado ha sido la calibración de dichos sensores, para los volúmenes seleccionados en cada caso, para obtener los intervalos de linealidad entre señal analítica y concentración.

Otro estudio de gran interés es la selectividad que presenta el sensor para los analitos objeto de estudio, para ello se realiza un análisis de la interferencia que puede producirse por la presencia de distintas concentraciones de especies extrañas en la disolución. Las especies extrañas que se han escogido para cada caso son aquéllas que más frecuentemente acompañan a los analitos en las muestras reales a las que se va a aplicar el sensor desarrollado.

Para este estudio se trabaja con 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 y la 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 extraña por encima de la cual se origina un error relativo en la señal analítica mayor del 3%. El límite de tolerancia se expresará como la relación especie/analito, en peso (p:p).

A continuación se exponen las peculiaridades más interesantes que se han presentado en el estudio de interferencias para los distintos analitos de trabajo. Se agrupan según las muestras en las que se van a aplicar los sensores.

6.1. Sensores Monoparámetro

Determinación de diuréticos

Los sensores propuestos para la determinación de amilorida y triamtereno, se aplican a muestras de suero sanguíneo y preparados farmacéuticos por ello las especies elegidas para el estudio fueron aquellas que generalmente se encuentran en este tipo de muestras: azúcares y algún otro diurético.

Se siguió el procedimiento descrito de medir la IRF de disoluciones que contengan estas especies además del analito en cuestión y se calcularon los límites de tolerancia en cada caso. Según se ha definido dicho límite, es necesario que éste sea superior

a la relación especie/analito que presentan las muestras reales a las que se pretende aplicar el método. De los resultados obtenidos podemos concluir que esta premisa se cumple satisfactoriamente.

La *Tabla V.10*, muestra los resultados obtenidos para los dos sensores monoparámetro propuestos.

Tabla V.10. Límites de tolerancia para los sensores monoparámetro

	Límite de Tolerancia	
Especie extraña	**Amilorida**	**Triamtereno**
Glucosa, Sacarosa	> 200[a]	> 1000[a]
Lactosa	80	> 1000[a]
Atenolol	75	-
Hidroclorotiacida	40	-
Ácido ascórbico	-	>1000[a]
Furosemida	-	40

[a] Máxima relación especie/analito ensayada

Debemos destacar que la utilización de una fase sólida 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 gran número de posibles especies interferentes.

En el caso de la amilorida, el aumento de selectividad es fundamental para su determinación puesto que mediante espectrofluorimetría convencional en disolución no resulta posible determinar este analito en presencia de atenolol (ATL) e hidroclorotiacida (HCT), dos compuestos que acompañan a este principio activo en los fármacos, lo cual se deduce del estudio de los espectros de emisión en disolución y en fase sólida.

A continuación se presentan los espectros de AML aislada y en presencia de ATL e HCT (en la relación más común en fármacos). Los espectros en disolución muestran claramente como decrece la intensidad de fluorescencia del analito en disolución respecto a su espectro en ausencia de estas especies interferentes, mientras que en fase sólida, el espectro es el mismo.

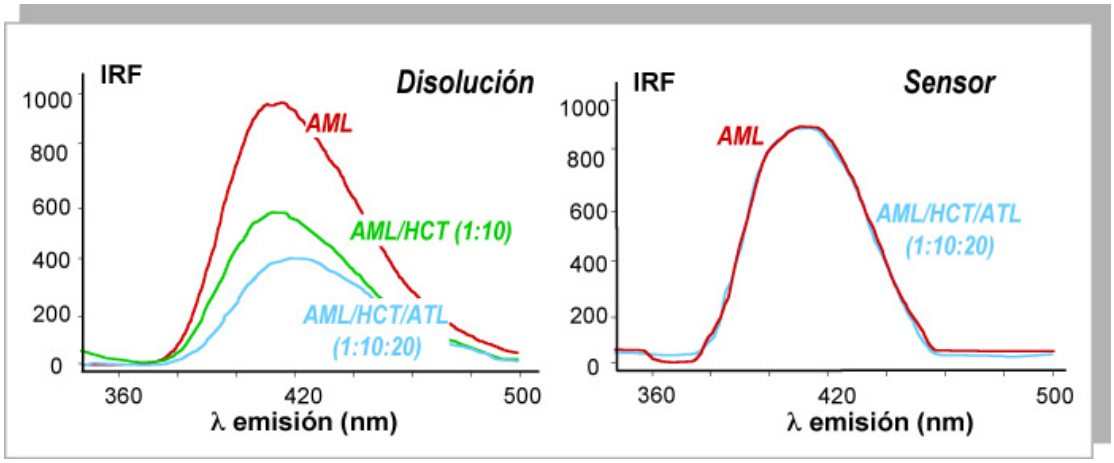


Figura V.29. Espectros de emisión en disolución y en fase sólida de amilorida, aislada y en presencia de especies interferentes.

Al realizar el estudio de tolerancia en disolución, se encontró que los límites de tolerancia para hidroclorotiacida y atenolol son de 0.5 y 1, respectivamente, mientras que el sensor propuesto obtiene valores de tolerancia de 40 y 75, respectivamente, lo cual confirma que la selectividad del sensor propuesto es muy superior. La relación habitual en que estas especies se encuentran en los fármacos respecto a la amilorida es 20 para la hidroclorotiacida y 10 para el atenolol, lo que supone que sólo mediante la aplicación del sensor que se propone en esta Memoria es posible la determinación directa de amilorida por espectrofluorimetría en presencia de estas especies.

6.2. Sensor Biparámetro

Determinación de vitaminas: B_1 y B_6

El estudio de interferencias se realizó también para el sensor biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina, en este caso las especies estudiadas como posibles interferentes son aquellas que acompañan a estas vitaminas en fármacos, incluyendo preparados vitamínicos.

Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indican que los límites de tolerancia obtenidos son bastante altos. Teniendo en cuenta que en ninguno los fármacos se encuentran cantidades de estas especies que superen la tolerancia obtenida, el sensor es realmente eficaz en la determinación selectiva de tiamina y piridoxina en preparados farmacéuticos.

Tabla V.11. Tolerancia del sensor biparámetro a especies extrañas

Especie extraña	*Límite de tolerancia*	
	Tiamina	Piridoxina
Lactosa, glucosa, sacarosa, L-carnitina	>100[a]	>100[a]
Pantotenato cálcico	90	50
Nicotinamida	25	20
Piridoxina	>20[a]	-
Tiamina	-	>20[a]
Cianocobalamina	10	10
Sacarina	7.5	7.5
Ácido fólico, diclofenaco sódico, biotina	5	5
Riboflavina	5	2.5

[a] Máxima relación especie/analito ensayada

Sin embargo el nivel de tolerancia al ácido ascórbico que se obtuvo, 10 para B_1 y 20 para B_6, no era suficiente para la determinación satisfactoria de los analitos en los preparados farmacéuticos que contienen ácido ascórbico, ya que los niveles en los que éste se encuentra son superiores. Por ello se buscó una solución que permitiera incrementar la tolerancia del sensor frente al ácido ascórbico, lo cual se consiguió intercalando una minicolumna empaquetada con Sephadex QAE A-25 (resina de intercambio aniónico), antes del bucle de inyección, de modo que el ácido ascórbico se retenga en el interior de la columna, antes de llenarse el bucle de la válvula de inyección.

El montaje FIA queda como sigue, no se indican todos los componentes porque ya se mostraron en el apartado 3 de este capítulo.

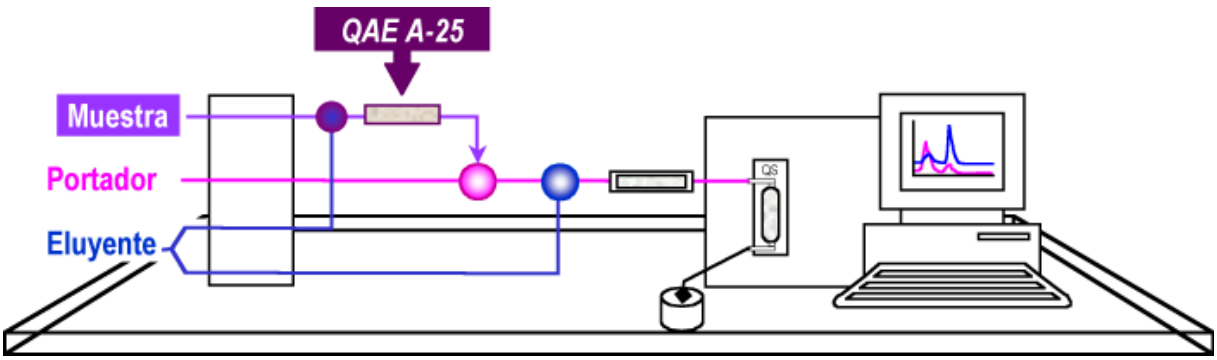


Figura V.30. Esquema del sistema FIA diseñado para eliminar la interferencia del ácido ascórbico

Esto se debe a que en las condiciones de trabajo el ácido se encuentra desprotonado como ascorbato y se retiene fuertemente en la resina de intercambio aniónico. La columna se regenera, después de tres inyecciones, con la misma disolución de eluyente que se emplea en el sistema. Como se observa en la tabla, la tolerancia a la presencia de ácido ascórbico se incrementa hasta 10 veces para la determinación de tiamina, y hasta 5 veces para piridoxina, tolerándose razones ácido ascórbico/ analito de 100.

Tabla V.12. Tolerancia del sensor al ácido ascórbico

	Límite de tolerancia	
Especie extraña	**B_1**	**B_6**
Ác. Ascórbico	10	20
Ác. ascórbico (con columna)	100	100

6.3. Sensores Multiparámetro

Determinación de analgésicos-cafeína

Los dos sensores triparámetro para la determinación de mezclas ternarias de analgésicos y cafeína, se pretenden aplicar a muestras de fármacos analgésicos y antiinflamatorios de la Farmacopea española, por ello las especies susceptibles de ocasionar alguna interferencia en la determinación son aquellas que se encuentran en dichas preparaciones farmacéuticas.

En ambos casos se realizó el estudio como se ha indicado anteriormente comparando las señales analíticas de los analitos cuando no existe ninguna especie extraña en la disolución inyectada, con las que se obtienen cuando la disolución contiene, además de los analitos, concentraciones crecientes de cada una de las especies extrañas.

En el caso del sensor para la determinación simultánea de **PCT-CF-PFZ**, se estudió el efecto que estas especies extrañas tenían sobre las señales analíticas a los dos pHs seleccionados, así como empleando el método convencional en disolución.

Los valores de tolerancia obtenidos por el sensor propuesto son superiores a los obtenidos para el método en disolución, lo que confirma el aumento de selectividad que supone la utilización del sensor. En la tabla siguiente se muestran los valores de los límites de tolerancia obtenidos con el sensor propuesto.

Tabla V.13. Valores de tolerancia del sensor PCT-CF-ASA

	Límite de tolerancia				
	pH 5.8			*pH 12.0*	
Especie extraña	**PCT**	**CF**	**PFZ**	**PCT**	**CF**
Sacarosa	16	16	3	1	5
Lactosa	40	400	33.4	7	25
Sacarina	4	10	7.5	0.5	4
Salicilamida	0.4	2	2.7	1.5	1
Clorfeniramina	2	0.5	2	0.09	0.2
Codeína	0.02	0.1	0.1	0.03	0.3
Dimenhidrinato	0.005	0.025	0.005	0.6	1.1

El comportamiento del dimenhidrinato (DMH) es particular puesto que el valor de tolerancia que presenta frente a la CF a pH 5.8 (0.025) no permite en el fármaco "Saldeva Forte", en el que la relación es 15:50, sin embargo a pH 12 la tolerancia aumenta hasta 1 haciendo posible la determinación de cafeína en este fármaco. De esta manera se justifica una vez más la utilización del sensor a los dos pHs propuestos.

El estudio de los límites de tolerancia de la determinación de **PCT-ASA-CF** mediante el sensor triparámetro ofrece resultados similares, es decir se obtienen tolerancias altas que permiten la determinación de estos analitos en presencia de un gran número de especies que los acompañan generalmente en los preparados farmacéuticos, dando pues idea de la selectividad de este sensor. Los valores obtenidos se muestran en la tabla siguiente.

Tabla V.14. Límites de tolerancia del sensor de PCT-ASA-CF

	Límite de tolerancia		
Especie extraña	**PCT**	**ASA**	**CF**
Glucosa	25	5	25
Sacarosa	14.6	5	70
Glicina	2.5	0.5	1
Dimenhidrinato	0.8	0.5	0.2
Clorfenamina	2.5	0.75	0.75
Fenilefrina	0.3	0.05	1
Tiamina	1.7	2	7.5
Codeína	1.0	3	1.6
Ácido Ascórbico	85	50	250

Para mostrar más claramente el aumento de selectividad que supone el sensor propuesto se tomaron dos compuestos, Tiamina (B_1) y ácido ascórbico (AA), que generalmente se encuentran presentes en los fármacos que contiene los analitos estudiados. Los espectros de absorción de estos principios activos cubren la zona espectral entre 200 y 300 nm, al igual que los analitos que se pretenden determinar con este sensor triparámetro, esto indica que no sería posible la determinación directa por el método convencional en disolución. Sin embargo mediante la utilización del sensor, la preconcentración que produce la fase sólida, así como la adsorción selectiva, permiten eliminar las interferencias que podrían producir estos compuestos.

En la *Figura V.31* se muestran los espectros de absorción en disolución de B_1 y AA y de paracetamol (PCT). Se observa el solapamiento de los espectros que impediría la determinación directa del PCT en disolución en presencia de cualquiera de ellos.

Asimismo se muestran los espectros de absorción en las condiciones del sensor, de PCT y una mezcla ternaria de PCT, B_1 y AA en la razón máxima tolerada por el sensor para estos compuestos (1:2:10). Se observa que el espectro de PCT y de dicha mezcla ternaria es muy similar, de modo que podemos concluir que la selectividad del método propuesto permite la determinación directa de PCT en las condiciones el sensor.

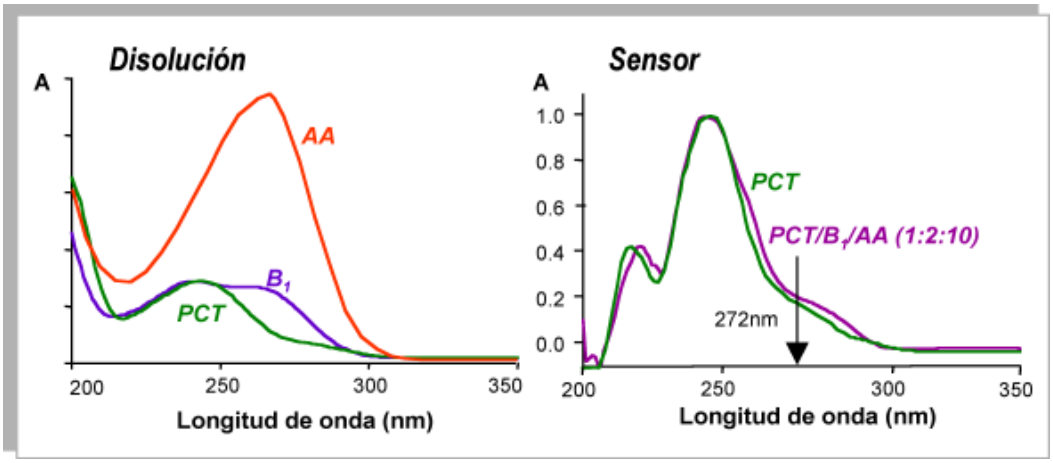


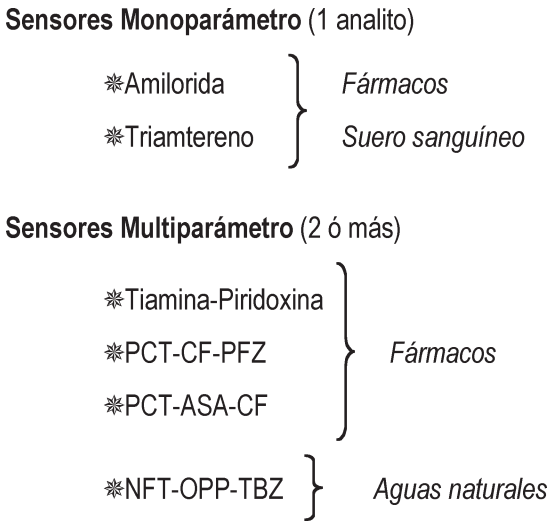
Figura V.31. Espectros de absorción de paracetamol, tiamina y ác. ascórbico, en disolución y fase sólida.

Los resultados obtenidos para los otros dos analitos, ácido acetilsalicílico y cafeína, son muy similares a los obtenidos para el paracetamol, de acuerdo con lo previsto según la selectividad del sensor.

Del estudio de interferencias realizado para los sensores propuestos en esta Memoria, podemos concluir que la selectividad que presentan es realmente elevada frente a los valores que se obtiene con el método convencional en disolución, justificando, de este modo, la utilidad de los sensores propuestos.

7. APLICACIONES ANALÍTICAS

Una vez establecidos los métodos analíticos, la parte más interesante del trabajo corresponde a aquélla en que se demuestra su aplicabilidad sobre muestras reales. En esta Memoria se han propuesto seis sensores mono o multiparámetro para la determinación de analitos que se encuentran en muy diversas muestras, a continuación se resumen los sensores y las aplicaciones que se proponen:



7.1. Preparación de las muestras

Como se ha comentado, se eligieron muestras de muy diferente índole, por lo que la preparación de las mismas difiere según su origen y carácter. A continuación se indica qué procedimiento se siguió en cada caso.

7.1.1. Preparados farmacéuticos

Se seleccionaron preparados farmacéuticos de la Farmacopea Española que contuvieran los analitos que se pretenden determinar con los sensores propuestos. En el caso de los sensores multiparámetro también se aplicaron a muestras que contuvieran, tanto uno de los analitos únicamente, como dos o más. Asimismo se eligieron preparados en diversas formas de presentación, ya sean comprimidos, grageas, cápsulas, sobres y soluciones.

Los comprimidos y las grageas fueron molidos cuidadosamente en un mortero de ágata y disueltos en un disolvente apropiado mediante sonicación durante 5 min. Los preparados en sobres, gotas y los contenidos de las cápsulas se diluyeron directamente en el disolvente con ayuda del baño ultrasonidos.

El disolvente empleado dependerá de la solubilidad de los compuestos, se prefirió, en lo posible, emplear agua desionizada, y esto fue posible en todos los casos excepto para los diuréticos, para los que se emplearon mezclas de dimetilsulfóxido

(DMSO)-agua desionizada al 20 y 25% (v:v) para triamtereno y amilorida, respectivamente.

Todas las muestras se diluyeron adecuadamente con agua desionizada, antes de ser inyectadas en la corriente de portador.

7.1.2. Fluido fisiológico: Suero sanguíneo

Los sensores monoparámetro propuestos fueron aplicados a muestras fortificadas de suero sanguíneo. Las muestras de suero se obtuvieron a través del Hospital Universitario "Ciudad de Jaén" (Jaén, España). El único tratamiento previo que fue necesario fue una centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y una filtración a través de un filtro de membrana de 0.45 mm. Posteriormente fueron diluidas convenientemente con una mezcla de DMSO-agua al 20 ó 25 % (v:v) para la determinación de triamtereno o amilorida, respectivamente.

7.1.3. Aguas naturales

El sensor triparámetro para la determinación de pesticidas fue aplicado a muestras fortificadas de aguas naturales. Las muestras se tomaron de tres fuentes, agua potable de la red de aguas de Jaén (Jaén), el pantano Rumblar (Baños de la Encina, Jaén) y el río Grande (La Carolina, Jaén). El único tratamiento que se realizó fue una filtración a través de un filtro de membrana de 0.45mm, las muestras se conservaron refrigeradas a 5ºC y se analizaron con la mayor brevedad posible.

7.2. Determinación en muestras reales

Para establecer la utilidad de los métodos propuestos, éstos fueron aplicados a la determinación de los analitos en muestras reales mediante los procedimientos descritos en cada caso. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado para obtener una media y poder conocer la desviación estándar que presentan los datos.

7.2.1. Sensores Monoparámetro

Determinación de diuréticos

Los dos sensores monoparámetro propuestos pretenden la determinación de los diuréticos, amilorida y triamtereno, tanto en fármacos como en suero sanguíneo.

La determinación de estos analitos en **preparados farmacéuticos** se realizó utilizando fármacos de la Farmacopea española, que fueron Ameride (Dupont Pharma) y Kalten (Zenaca Farma) para la amilorida, y Triniagar (Farmasines) y Salidur (Almirall Prodesfarma) para el triamtereno.

En todos los casos la determinación siguió el procedimiento experimental descrito para cada sensor, realizándose una determinación directa y un estudio de recuperación añadiendo cantidades conocidas de los analitos, para chequear la exactitud. Los resultados se muestran en las siguientes tablas.

Tabla V.15. Determinación y estudio de recuperación de amilorida en fármacos

AMERIDE *(comprimidos)*			
Composición (mg)	**Encontrado[a] ± SD (mg)**	**Añadido (mg/u)**	**Recuperado[a] ±SD (%)**
5	4.94 ± 0.01	10	100.7 ± 0.3
		25	102 ± 1
		50	100.7 ± 0.5
KALTEN *(comprimidos)*			
Composición (mg)	**Encontrado[a] ± SD (mg)**	**Añadido (mg/u)**	**Recuperado[a] ±SD (%)**
2.5	2.61 ± 0.06	5	100.8 ± 0.5
		10	101 ± 1
		20	96.4 ± 0.2

[a] Valor medio y desviación estándar (n=3).

Tabla V.16. Determinación y estudio de recuperación de triamtereno en fármacos

TRINIAGAR *(comprimidos)*			
Composición (mg)	**Encontrado[a] ± SD (mg)**	**Añadido (mg/u)**	**Recuperado[a] ±SD (%)**
50	48.9 ± 0.5	10	94.9 ± 0.3
		25	96.3 ± 0.9
		50	97.2 ± 0.5
SALIDUR *(comprimidos)*			
Composición (mg)	**Encontrado[a] ± SD (mg)**	**Añadido (mg/u)**	**Recuperado[a] ±SD (%)**
25	25.8 ± 0.7	5	99.1 ± 0.5
		10	98.7 ± 0.5
		20	96.3 ± 0.6

[a] Valor medio y desviación estándar (n=3).

En ambos casos se obtienen muy buenos resultados tanto en la determinación directa como en los estudios de recuperación, obteniéndose errores relativos siempre inferior al 5%

Respecto a las aplicaciones sobre muestras de fluido fisiológicos, **suero sanguíneo**, se realizaron estudios de recuperación sobre muestras fortificadas de suero, 3 en el caso de amilorida y 6 en el de triamtereno. Para seleccionar las cantidades que se añaden a las muestras de suero se tuvieron en cuenta los niveles de amilorida y

triamtereno presentes en suero a partir del fármaco ingerido, siendo de 90-100% y 60-90% respectivamente.

En ambos casos, fue necesario realizar una calibrado por adición de patrón, debido al alto efecto matriz encontrado, este efecto puede evaluarse a través del cociente entre las pendientes de la ecuación de calibración por adición de patrón y la ecuación de la calibración convencional, y que fueron de 2.5-4.3 para amilorida y 0.6-1.2 para triamtereno.

Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes.

Tabla V.17. Estudio de recuperación para amilorida en suero

Muestra	Añadido (μg ml^{-1})	Recuperado[a] $\pm \sigma_R$ (%)
1	10	99.7 ± 0.3
	20	103.4 ± 0.4
	40	98.5 ± 0.6
2	10	96.3 ± 0.5
	20	104.2 ± 0.3
	30	101.3 ± 0.6
3	5	99.6 ± 0.7
	15	98.9 ± 0.4
	25	99.5 ± 0.5

[a] Valor medio y desviación estándar (n=3).

Tabla V.18. Estudio de recuperación para triamtereno en suero

Muestra	Añadido (μg ml^{-1})	Recup.[a] $\pm \sigma_R$ (%)	Muestra	Añadido (μg ml^{-1})	Recup.[a] $\pm \sigma_R$ (%)
1	10	104.2 ± 0.3	4	20	99.4 ± 0.6
	35	100.6 ± 0.1		40	95.6 ± 0.2
	60	100.7 ± 0.5		60	100.2 ± 0.4
2	20	97.4 ± 0.3	5	30	102.1 ± 0.3
	50	100.1 ± 0.4		45	96.6 ± 0.1
	70	99.7 ± 0.3		70	97.5 ± 0.6
3	15	98.2 ± 0.4	6	5	102.1 ± 0.3
	25	99.9 ± 0.2		16	96.6 ± 0.1
	55	100.1 ± 0.1		40	97.5 ± 0.6

[a] Valor medio y desviación estándar (n=3).

Se observa que los resultados de recuperación se encuentran en el intervalos entre 95.3 y 105 %, lo cual confirma la validez de los métodos propuestos.

7.2.2. Sensor Biparámetro

Determinación de vitaminas: B_1 y B_6

El sensor biparámetro para la determinación simultánea de tiamina y piridoxina se aplicó a muestras de fármacos, que contenían tanto uno de los analitos únicamente, como mezclas de los dos. Se eligieron fármacos en varias formas de presentación, comprimidos, sobres, etc.

Los resultados obtenidos para cada uno de los preparados farmacéuticos están en buena concordancia con los datos suministrados por los fabricantes. Asimismo se emplearon dos métodos de referencia, el método fluorimétrico oficial de la AOAC[1] (basado en la oxidación de tiamina a tiocromo con ferricianuro potásico) y un método de HPLC[2] en fase inversa empleando una columna nucleósil de C_{18}, agua a pH 2 como fase móvil y detección UV a 285 nm, para la determinación de tiamina y piridoxina, respectivamente. Los resultados se ilustran en la *Tabla.*

Tabla V.19. Determinación de Tiamina y Piridoxina

	Tiamina			Piridoxina		
	C (mg)	Encontrado[a] (mg±RSD)		C (mg)	Encontrado[a](mg±RSD)	
Fármacos		*Sensor*	*Ref.*		*Sensor*	*Ref.*
Benerva Roche[c]	300	297.2± 0.5	298.3± 0.7	-	-	-
Benadon Roche[c]	-	-	-	300	298.1± 0.7	297.4.±0.6
Agudil[c]	-	-	-	10	10.1 ± 0.1	10.2± 0.3
Antomiotopic[c]	-	-	-	25	26.8 ± 0.2	25.1± 0.5
Nervobión[cp]	100	99.1 ± 0.1	103.2± 0.6	100	98.5 ± 0.1	97.6± 0.5
Dolo-Nervobión[cp]	50	51.9 ± 0.1	49.8± 0.4	200	199.5± 0.3	200 ± 1
Antineurina[i]	125	118.4 ±0.6	127.1± 0.8	125	131.1± 0.1	124.1± 0.5
NeurodavurPlus[i]	50	50.1 ± 0.6	50.6± 0.9	50	50.0 ± 0.4	51.3± 0.7
Actilevol Orex[s]	50	51.3 ± 0.4	50.8± 0.7	50	52.0 ± 0.2	51.1± 0.9
Trimetabol[j]	30	30.2 ± 0.1	28.5± 0.5	30	29.6 ± 0.2	28.4± 0.4
Calcinatal[c]	5	4.9 ± 0.5	4.7± 0.9	10	9.9 ± 0.1	9.8± 0.8

[a]Media de tres determinaciones

[c]Comprimidos, [cp]Cápsulas, [i]Inyectables, [s]Sobres,[j]Jarabe

[1] AOAC Official Methods of Analysis, 15th ed.; Association of Official Analytical Chemists, Inc.: rlington, VA, 1990; Vol.2

[2] N. Ramos-Martos, F. Aguirre-Gómez, A. Molina-Díaz, L.F. Capitán-Vallvey, J. AOAC Intern., 84 (3) (2001) 676.

Se realizó también un estudio de recuperación para cuatro de los fármacos ensayados, y los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla V.20. Estudio de recuperación para el sensor biparámetro

	Tiamina		***Piridoxina***	
Fármacos	Añadido (mg/u)	Recup.[a] ± RSD (%)	Añadido (mg/u)	Recup[a] ± RSD (%)
Benerva	50 75 100	100.3 ± 0.6 97 ± 1 99 ± 1	-	-
Antomiotopic	-	-	15 30 75	99.6 ± 0.3 99 ± 1 100 ± 2
Nervobión	25 50 75	98.9 ± 0.5 99 ± 1 100 ± 1	25 50 75	99.8 ± 0.4 98 ± 1 101± 2
Dolo-Nervobión	12 25 75	101 ± 3 99 ± 2 99 ± 1	50 100 150	101.2 ± 0.6 102 ± 1 100 ± 1

[a]Media de tres determinaciones

Debemos indicar que los resultados son totalmente satisfactorios, en la aplicación del sensor biparámetro propuesto.

7.2.3. Sensores Multiparámetro

Determinación de analgésicos-cafeína

Los dos sensores multiparámetro propuestos para la determinación de mezclas ternarias de analgésicos y cafeína fueron aplicados a la determinación de estos principios activos en preparados farmacéuticos. Como en el caso anterior se eligieron preparado farmacéuticos en varias formas de presentación para probar la aplicabilidad del sensor independientemente de esta variable.

El sensor triparámetro para la determinación de **paracetamol, cafeína y propifenazona**, fue aplicado a preparados farmacéuticos que contuvieran uno, dos o los tres analitos indicados. En general se empleó el sensor desarrollado a pH 5.8, para la resolución de mezclas ternarias, sin embargo en los casos de que la relación PCT/CF sea superior a 30, no es posible la resolución simultánea, como se indicó anteriormente, por ello es necesario emplear la calibración a pH 12.0, que se realizó para estos analitos, puesto que a este pH la señal del PCT decrece de manera que su señal se hace del orden de la de la CF, permitiendo la determinación simultánea de los dos analitos.

Es importante destacar que estas mezclas en las que la relación entre la composición de PCT y CF es tan alta, podrían resolverse a pH 5.8, inyectando sucesivamente dos alícuotas de diferente y adecuada concentración de muestra en el sistema, de esta forma la determinación no sería simultánea (determina dos analitos con una única inyección) sino secuencial (determina dos analitos con dos inyecciones).

En el caso del fármaco "Melabón" (* en la tabla), que contiene PCT y CF en una relación muy alta, podría emplearse el sensor a pH 12.0, sin embargo, la composición en propifenazona hace necesaria una segunda inyección de muestra para determinarla, así pues existen dos posibilidades para este caso:

- Tomar dos alícuotas de una muestra e inyectar una de ellas a pH 5.8, determinando PFZ y PCT, y la otra a pH 12.0, determinando CF (y PCT si se desea).
- O bien, realizar dos inyecciones sucesivas a pH 5.8, la primera de ellas para determinar PCT y PFZ, y con una segunda alícuota más concentrada, determinaremos CF (PCT y PFZ, se saldrán del rango de calibración).

En nuestro caso preferimos la primera opción, para obtener los datos de la misma muestra preparada a partir del fármaco directamente.

La tabla siguiente muestra los resultados obtenidos indicando si se empleó la calibración del sensor a pH 5.8 ó 12.0. Se observa en todos los casos una recuperación entre 96.8% y 102.0% respecto del contenido declarado por el fabricante.

Tabla V .21. Determinación de paracetamol, cafeína y propifenazona

		Recuperación[1] ± SD (%)		
Fármacos	**PCT:CF:PFZ**	**PCT**	**CF**	**PFZ**
Apiretal[s,2]	100:0:0	99.9 ± 0.5	-	-
Duorol[sb,2]	500:0:0	101.4 ± 0.2	-	-
Gelocatil[c,2]	650:0:0	100.1 ± 0.6	-	-
Termalginc[,2]	500:0:0	99.7 ± 0.4	-	-
Cafergot[g,2]	0:100:0	-	100.8 ± 0.9	-
Durvitan[cp,2]	0:300:0	-	97.7 ± 0.2	-
Cibalgina[g,2]	0:0:220	-	-	101.1 ± 0.3
Dolodens[g,2]	0:0:100	-	-	98.5 ± 0.4
Analgilasa[c,3]	500:30:0	98.9 ± 0.2	100.8 ± 0.6	-
Hemicraneal[c,2]	300:100:0	100.1 ± 0.9	101.7 ± 0.1	-
Ilvico[sb,3]	500:30:0	98.9 ± 0.5	98.9 ± 0.3	-
Saldeva Forte[c,3]	500:50:0	102.0 ± 0.8	100.8 ± 0.4	-
Optalidon[g,2]	0:25:175	-	97.6 ± 0.3	99.8 ± 0.2
Tonopan[g,2]	0:40:175	-	101.5 ± 0.5	96 ± 1
Melabon[cp,*]	350:8:200	99.3 ± 0.1	101.9 ± 0.8	99.9 ± 0.2
Meloka[cp,2]	300:10:250	100.9 ± 0.4	98.6 ± 0.6	100.5 ± 0.7
Saridon[c,2]	250:50:150	96.8 ± 0.5	97.5 ± 0.8	99.6 ± 0.3

[1]Media de tres determinaciones [s]Solución,[g]Grageas,[c]Comprimidos [cp]Cápsulas,[sb]Sobres

[2]Sensor a pH 5.8

[3]Sensor a pH 12.0

Se realizó asimismo un estudio de recuperación adicionando cantidades conocidas de los analitos a algunos de estos fármacos, los porcentajes de recuperación oscilan entre 96.3 y 100.5 %. Los datos se muestran en la *Tabla V.22*.

Tabla V.22. Estudio de recuperación para el sensor de PCT, CF y PFZ

	PCT		CF		PFZ	
Fármacos	*Añadido (mg/u)*	*Recup[1]±SD (%)*	*Añadido (mg/u)*	*Recup[1]±SD (%)*	*Añadido (mg/u)*	*Recup[1]±SD (%)*
Apiretal[2]	50 100 200	100.2 ± 0.5 97.5± 0.4 98.4 ± 0.3	-	-	-	-
Cafergot[2]	-	-	10 50 100	100 ± 1 99.9 ± 0.4 100.3 ± 0.1	-	-
Dolodens[2]	-	-	-	-	25 50 75	97.5 ± 0.3 98.4± 0.3 98.3 ± 0.2
Analgilasa[3]	30 60 90	96.9 ± 0.1 96.6 ± 0.3 97.2 ± 0.6	20 40 60	100.4 ± 0.3 99.9 ± 0.6 99.8± 0.4	-	-
Optalidon[2]	-	-	20 40 100	100.5 ± 0.1 100.3 ± 0.2 99.9 ± 0.1	100 150 200	100.1 ± 0.6 100.3 ± 0.4 99.6 ± 0.3
Meloka[2]	10 50 80	99.8 ± 0.7 98.6 ± 0.5 96.3 ± 0.6	20 40 70	100.2 ± 0.2 100.5 ± 0.3 99.6 ± 0.4	50 100 150	99.1 ± 0.1 97.3 ± 0.3 98 ± 1
Saridon[2]	20 40 80	98.5 ± 0.2 97.3 ± 0.3 99.9 ± 0.3	5 25 50	97 ± 1 100.1 ± 0.5 100.3 ± 0.6	25 50 100	99.1 ± 0.5 99.6 ± 0.3 97.8± .2

[1] Media de tres determinaciones
[2] Sensor a pH 5.8
[3] Sensor a pH 12.0

El otro sensor triparámetro de este tipo, se aplicó a la determinación de paracetamol-ácido acetilsalicílico y cafeína en muestras de fármacos comerciales que contenían diversas proporciones de estos analitos (mezclas ternarias, binarias y uno de los analitos aislado).

Para contrastar la fiabilidad de los datos obtenidos se empleó como método de referencia un método por HPLC[3] desarrollado para la determinación de diversos principios activos (ácido acetilsalicílico, cafeína, codeína, paracetamol, piridoxina y tiamina). Los resultados obtenidos por el sensor propuesto se expresan como porcentajes de recuperación respecto al método indicado y se recogen en la tabla siguiente.

[3] N. Ramos-Martos, F. Aguirre-Gómez, A. Molina-Díaz, L.F. Capitán-Vallvey, J. AOAC Intern., 84 (3) (2001) 676.

Tabla V.23. Determinación de paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína

	Recuperación[1] ± σ_mt (%)		
Fármacos	**PCT**	**ASA**	**CF**
Apiretal[s]	101±1	-	-
Okal[c]	-	100±1	
Durvitan[cp]	-	-	103±5
Cafiaspirina[c]	-	98±2	99±3
Desenfriol C[sb]	-	96.1±	100±3
Mejoral cafeina[c]	-	103±2	99±3
Pridio[cp]	102±3	-	97±3
Rinomicine[c]	99±2	-	103±4
Actron compuesto[c]	97±2	101±3	102±2
Cerebrino Mandri[sp]	103±5	103±5	105±4
Fiorinal[cp]	101±4	98±5	101±3
Neocibalena[c]	101±2	95±1	97±3

[1] Valor medio de tres determinaciones

[s]Solución, [c]Comprimidos, [cp]Cápsulas,[sb]Sobres,[sp]Suspensión

7.2.4. Sensor Multiparámetro

Determinación de pesticidas

Se tomaron tres muestras de cada origen y se adicionaron a cada una tres cantidades variables de los pesticidas.

Las medidas se realizaron por triplicado siguiendo el procedimiento descrito y se utilizaron los modelos optimizados de calibración, la matriz 13 para o-fenilfenol y tiabendazol, y la matriz 20 para el α-naftol. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla siguiente.

Tabla V.24. Determinación de pesticidas en aguas naturales

	α-Naftol (μg l⁻¹)			*o-Fenilfenol (μg l⁻¹)*			*Tiabendazol (μg l⁻¹)*		
	C puesta	C encon	Rec±σr (%)	C puesta	C encon	Rec±σr (%)	C puesta	C encon	Rec±σr (%)
1	-	-	-	150	145.0	103±4	-	-	-
2	80	85.3	94±4	-	-	-	75	81.5	92±6
3	275	288.0	95±5	275	261.1	105±4	50	49.2	102±7
4	-	-	-	-	-	--	15	13.1	114±4
5	125	115.0	109±2	50	44.4	113±3	-	-	-
6	5	4.6	108±6	3	2.6	117±7	35	36.5	96±2
7	50	49.6	101±2	-	-	-	-	-	-
8	-	-	-	20	24.2	82±3	300	299.8	100±2
9	500	472.0	106±3	350	352.5	99±2	150	131.3	114±2

Muestras 1-3: red de aguas de Jaén (Jaén)
Muestras 4-6: pantano Rumblar (Baños de la Encina, Jaén)
Muestras 7-9: río Grande (La Carolina, Jaén).

Los resultados obtenidos son muy satisfactorios empleando el sensor propuesto para la determinación de los analitos estudiados en aguas de origen natural. El porcentaje de recuperación varía entre 82 y 117 % con desviaciones estándar relativas menores de 7 en todos los casos.

Este sensor también es susceptible de ser aplicado a la determinación del precursor de α-naftol, carbaril, muy usado también como pesticida y que sufre una rápida hidrólisis en medio básico, que permite su determinación como α-naftol, determinándose conjuntamente.

Como conclusión de este apartado de Aplicaciones, podemos decir que los sensores propuestos en esta Memoria satisfacen el principal objetivo de un método analítico, su aplicabilidad al análisis en muestras reales, siendo éstas de muy diferente naturaleza. Es necesario comentar que no se han elegido todos los tipos posibles de muestras reales en los que se podrían aplicar los sensores, abriéndose pues una abanico mucho más amplio de potenciales aplicaciones.

VI. Conclusiones y perspectivas

Los objetivos iniciales de esta Memoria eran el desarrollo de nuevos métodos de análisis por inyección en flujo no segmentado con detección espectroscópica en fase sólida, basados en la medida de una propiedad intrínseca del(os) analito(s): absorción o emisión molecular, sin necesidad de reacción derivadora, por fijación transitoria del(os) mismo(s) sobre un soporte (resina de intercambio iónico o gel de sílice C_{18}) en la zona de detección, que después se regenera convenientemente.

Como consecuencia del estudio realizado, se han obtenido las siguientes conclusiones generales:

1. Se han desarrollado sensores en flujo monoparámetro luminiscentes que permiten la determinación rápida y directa, en fármacos y suero, de diuréticos de amplio uso farmacológico, amilorida y triamtereno.
2. Los multisensores espectrofotométricos propuestos permiten la resolución simultánea, es decir, mediante una única inyección de muestra, de mezclas binarias y ternarias de analitos que aparecen frecuentemente asociados en preparados farmacéuticos: tiamina y piridoxina; paracetamol, cafeína y propifenazona; y paracetamol, ácido acetilsalicílico y cafeína.
3. Se han estudiado y optimizado las variables experimentales que afectan a la respuesta de los seis sensores, que se pueden clasificar en tres grupos principales, variables de la unidad de retención-detección, variables químicas y variables del sistema de flujo continuo. Asimismo se optimizaron las variables instrumentales en el caso de los sensores luminiscentes.
4. Por primera vez se propone el empleo on line de una precolumna como estrategia en el desarrollo de sensores espectroscópicos en flujo para determinaciones multicomponente. Dicha precolumna consigue una secuenciación temporal en la llegada de los analitos a la zona de detección, basándose en el comportamiento diferencial de los mismos frente a su cinética de retención-elución en dicha precolumna.
5. El empleo de un soporte sólido activo en la misma zona de detección proporciona, en todos los casos, un incremento considerable de la sensibilidad así como una exaltación de la selectividad con respecto al método convencional en disolución, como consecuencia de la retención selectiva y la preconcentración del analito en la zona de detección. Gracias al empleo de este soporte sólido la retención-separación (con exclusión de interferentes) y la detección se producen al mismo tiempo y en el mismo lugar del sistema de flujo.

6. Se ha realizado un estudio de la tolerancia de los sensores propuestos frente a la presencia de especies extrañas, encontrándose que los sensores desarrollados muestran una notable selectividad, muy superior a los métodos equivalentes sin soporte sólido.
7. Se ha desarrollado un multisensor luminiscente para la determinación simultánea de α-naftol, o-fenilfenol y tiabendazol, usando calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales. Dicho sensor también podría usarse para la determinación de la mezcla ternaria carbaril, o-fenilfenol y tiabendazol, previa hidrólisis del carbaril a α-naftol.
8. Se ha demostrado la aplicabilidad de todos los sensores desarrollados al análisis de los respectivos compuestos orgánicos en muestras de diversa naturaleza (fármacos, suero sanguíneo y aguas naturales). La exactitud se chequeó mediante estudios de recuperación y/o comparación con métodos de referencia.
9. Los sistemas en flujo continuo con detección espectroscópica en fase sólida que en esta Memoria se recogen para determinaciones multicomponente suponen nuevas contribuciones y aportan nuevas estrategias en el desarrollo de este tipo de sistemas. Constituyen una respuesta sencilla al reto en el desarrollo y avance en este campo de la Química Analítica, aportando métodos sencillos económicos y rápidos para la resolución de problemas analíticos reales en el campo del análisis farmacéutico y ambiental. A su vez, abren nuevas perspectivas para el desarrollo de futuras tendencias que se muestran muy prometedoras en este campo de investigación.

VII. Anexo

En este Anexo se recogen los artículos desarrollados por el autor de la presente Memoria sobre el Proyecto de Tesis presentado y admitido a trámite con fecha 21 de diciembre de 2001.

Cinco de ellos han sido publicados en revistas científicas especializadas en el área de Química Analítica de carácter internacional, mientras que el último de ellos está pendiente de publicación y se incluye en el formato propio de un artículo de acuerdo con las Normas reguladoras (artículo 32.2) de los estudios de Tercer Ciclo y del Título de Doctor por la Universidad de Jaén.

A continuación se detallan los artículos y sus referencias:

TITULO: Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow through biparameter sensor.
AUTORES: P. Ortega Barrales, A. Domínguez Vidal, M. L. Fernández-De Córdova, A. Molina-Díaz
REVISTA: J. Pharm. Biomed. Anal. 25 (2001) 619-630.

TITULO: Fast flow-injection fluorimetric determination of amiloride by using solid sensing zone.
AUTORES: A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz
REVISTA: Talanta, 56 (2002) 1005-1013.

TITULO: Determination of triamterene by transitory retention in a continuous flow solid phase system with fluorimetric transduction.
AUTORES: A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz
REVISTA: J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 721-728.

TITULO: UV Spectrophotometric flow through multiparameter sensor for the simultaneous detemination of acetaminophen, acetylsalycilic acid and caffeine.
AUTORES: A. Domínguez Vidal, J.F. García Reyes, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz
REVISTA: Analytical Letters. 35 (15) (2002) 2433-2447.

TITULO: Simultaneous determination of paracetamol, caffeine, and propyphenazone in pharmaceuticals by means of a single flow-through UV multiparameter sensor..
AUTORES: A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, A. Molina-Díaz
REVISTA: Microchimica Acta 141 (2003) 157-163.

TITULO: A chemometric flow-through multioptosensor based on implementation of PLS analysis with fluorimetric transduction for the determination of a ternary pesticide mixture.
AUTORES: A. Domínguez Vidal, P. Ortega Barrales, B. Muik, M.J. Ayora Cañada, A. Molina Díaz
REVISTA: pendiente de enviar