

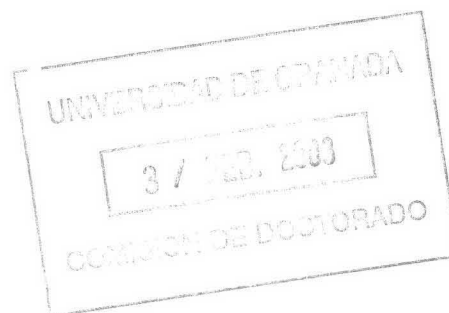
5/177

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE CIENCIAS

Departamento de Química Analítica

UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha ... 18/02/03
ENTRADA NUM. ... 463



TESIS DOCTORAL

**DESARROLLO DE OPTOSENSORES FLUORESCENTES
PARA LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS
FARMACOLÓGICOS Y CONTAMINANTES
AMBIENTALES EN MUESTRAS REALES**

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613576173
Nº Copia 1558641x

Jorge Fernando Fernández Sánchez

Granada, 2003



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Departamento de Química Analítica

**DESARROLLO DE OPTOSENSORES FLUORESCENTES
PARA LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS
FARMACOLÓGICOS Y CONTAMINANTES
AMBIENTALES EN MUESTRAS REALES**

Jorge Fernando Fernández Sánchez

**Tesis Doctoral
Granada, 2003**

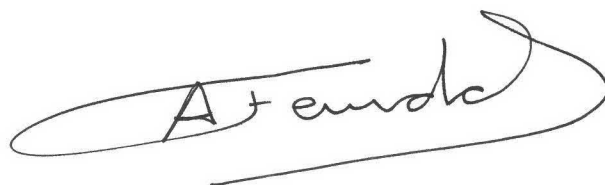
Esta Tesis ha sido financiada por el Ministerio de Ciencia y Tecnología (proyecto PPQ2000-1291-C02), la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (contrato nº 1870) y los fondos propios del grupo FQM-297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario” del Plan Andaluz de Investigación y Desarrollo Tecnológico.

**DESARROLLO DE OPTOSENSORES FLUORESCENTES PARA LA
DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACOLÓGICOS Y
CONTAMINANTES AMBIENTALES EN MUESTRAS REALES**

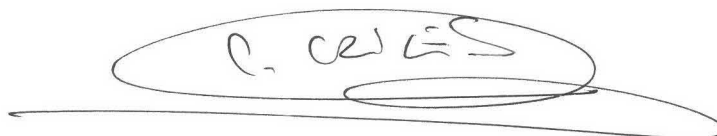
por

Jorge Fernando Fernández Sánchez

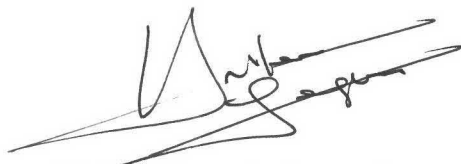
Visado en Granada a 24 de enero de 2003



Fdo: Dr. D. Alberto Fernández Gutiérrez
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

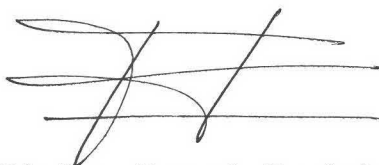


Fdo: Dra. Carmen Cruces Blanco
Profesora Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada



Fdo: Dr. Antonio Segura Carretero
Profesor Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Granada

Trabajo presentado para optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.



Fdo. Jorge Fernando Fernández Sánchez

D. ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ, Catedrático del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y responsable del Grupo de Investigación FQM 297 “Control Analítico Ambiental, Bioquímico y Alimentario”

CERTIFICA

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL con el título “DESARROLLO DE OPTOSENSORES FLUORESCENTES PARA LA DETERMINACIÓN DE PRINCIPIOS ACTIVOS FARMACOLÓGICOS Y CONTAMINANTES AMBIENTALES EN MUESTRAS REALES”, ha sido realizada bajo mi dirección y la de los doctores Dña. Carmen Cruces Blanco y D. Antonio Segura Carretero en los laboratorios del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Químicas.

Y para que conste, expido y firmo el presente certificado en Granada a veinticuatro de enero de dos mil tres.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "A. Fernández", enclosed within a large, sweeping, horizontal oval stroke.

En primer lugar, quiero expresar mi más sincero agradecimiento a los doctores D. Alberto Fernández Gutiérrez, Dña. Carmen Cruces Blanco y D. Antonio Segura Carretero, directores de esta Memoria, por su constante estímulo, orientación, apoyo, ayuda y dedicación incondicional que han hecho posible el desarrollo de la misma. Quiero darles las gracias además por dirigir también mi camino personal, por haber confiado en mí y haberme apoyado en todos los momentos y sobre todo por el cariño que me habéis dado.

Gracias a mis compañeros del Departamento de Química Analítica pues de una manera u otra han participado en esta Tesis. Y en especial a mis compañeros (mi "segunda familia") Bea, Eva, Sonia, Alfonso, David, Alegría, Silvia, Manolo ("el chileno") Lourdes y Miguel. Gracias por haberme ofrecido vuestra ayuda y haber tenido paciencia conmigo en los momentos difíciles. También quiero daros gracias por vuestra simpatía, risas y cafés y manzanillas y churros y mantecados y chucherías y chupitos de anís y... los momentos compartidos con vosotros han hecho más llevaderos los días de realización de esta Tesis.

Quiero agradecer también a mis compañeros del Grupo de Investigación "Calidad en Química Analítica Alimentaria, Ambiental y Clínica", Laura, Jorge, Fefo y Mari Carmen y a los profesores D. Luis Cuadros y Dña. Ana María García Campaña por su ayuda tanto técnica como personal.

Agradezco a mis tutores D. Manuel Román Ceba y D. Fermín Alés Barrero por haberme orientado en mi formación predoctoral.

Al Grupo de Investigación "Espectrometría Analítica" del Departamento de Química Física y Analítica de la Universidad de Oviedo y en especial a Gloria, Giuseppe, Juan, Bea, Pablo, Rubén, Julio, Jorge, Traví, Marta, Israel... (perdonad si se me olvida alguien pero sois muchos) y a los doctores D. Alfredo Sanz Medel, Dña. Rosario Pereiro, Dña. Nerea Bordel y D. José Manuel Costa por haberme acogido en vuestra "casa", haberme hecho sentir como en la mía y por enseñarme tantas cosas a

nivel profesional y personal en tan poco tiempo. Esta Tesis también lleva un trocito vuestro.

A mi familia, a mi madre, mi hermana y mi tío Francís, a mi familia política y a Mayca, mi novia (futura esposa muy pronto, si Dios quiere), mencionarlos especialmente por su ánimo, por aguantar mis bajones y mis malos momentos, por apoyarme, por aconsejarme y por tomar como suyas mis decisiones.

A mis amigos, Miguel Ángel, María Jesús, Carmen, Alberto, Olga, David, Jaime, Arsenio, Mónica, Juan Pablo, Memí, Laura, Emilio, Ylenia, José, Eduardo, Carolina, Antonio y Ana, por desconectarme en el fin de semana del trabajo y por hacerme pasar buenos "ratícos". "Si no fuera por estos ratícos....", eh Miguel?

Y por último deseo dar la gracias a la Fundación UNICAJA y a la Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía por las becas de investigación de las que he disfrutado y que han hecho posible la realización de esta Memoria.

A todos muchas gracias por todo.



A la Memoria de mi Padre

“Tantas cosas he aprendido de usted... He aprendido que todo el mundo quiere vivir en la cima de la montaña, sin saber que la verdadera felicidad está en la forma de subir la escarpada... He aprendido que cuando un recién nacido aprieta con su pequeño puño, por primera vez, el dedo de su padre, lo tiene apretado por siempre...”

Gabriel García Márquez

“No sé cómo puedo ser visto por el mundo, pero en mi opinión, me he comportado como un niño que juega al borde del mar, y que se divierte buscando de vez en cuando una piedra más pulida y una concha más bonita de lo normal, mientras que el gran océano de la verdad se exponía ante mí completamente desconocido”

Isaac Newton



ÍNDICE



Índice	15
Objeto de la Memoria.....	21
Introducción	25
Parte A. Sensores: conceptos y generalidades.....	27
A.1 Importancia actual, definición y componentes de los sensores.....	31
A.2 Diseño de un sensor.....	36
A.3 Clasificación de los sensores	37
A.4 Sensores ópticos.....	40
A.5 Sensores tipo célula de flujo (optosensores).....	44
Parte B. Metodologías analíticas de screening	55
B.1 Generalidades, definición y características de los test de screening	59
B.2 Clasificación de los test de screening	62
B.3 Test de screening para principios activos	64
B.3 Test de screening para hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	66
Parte C. Instrumentación en el desarrollo de sensores fluorescentes.....	69
C.1 Aspectos generales.....	73
C.2 Fuentes de excitación	74
C.3 Selectores de longitud de onda	77
C.4 Fibras ópticas.....	79
C.5 Compartimento de muestra.....	82
C.6 Detectores y sistemas de detección.....	83
Parte D. Redes neuronales en Química Analítica.....	89
D.1 Introducción a las redes neuronales artificiales	93
D.2 Estructura de las redes neuronales artificiales.....	97

D.3 Modelos de redes neuronales.....	99
D.4 Funcionalidad de las redes neuronales artificiales: reglas de aprendizaje y generalización.....	101
D.5 Método de aprendizaje por retropropagación de errores (backpropagation)	108
D.6 Ventajas y desventajas en el uso de las Redes Neuronales.....	112
D.7 Aplicación de las redes neuronales a la Química Analítica	113
Reactivos, instrumentación y metodología.....	119
1 Reactivos y disoluciones	123
2 Instrumentación.....	127
3 Metodología.....	131
Capítulo I. Desarrollo de un optosensor fluorimétrico para la determinación de nafronil en preparados farmacéuticos.....	153
1 Generalidades del nafronil.....	157
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	160
3 Características analíticas del método.....	176
4 Aplicaciones del método propuesto	180
Capítulo II. Desarrollo de un optosensor fluorimétrico para la determinación de naproxeno en preparados farmacéuticos y fluidos biológicos.....	183
1 Generalidades del naproxeno	187
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	197
3 Características analíticas del método.....	215
4 Aplicaciones del método propuesto	219

Capítulo III. Desarrollo de un optosensor fluorimétrico para la determinación de propranolol en preparados farmacéuticos y de un test de screening para el control de propranolol en fluidos biológicos	225
1 Generalidades del propranolol.....	229
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	237
3 Características analíticas del método.....	255
4 Aplicaciones del método propuesto	258
5 Test de screening para el control de propranolol en muestras de orina.....	260
Capítulo IV. Desarrollo de un optosensor de fibra óptica para la determinación de naproxeno y propranolol en muestras de orina humana	267
1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	271
2 Características analíticas de los métodos.....	275
3 Comparación entre los optosensores convencionales y los optosensores de fibra óptica para la determinación de principios activos farmacológicos.....	283
Capítulo V. Caracterización fluorimétrica en fase sólida de hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	285
1 Generalidades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	289
2 Establecimiento de las condiciones experimentales para el desarrollo de fases sensoras para hidrocarburos aromáticos policíclicos.....	308
Capítulo VI. Desarrollo de un optosensor fluorimétrico para la determinación de benzo[a]pireno en aguas de consumo humano.....	325
1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	329
2 Características analíticas del método.....	347

3 Selectividad del optosensor propuesto.....	351
4 Aplicaciones del método propuesto	354
Capítulo VII. Desarrollo y comparación de un optosensor fluorimétrico convencional, un optosensor de fibra óptica usando como detector una CCD y el uso de redes neuronales para la determinación de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno en agua.....	363
1 Desarrollo de un optosensor fluorescente para la determinación conjunta de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un fluorímetro convencional	369
2 Desarrollo de un optosensor fluorescente de fibra óptica para la determinación simultánea de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un equipo modular equipado con una CCD	406
3 Utilización de la inteligencia artificial (redes neuronales) para la utilización del optosensor convencional en la determinación conjunta y simultánea de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno	433
4 Comparación de los optosensores desarrollados para la determinación conjunta y simultánea de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno	451
Conclusiones	457
Abreviaturas.....	463
Publicaciones derivadas de la Tesis.....	469

OBJETO DE LA MEMORIA

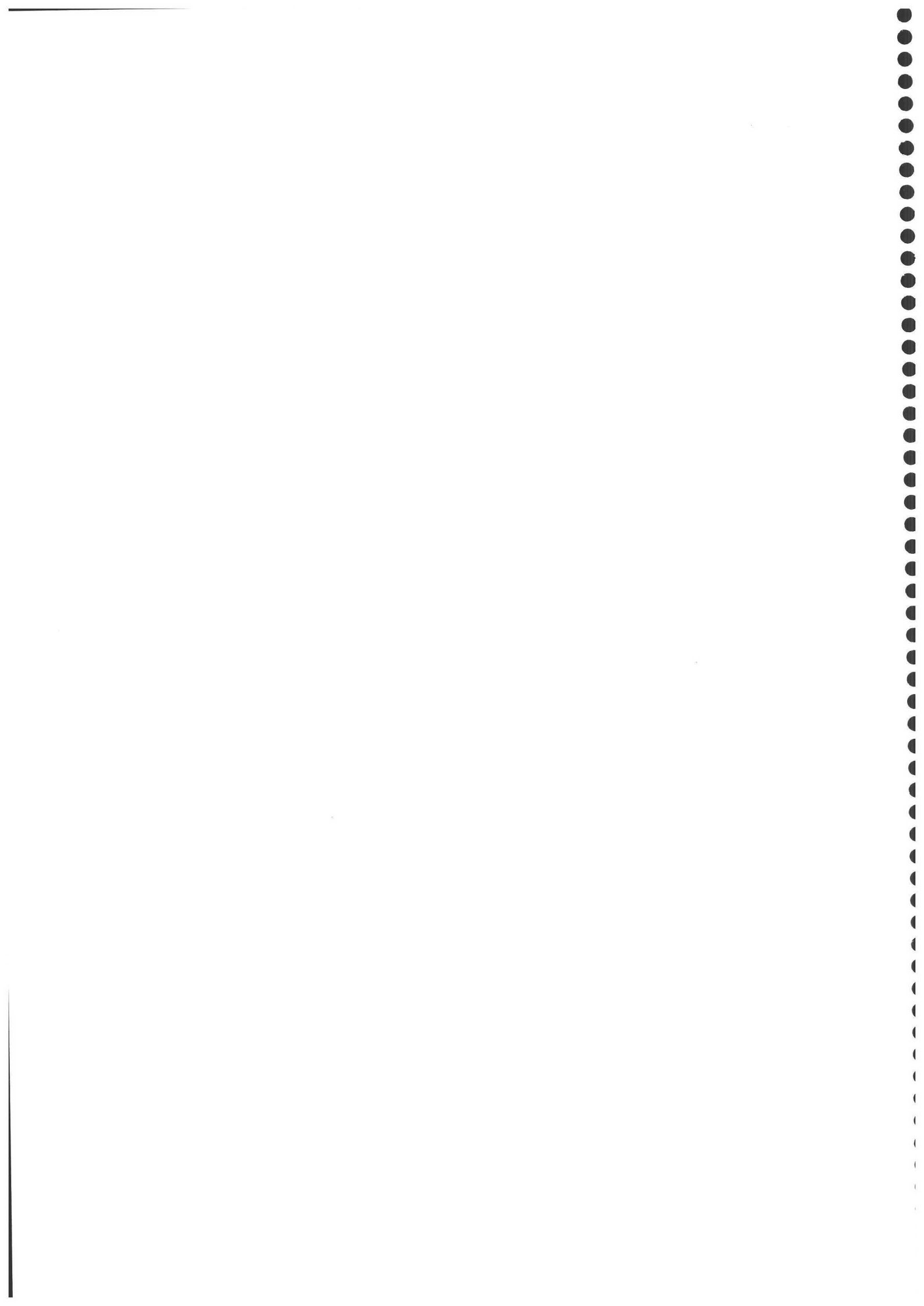


OBJETO DE LA MEMORIA

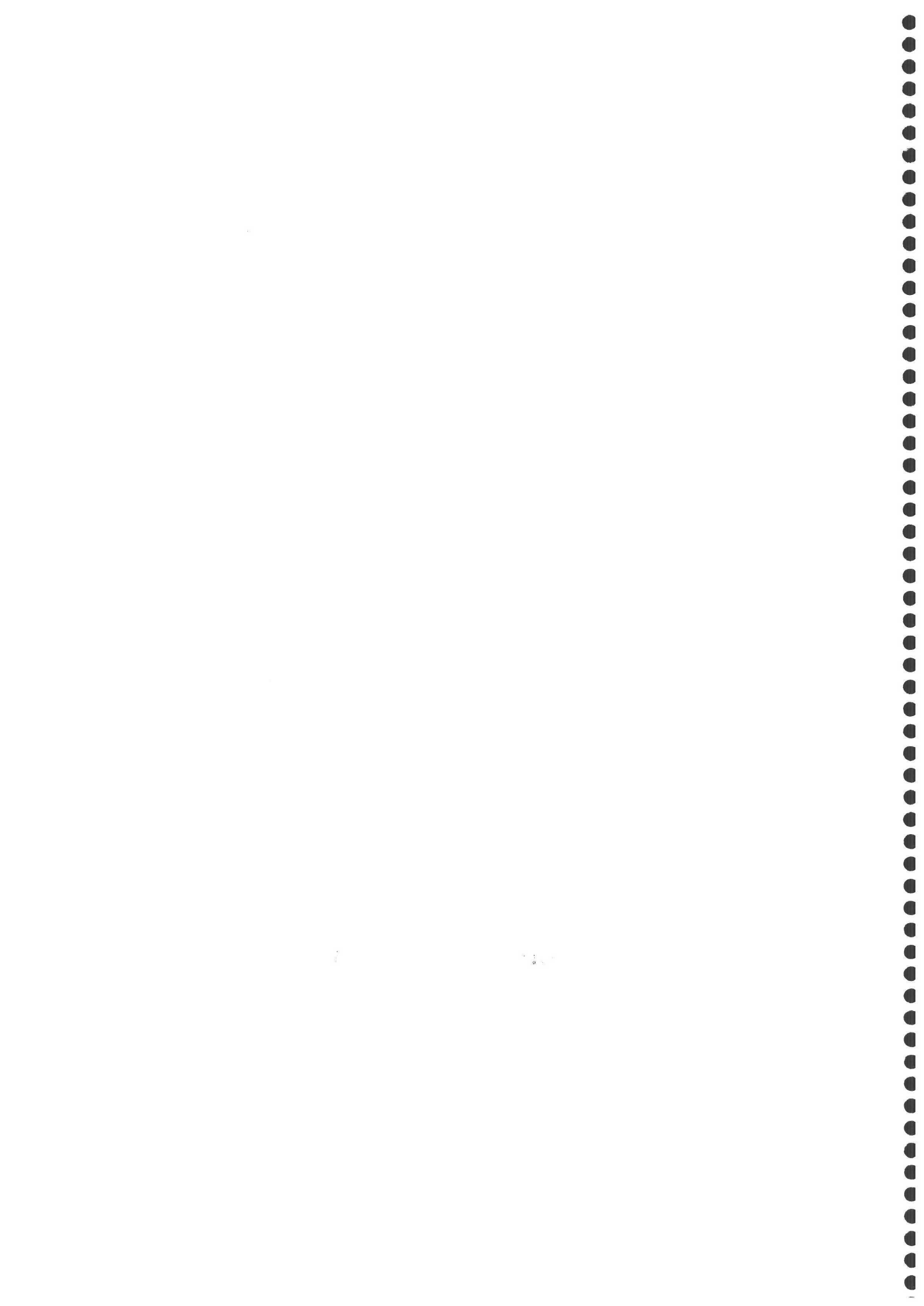
Uno de los retos de la Química Analítica actual es el desarrollo de sensores químicos que sean rápidos, fiables y sencillos, que permitan monitorizar la concentración de una especie o de un grupo de compuestos de forma selectiva, continua y a tiempo real. Entre otro, los sensores fluorescentes proporcionan, además, metodologías analíticas que pueden ser utilizados en campos tan variados y complejos como son el análisis clínico, el control ambiental y/o de los procesos industriales, para así poder evaluar una determinada especie en fluidos biológicos, el impacto ambiental o la calidad de los productos, respectivamente, proporcionando un herramienta muy útil para el análisis de rutina.

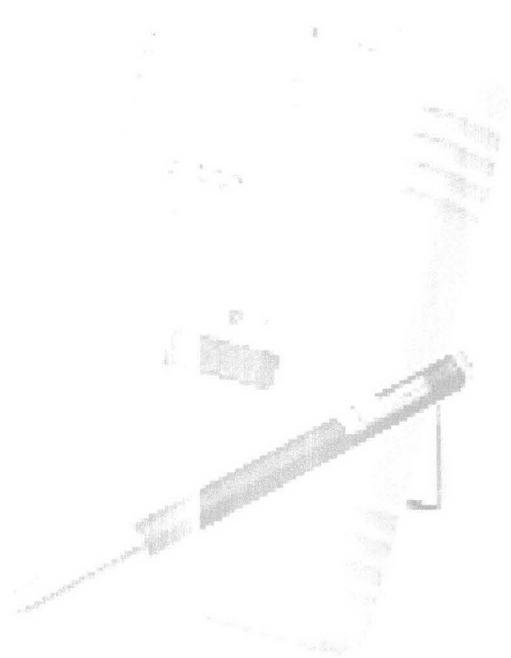
El objetivo principal de la presente Tesis Doctoral es el desarrollo de sensores fluorescentes en flujo (optosensores) y demostrar su aplicabilidad en laboratorios de rutina de análisis clínicos, control ambiental y/o industrial.

Para la consecución del objetivo principal se perseguirán dos objetivos secundarios: el desarrollo de optosensores fluorescentes para la determinación selectiva de una determinada especie (monoparamétricos) y el desarrollo de optosensores fluorescentes para la determinación conjunta de analitos de una misma familia química (multiparamétricos). Así mismo, se demostrará su aplicabilidad evaluando sus características analíticas en Química Analítica Clínica (análisis de principios activos en fluidos biológicos), en el control ambiental (análisis de hidrocarburos aromáticos policíclicos en aguas de consumo humano) y en el control industrial (análisis de principios activos en preparados farmacéuticos) haciendo uso de todas las herramientas disponibles para la obtención de dispositivos miniaturizables y automatizables, para lo cual se llevará a cabo un desarrollo instrumental y se emplearán sistemas de inteligencia artificial en la resolución de mezclas.



INTRODUCCIÓN





PARTE A
Sensores: concepto y generalidades



INTRODUCCIÓN

PARTE A

SENSORES: CONCEPTO Y GENERALIDADES

A.1 Importancia actual, definición y componentes de los sensores.....	31
A.1.1 Importancia actual.....	31
A.1.2 Definición de sensor	33
A.1.3 Componentes básicos de un sensor.....	35
A.2 Diseño de un sensor	36
A.3 Clasificación de los sensores	37
A.4 Sensores ópticos	40
A.4.1 Generalidades.....	40
A.4.2 Clasificación de los sensores ópticos	43
A.5 Sensores tipo célula de flujo (optosensores)	44
A.5.1 Análisis por inyección en flujo.....	45
A.5.2 Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas en flujo	46
A.5.4 Clasificación de los sensores de flujo.....	48
A.5.5 Características que deben cumplir los sensores de flujo	49
A.5.6 Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo	50
A.5.7 Revisión bibliográfica.....	50



A.1 Importancia actual, definición y componentes de los sensores

A.1.1 Importancia actual

La creciente demanda de técnicas de análisis químico rápidas, fiables y sencillas ha provocado un enorme interés en la búsqueda y desarrollo de nuevas tecnologías analíticas que den lugar a métodos de análisis y/o instrumentación sencilla para la monitorización directa, a tiempo real de un analito en una muestra y de forma reversible. La importancia actual de este objetivo explica el desarrollo exponencial que han experimentado los sensores químicos a lo largo de las últimas décadas.

El desarrollo de sensores químicos ha sido y es muy importante en campos tan variados como la medicina, el control ambiental y en diversos aspectos de las actividades industriales, como la seguridad en minería o el control de procesos industriales, etc..

En el campo de la Química Clínica^{1,2}, la posibilidad de miniaturización de los sensores ha dado muy buenos resultados, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables) que pueden ser separados del módulo principal.

En el campo del control ambiental^{3,4}, el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida.

También se ha producido un importante incremento en la demanda de automatización en procesos industriales. Las medidas de parámetros químicos son necesarias para seguir y controlar un proceso. Así, en la Química Analítica de procesos, los métodos para el análisis on-line están basados en la disponibilidad de sensores químicos. La

-
1. C. Kolle, W. Gruber, W. Trettnak, K. Biebernik, C. Dolezan, F. Reiningger y P. O'Leary. "Fast optochemical sensor for continuous monitoring of oxygen in breath-gas analysis". *Sens & Actuators B*, 38 (1997) 141.
 2. A. Elamari, N. Gisin, J.L. Muñoz, S. Poitry, M. Tsacopoulos y H. Zbinden. "Photon-counting optical-fibre sensor for the detection of ammonia in neurochemical applications". *Sens. & Actuators B*, 38 (1997) 183.
 3. W.R. Seitz en O.S. Wolfbeis (Ed.) "Fibre optic chemical sensors and biosensors". Vol. II, CRC Press., Boca Raton, Cap. 9, pág. 1 (1991).
 4. K.R. Rogers y J.N. Lin. "Biosensor for environmental monitoring". *Biosensors Bioelectron.*, 7 (1992) 317.

demanda más importante en la industria en cuanto a las características de los sensores son robustez, estabilidad con el tiempo o con la temperatura, además de cumplir con una biocompatibilidad en procesos biotecnológicos.

El empleo de sensores químicos en estos campos puede dar lugar a resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos, en la propia matriz de la muestra, es decir, “in situ”, reduciendo los costes de transporte y material de laboratorio, pues se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesidades para su análisis en el laboratorio, empleando los métodos clásicos para su confirmación. Además, la posibilidad de obtener medidas a tiempo real hace que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para análisis de rutina.

Los sensores químicos permiten realizar tres tipos de análisis que son aplicables al control analítico, dependiendo de las necesidades y que son:

- Control continuo en línea a tiempo real (monitorización).
- Control “alarma” regular.
- Control ocasional discreto o al azar.

Es de resaltar, que el éxito final de un sensor químico es su comercialización y venta, y para ello sus características de robustez, selectividad, sensibilidad, linealidad, inmunidad e interferencia y ausencia de efectos de matriz deben ser elevadas para poder competir con los análisis clásicos de laboratorio.

Después de aproximadamente dos décadas de investigación en la tecnología de los sensores, la mayor parte de los esfuerzos han dado como resultado únicamente curiosidades científicas en las universidades y en los institutos de investigación. En el presente, muy poco de la tecnología de sensores, y en particular de los sensores ópticos, comparada con los cientos de diseños existentes, ha sido convertida en productos comerciales.

Varios son los obstáculos para la comercialización de sensores. En primer lugar, características tales como sensibilidad, intervalo dinámico lineal, reproducibilidad y estabilidad demostradas para los sensores a nivel de laboratorio no son los suficientemente

cercanas a las necesidades del usuario. Además, aún cuando se logren valores óptimos, estas características se reducen drásticamente durante los distintos pasos en el desarrollo y producción en masa de un sensor. Por lo tanto, es importante realizar diseños con características químicas y físicas simples, que permitan el uso de tecnologías ya desarrolladas tanto como sea posible.

El segundo obstáculo es la necesidad de desarrollar sistemas integrados y de interfases. En el concepto de sensor es necesario tener en cuenta un paso posterior en el diseño de prototipos, y es que deben ser fácilmente utilizables por usuarios no habituales.

El tercer obstáculo concierne a lo no competitivo del campo de los sensores. La comercialización se torna difícil o imposible si no se defienden las verdaderas ventajas que éstos tienen sobre sus competidores basados en tecnologías ya desarrolladas y probadas.

Y por último, probablemente el factor más importante responsable de la lenta comercialización de sensores se debe al tipo de mercado al que va dirigido. Debido a la complejidad de estos sistemas, deben invertirse millones de euros para su desarrollo y, por lo tanto, hasta que no se hagan visibles los beneficios de estos mercados, las compañías privadas no estarán motivadas para investigar y transferir la tecnología de los sensores a la producción en cadena. Sin embargo, uno de los mercados en el que el desarrollo de sensores puede desempeñar un papel realmente importante es en varios sectores de la Química Analítica industrial, tales como controles ambientales de efluentes y análisis de control en la cadena de producción.

A.1.2 Definición de sensor

De forma general, se puede denominar “sensor” a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno⁵. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos en función de que detecten cambios en parámetros físicos (presión, temperatura, etc.) o bien parámetros químicos (pH, concentración de oxígeno, etc.). Los sensores físicos son sensores capaces de cuantificar

5. J. Janata y A. Bezegh. “Chemical sensors”. *Anal. Chem.*, 60 (1988) 62R.

fenómenos físicos y a los diseñados para medir especies (bio)químicas se les conoce como sensores (bio)químicos.

Resulta difícil dar una definición exacta y universal de lo que es un sensor químico. Según Roe *y col.*⁶ un “Sensor Químico Ideal” es un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC propone otra definición según la cual un “Sensor Químico Analítico” es un transductor miniaturizado que responde de manera selectiva y reversible a la presencia de compuestos químicos o iones dando lugar a señales eléctricas que dependen de la concentración de analito⁷.

Idealmente, un sensor químico debe operar de forma continua y reversible, directamente en la matriz de la muestra y debe tener la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real⁸. Otras condiciones que idealmente debería cumplir un sensor son las de ser portátil además de ser barato, tener mínimo mantenimiento y ser fácil de usar.

De hecho, el principal objetivo que se persigue con un sensor ideal es integrar dos de los tres pasos generales a seguir en la determinaciones analíticas: tratamientos preliminares, medida y transducción de la señal analítica.

Las prestaciones de un sensor son derivadas de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, compatibilidad con la presión, temperatura, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

Sin embargo, muy pocos sensores cumplen todas las anteriores especificaciones de forma estricta. De hecho, numerosos autores denominan también sensores a ciertos diseños que no son capaces de medir de forma continua la concentración de ciertas especies, es decir, que son irreversibles y sólo permiten una determinación. En este caso, hablamos de sensores “desechables o de un solo uso”⁵.

6. J.N. Roe, F.C. Szoka y A.S. Verkman. “Fibre optic sensor for the determination of potassium using fluorescence energy transfer”. *Analyst*, 115 (1990) 353.

7. A. Hulanicki, S. Glab y F. Ingman. IUPAC discussion paper, Commission V.I., July 1999.

8. M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro. “Flow-through (bio)chemical sensors”. *Analyst* 118 (1993) 593.

En determinadas ocasiones puede ocurrir que el sensor no sea lo suficientemente selectivo; en este caso, puede ser de gran ayuda la incorporación de alguna técnica simple de pretratamiento, en línea con la detección, para separar el analito de las especies interferentes presentes en la muestra⁹.

Así pues, en sentido amplio, podríamos acabar definiendo un sensor como cualquier dispositivo de uso sencillo que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos¹⁰, es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, respuesta que posteriormente es analizada y procesada.

A.1.3 Componentes básicos de un sensor

Un sensor químico capaz de informar sobre una especie química concreta consta básicamente de tres partes¹¹ (véase Figura 1):

1. **Zona química o zona de reconocimiento:** en la cual se produce la interacción selectiva con el analito de interés, lo que origina un cambio físico-químico del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar. Pueden usarse distintos tipos de interacciones como base de la química de reconocimiento: reacciones ácido-base, de complejación, interacciones electrostáticas, desactivación luminiscente, adsorción en una superficie activa, etc..
2. **Transductor físico:** que transforma en una señal analítica medible el cambio en alguna propiedad física del sistema producido por la interacción físico-química selectiva que tiene lugar con el analito de interés (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.).
3. **Elemento electrónico:** de tratamiento y medida de señales eléctricas.

La magnitud de la señal física obtenida se relaciona posteriormente con la concentración de analito a través de una curva de calibrado realizada previamente.

9. K. Cammann. "Continuous pollution-control by chemical sensors". *Sens. & Actuators B*, 6 (1992) 19.
10. R. Pereiro. Estudio de nuevas fases sólidas reactivas para sensores ópticos de elementos de interés biomédico: Análisis de aluminio y potasio". Tesis Doctoral, Universidad de Oviedo, 1991.
11. J. Janata. "Principles of chemical sensors". CRC Press. Boca Raton, FL, vol. 1 (1991).

En resumen, un sensor consiste en una capa químicamente sensible o sistema de reconocimiento, un transductor para convertir la información química en una señal eléctrica u óptica y una electrónica para la evaluación de datos, normalmente integrada en el sensor.

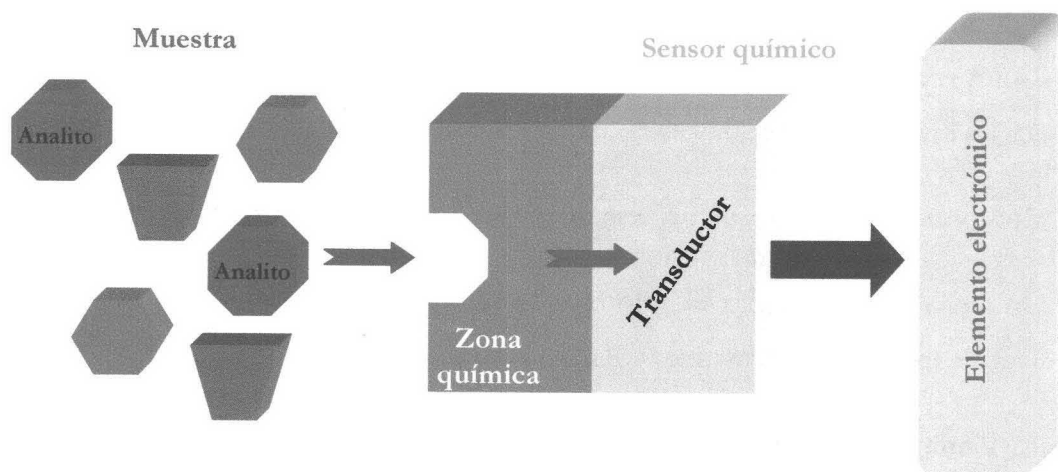


Figura 1. Partes de un sensor químico.

A.2 Diseño de un sensor

Los pasos básicos a seguir en el diseño de un sensor¹² para resolver un problema analítico particular están esquematizados en la Figura 2.

Las consideraciones prácticas de mayor importancia a tener en cuenta en el diseño de un sensor son:

1. **Mecanismo de reconocimiento.** La fase sensora debe reconocer la especie a determinar a través de una interacción fácilmente detectable y cuya magnitud sea función de la concentración del analito.
2. **Inmovilización del reactivo.** Existen diferentes métodos (adsorción pasiva, entrecruzamiento, enlace covalente, iónico, etc.) cada uno de ellos con sus ventajas

12. O.A. Sadik y J.M. Van Emon. "Designing immunosensors for environmental monitoring". Chemtech., 27 (1997) 38.

e inconvenientes. Debe tenerse en cuenta que dicha inmovilización puede alterar profundamente las características del analito en disolución.

3. **Transductores.** Según se midan cambios en alguna propiedad eléctrica, óptica, cambios de masa, etc., como consecuencia del reconocimiento, se puede hablar de transductores electroquímicos, ópticos, piezoeléctricos, etc..

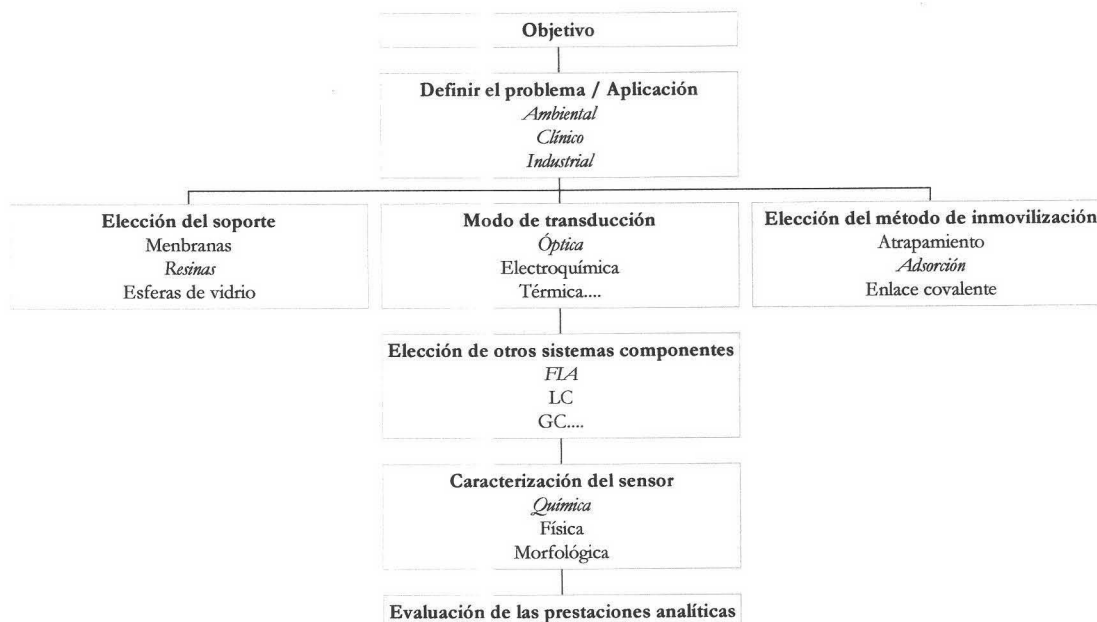


Figura 2. Esquema de las consideraciones a tener en cuenta en el diseño de un sensor.

A.3 Clasificación de los sensores

Se pueden establecer diferentes clasificaciones de los sensores utilizando diversos criterios. El gran interés que existe actualmente en el mundo de los sensores hace que estos se encuentren evolucionando continuamente y por tanto, es seguro que irán apareciendo otras clasificaciones a medida que se desarrollen nuevos tipos de sensores. Los criterios más utilizados y la clasificación de sensores correspondientes a cada criterio son los siguientes¹³:

13. J.M. Costa Fernández y A. Sanz Medel. "Sensores Químicos Fosforescentes a Temperatura Ambiente" en el libro A. Fernández Gutiérrez, S.G. Schulman (Eds) "Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica". Editorial Universidad de Granada, Granada, 2001.

- Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en **sensores químicos o bioquímicos**. Cuando la etapa de reconocimiento se lleva a cabo mediante un elemento sensible biológico (por ejemplo una enzima, un anticuerpo, una célula) el dispositivo resultante es conocido como biosensor. Así pues, la diferencia entre un sensor químico y un biosensor está en la reacción (química o biológica) de reconocimiento del analito. Los sensores (bio)químicos han sido ampliamente utilizados para aplicaciones ambientales, clínicas, biológicas e industriales.
- De acuerdo con la naturaleza de la interacción medible en **sensores reversible e irreversibles**.
- Según su forma externa en **sensores planos, tipo sonda o tipo célula de flujo**.
- En función de la relación entre la zona de reconocimiento y el transductor en **sensores conectados o integrados**.
- Teniendo en cuenta el modo de operación en **sensores de medidas discretas (sensores tipo sonda) o de medidas en flujo (optosensores)**.
- Considerando el número de especies a determinar en **sensores simples o múltiples**, (monoparamétricos y multiparamétricos, respectivamente).
- Atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han venido clasificando en **sensores eléctricos, ópticos, térmicos o piezoeléctricos**¹⁴.

Esta última clasificación basada en la naturaleza de la señal física que se genera o mide es bastante general y es la más ampliamente establecida. Por ello, se procede a describir de una forma más pormenorizada esta clasificación.

1. **Electroquímicos**: miden cambios en alguna propiedad eléctrica del sistema (potencial, intensidad de corriente, etc.) y el cambio producido en las magnitudes eléctricas es proporcional a la concentración de analito. Un caso particular importante son los ISFETs (transistores de efecto de campo) usados

14. T.E. Edmonds, Ed. "Chemical sensors". Blackie & Son, Reino Unido (1988).

principalmente como sensores potenciométricos, pero también es posible utilizarlos como sensores voltamperométricos o conductimétricos.

2. **Ópticos:** se producen cambios en alguna propiedad óptica del sistema (absorbancia, reflectancia, luminiscencia) relacionada con la concentración de la especie a cuantificar.
3. **Térmicos:** se miden calores de reacción o cambios en la temperatura del sistema.
4. **Piezoeléctricos:** se cuantifican cambios de masa, de viscosidad, etc..

También se han desarrollado otros sensores, aunque en menor medida, que utilizan otros tipos de detección, pudiendo citar: los de ondas acústicas de superficie y los magnéticos, en donde se utilizan medidas de paramagnetismo.

A la vista de esto, no existe un principio universal para el desarrollo de un sensor, ya que cada caso requiere una adaptación específica de un principio de medida, por lo que existen sensores basados en medidas eléctricas, ópticas, gravimétricas o principios térmicos. Una visión general de los principios básicos para el desarrollo de sensores se puede ver en la Tabla 1.

Tabla 1. Visión general de principios de funcionamiento o tipos de sensor

Principio de funcionamiento	Tipo de sensor
Cambio en la conductividad	Óxidos de metales semiconductores Semiconductores orgánicos
Cambio en el potencial	Electrodos selectivos de iones Sensores de gases en estado sólido Transistores de efecto de campo
Cambio de intensidad de corriente	Sensores amperométricos (electrodos de oxígeno y enzimas, inmunosensores, sonda de gases en estado sólido)
Cambio de la frecuencia de resonancia	Cristales piezoeléctricos resonantes
Cambio de propiedades ópticas	Transmisión/absorción, dispersión, reflectancia, fluorescencia, refracción, tiempo de decaimiento, polarización
Efectos térmicos	Sensores térmicos y calorimétricos

A.4 Sensores ópticos

A.4.1 Generalidades

La importancia y el potencial de los sensores químicos ha ido en aumento durante los últimos años. Los primeros trabajos desarrollados sobre sensores para especies químicas se enfocaron desde una perspectiva electroquímica (sensores potenciométricos y amperométricos). No obstante, el gran volumen de conocimiento de que se dispone hoy día sobre métodos óptico-espectroscópicos y las amplias posibilidades que los mismos ofrecen, han dado lugar a la búsqueda e investigación en el campo de los sensores con detección óptico-espectroscópica^{15,16}.

La conjugación de las excelentes propiedades que ofrecen las fibras ópticas como vías de transmisión de luz a través de grandes distancias con la abundante información química cuantitativa y cualitativa que se puede obtener mediante técnicas analíticas espectroscópicas han llevado, en las últimas décadas, a un desarrollo espectacular de los sensores de fibra óptica (también llamados “optrodo”¹⁷, término que resulta de la combinación de las palabras “óptico” y “electrodo” y que surge al observar cierta similitud entre el trabajo con un sensor óptico y un electrodo) para el análisis y/o control de parámetros de interés químico, medioambiental, clínico, etc..

Los sensores ópticos se basan en la inmovilización de una determinada fase sensora en el extremo de una fibra óptica o de un haz de fibras bifurcado. La interacción del analito a determinar con la fase sensora provoca un cambio en las propiedades ópticas de ésta que se recoge mediante la utilización de fibras ópticas. El uso de fibras ópticas permite “acercar el espectrómetro a la muestra”, mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite llevar a cabo medidas en la propia muestra (“in situ”).

Los pioneros en la utilización de fases sensoras inmovilizadas para llevar a cabo medidas continuas en fluidos biológicos fueron Luebbbers y Optiz¹⁸. Desde entonces numerosos trabajos han continuado esta línea de desarrollo de sensores de fibra óptica para llevar a cabo la medida de numerosas especies en muestras reales.

15. W.R. Seitz. “Chemical sensors based on fibre optics”. *Anal. Chem.*, 56 (1984) 16A.

16. O.S. Wolfbeis. “Fiber Optic Chemical Sensors”, CRC Press, Boca Raton, FL, vol. 1, 1991.

17. S.A. Borman. “Optrodes”. *Anal. Chem.*, 53 (1981) 616A.

18. D.W. Luebbbers y N. Optiz. *Naturforsch. ch. C. Biosci.*, 30c (1975) 532.

Es importante tener en cuenta que en numerosas ocasiones se habla de sensores ópticos para referirse, únicamente, a sistemas donde se emplean reactivos inmovilizados sobre soportes sólidos para la medida de forma continua, a través de una interacción química selectiva con el analito, sin la utilización de fibras ópticas. Sin embargo, en estos casos la fase sensora desarrollada debería acoplarse de manera sencilla a un sistema de fibras ópticas, paso último necesario para el desarrollo de un verdadero optrodo.

La sensibilidad, especificidad y versatilidad de los métodos ópticos han hecho de la espectroscopía una técnica muy popular sobre la cual se basan potenciales sistemas de control. En general, podemos decir que hay un elevado número de ventajas inherentes a los sensores ópticos que aconsejan el uso de los mismos frente a otros tipos de sensores, particularmente, frente a los electroquímicos. Éstas son:

- La señal óptica no está sujeta a interferencias eléctricas.
- No se requiere un sistema de referencia.
- No hay consumo significativo de analito por parte de la fase sensora, por lo que la muestra queda inalterada tras la medida.
- La fase activa no necesita estar en contacto con el sistema óptico. Esto simplifica extraordinariamente el desarrollo de sensores en los que la fase activa debe ser sustituida o reemplazada, lo cual resulta necesario cuando se desarrollan fases basadas en reactivos con vida limitada o en sensores de un solo uso (desechables).
- En algunos casos, utilizando un discriminador adecuado, es posible acoplar distintas fases ópticamente activas a un único sistema de transducción, lo cual da lugar a una importante disminución del costo y resulta una ventaja económicamente clara pues es posible la realización del análisis rápido de diversos analitos con un mismo equipo.
- Son susceptibles de ser miniaturizados, permitiendo el desarrollo de sensores de fibra óptica muy pequeños y flexibles.

- Ofrecen la posibilidad de resoluciones a varias longitudes de onda e información temporal, pudiéndose aplicar también técnicas de tiempo resuelto^{19,20}.
- Es posible desarrollar sensores ópticos para analitos que no pueden ser determinados por técnicas electroquímicas.
- Los sensores basados en la atenuación de la fluorescencia se pueden usar en un intervalo de concentraciones mucho más amplio que los sensores electroquímicos.
- En determinadas aplicaciones, como a la hora de realizar medidas biomédicas “in vivo”, los sensores ópticos son más seguros, evitándose el riesgo de un “shock” eléctrico.
- Algunos sensores ópticos pueden trabajar en intervalos de temperatura extremos lo que hace posible su esterilización a temperaturas elevadas.
- Cuando se emplean sistemas de fibra óptica, es posible transmitir señales ópticas a grandes distancias, lo que permite realizar análisis en ambientes peligrosos (en ambientes radiactivos, en atmósferas contaminadas o a altas temperaturas o presiones, etc.) sin necesidad de recurrir previamente a la realización de la toma de muestra.

Sin embargo, los sensores ópticos también presentan algunas desventajas, tales como:

- La luz ambiental puede interferir en las medidas.
- La estabilidad temporal del sensor puede no ser elevada debido a la fotodescomposición de los reactivos usados.
- Los tiempos de respuesta pueden ser grandes, sobre todo en los casos en los que estén involucrados fenómenos de transferencia de masa.
- En general, los sensores ópticos presentan intervalos lineales menores que los electroquímicos.

19. R.L. Plant y D.H. Burns. “Quantitative, depth-resolved imaging of oxygen concentration by phosphorescence lifetime measurement”. *Appl. Spectr.*, 47 (1993) 1594.

20. P.M. Gewehr y D.T. Delpy. “Optical oxygen sensor based on phosphorescence lifetime quenching and employing a polymer immobilized metalloporphyrin probe. 1. Theory and instrumentation”. *Med. & Biol. Eng. & Comp.*, 31 (1993) 2.

- Y en muchos casos, existe una carencia de reactivos selectivos y que interaccionan reversiblemente con el analito. Además, habitualmente hay una pérdida de sensibilidad tras su inmovilización.

Estos problemas explican, en parte, la falta hasta la fecha de éxito comercial de los sensores ópticos y garantizan un esfuerzo investigador continuado y ligado al trabajo conjunto de varias áreas²¹.

La espectroscopía de emisión luminiscente ha desarrollado métodos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad; la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir así largas distancias; se encuentran disponibles nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisores (LED's)²² que permiten la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible; se han desarrollado fotodiodos de bajo costo; y por último, nuevos métodos quimiométricos junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, aún en el caso de relaciones complejas de señal-concentración

A.4.2 Clasificación de los sensores ópticos

Son numerosas las clasificaciones propuestas de los sensores ópticos atendiendo a diversos aspectos¹³. Así:

- **Según la naturaleza del fenómeno óptico medido**, se puede hablar de sensores de absorbancia, de reflectancia, de dispersión Raman, luminiscentes (fluorescentes, fosforescentes, quimioluminiscentes, bioluminiscentes), etc..
- **Según la naturaleza de interacción con el analito**, podemos hablar de sensores ópticos reversibles, cuando la interacción química del analito con la zona de reconocimiento del sensor es reversible y por ello no se consume apreciablemente el reactivo de reconocimiento; o sensores ópticos irreversibles, cuando la interacción es irreversible y, por ello, se produce consumo del reactivo de reconocimiento. Estos últimos se dividen, a su vez, en regenerables o reutilizables,

21. O.S. Wolfbeis. "Fluorescence optical sensors in analytical chemistry". Trends Anal. Chem., 4 (1985) 184.

22. D.S. Ballantine, D. Callahan, G.J. Maclay y J.R. Stetter. "An optical wave-guide acid vapor sensor". Talanta, 39 (1992) 1657.

siempre y cuando puedan volver a ser utilizados tras un tratamiento con un reactivo determinado y no regenerables o desechables cuando resultan irre recuperables al realizar la medida y por tanto son de un solo uso.

- **Según su forma externa**, podemos hablar de dos amplios grupos: tipo sonda (optrodos), que están constituidos por una o varias fibras ópticas y una fase sensora normalmente fijada al extremo del cable óptico por medio de una membrana; y sensores tipo célula de flujo (optosensores), donde el sólido ópticamente activo se encuentra empaquetado en una célula de flujo que puede estar situada en el paso óptico del instrumento o en el exterior del mismo y en este caso es preciso utilizar fibras ópticas que permitan el transporte de la luz.

La configuración tipo sonda permite su empleo tanto en discontinuo como en flujo, sin embargo los sensores tipo célula de flujo sólo se pueden emplear en sistemas de flujo.

El acoplamiento de estos sensores tipo célula de flujo a sistemas de análisis por inyección en flujo (híbrido conocido como “optosensor”) ofrece importantes ventajas de gran interés analítico entre las que se pueden citar: facilidad para renovar reactivos en la superficie sensora, posibilidad de integrar en un sistema de flujo pretratamiento en línea de la muestra, empleo de reacciones no reversibles en la fase activa, etc..

A.5 Sensores tipo célula de flujo (optosensores)

Un sistema analítico convencional de flujo continuo comprende tres etapas: la transferencia de masa (analito) entre dos fases, las reacciones (bio)químicas y la detección continua en una celda de flujo convencional²³.

El dispositivo que realice simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la celda de flujo puede considerarse formalmente como un “sensor”, pues reúne sus cuatro características principales (responde directa, reversible, continua y rápidamente a variaciones en la concentración del analitos de interés) y se denomina “optosensor”.

23. M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro. “Flow injection analysis”. Wiley. Nueva York, USA, 2nd Ed. (1988).

Este término fue introducido por Ruzicka y Hansen²⁴ para definir un nuevo principio de detección en análisis por inyección en flujo basado en el cambio de las propiedades ópticas de una superficie activa situada en el paso de un flujo.

La realización simultánea de la etapa de retención del analito y del proceso de detección espectroscópica en un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA) constituye una vía de amplias posibilidades para la superación de muchos inconvenientes de los sensores ópticos^{25,26}.

A.5.1 Análisis por inyección en flujo

Una metodología con las características de las técnicas FIA ofrece numerosas ventajas analíticas, entre las que se puede citar²⁷: fundamento sencillo, equipamiento de bajo costo, bajo consumo de muestra y reactivos, elevada frecuencia de muestreo y fácil automatización. El FIA se engloba dentro de los métodos cinéticos y por tanto presenta en general una mayor selectividad que las correspondientes técnicas manuales. La exactitud y la precisión son realmente sorprendentes a pesar de que se basa en medidas de sistemas en estado transitorio.

La técnica FIA consiste básicamente en una inyección o inserción directa de la muestra líquida en un flujo continuo y no segmentado. De este modo, la muestra es arrastrada a través del flujo del sistema, pudiendo tener lugar uno o varios procesos adicionales entre ésta y el fluido portador. La sustancia a analizar se hace pasar por un detector apropiado que permite realizar medidas en continuo, originando una señal transitoria que está relacionada con la concentración de la especie de interés. El grado de dispersión de la muestra es altamente reproducible estando controlado por factores tales como la velocidad de flujo, el diseño geométrico del sistema y la longitud y diámetro de los tubos.

24. J. Ruzicka y E.H. Hansen. "Optosensing at active surfaces - a new detection principle in flow-injection analysis". *Anal. Chim. Acta*, 173 (1985) 3.

25. J. Ruzicka y G.D. Christian. "Reversible optosensing in packed flow-through detectors - flow-injection or chromatography". *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 31.25

26. J. Ruzicka y G.D. Marshall. "Sequential injection - a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays". *Anal. Chim. Acta*, 237 (1990) 329.

27. M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro. "Análisis por inyección en flujo". Ed. Univ. Córdoba/Monte de Piedad y Caja de Ahorros de Córdoba, (1984).

Las condiciones experimentales de trabajo habitual en FIA origina una mezcla incompleta del “bolo” de muestra inyectado en el flujo portador. De ahí, que una característica fundamental de esta metodología sea que el tiempo de operación ha de ser muy reproducible por efectuarse las medidas en condiciones de no equilibrio.

El tratamiento profundo de esta temática está ampliamente documentado en la bibliografía^{23,27}.

Finalmente, es de recalcar, la casi universalidad del FIA dado que su carácter modular lo hace sencillo de adaptar a cualquier necesidad analítica concreta. Sin lugar a dudas, el gran desarrollo actual de esta técnica se debe a su excepcional versatilidad. Este tipo de sistema en flujo puede ser utilizado con éxito en el análisis de rutina de un laboratorio.

A.5.2 Acoplamiento de las fases sensoras a sistemas en flujo

Una de las características más relevante de los sensores tipo “célula de flujo” es su total compatibilidad con sistemas FIA. Por lo que a las características intrínsecas de los sistemas de inyección de flujo (automatización, flexibilidad, acondicionamiento y calibrados de muestra sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc.) se suman las de la utilización de fases sensoras (selectividad, preconcentración del analito, etc.) y hace posible su aplicación a muestras reales de todo tipo⁸.

El acoplamiento con sistemas FIA pueden ofrecer soluciones a algunos de los problemas de los sensores ópticos, tales como largos tiempos de respuesta marcados por lentos procesos de difusión del analito desde la muestra a la fase activa, que limitan la utilidad práctica de éstos. Así, los tiempos de respuesta pueden ser reducidos al incorporar un pequeño bolo de muestra en el flujo portador que va a interactuar con la fase sensora de forma transiente. De igual manera, el tiempo de exposición se puede utilizar para realizar una discriminación cinética entre el analito y otras sustancias interferentes cuando éstas posean una velocidad de difusión diferente.

El empleo de fases sólidas para la detección en un sistema FIA ofrece, en principio, dos ventajas inherentes (propias del equilibrio heterogéneo líquido-sólido) cuando se compara con la utilización más convencional de fases líquidas que contienen el reactivo^{28,29}:

1. La transferencia de masa radial en un reactor empaquetado es mucho más intensa que en un reactor hueco y, por tanto, la contribución de la difusión radial en el equilibrio sólido-líquido dentro del bloque es más eficaz.
2. El equilibrio líquido-sólido también tiene lugar en aquellos elementos de la muestra donde no hay dispersión, debido a que el mismo procede exclusivamente en la interfase sólido/líquido.

Alguna de las ventajas de tipo práctico, que se pueden conseguir al introducir interfases sólidas en sistemas de análisis en flujo, son las siguientes⁸:

1. Aumento de la sensibilidad utilizando fases sólidas, ya que la sensibilidad de los sistemas de análisis en flujo puede incrementarse por:
 - *Preconcentración en línea o "in situ"*: es uno de los métodos más eficaces para aumentar la sensibilidad. Físicamente, la preconcentración puede conseguirse acoplando en el sistema en flujo una unidad adecuada de separación como puede ser una microcolumna con un relleno adecuado. Si la fase sólida se dispone en la célula de flujo de un detector óptico no destructivo se consigue un sistema particular de preconcentración "in situ", que integra los procesos de retención y detección^{8,30}.
 - *Disminución de la dilución*: históricamente, los primeros reactores sólidos utilizados en FIA fueron de naturaleza redox y de esta forma, se evita la dilución correspondiente al empleo de un reductor adicional³¹.

28. J. Ruzicka y E.H. Hansen. "Homogeneous and heterogeneous system. Flow-injection analysis today and tomorrow". *Anal. Chim. Acta*, 214 (1988) 1.

29. M. Valcárcel y M.D. Luque de Castro. "Non-Chromatographic continuous separation techniques". Royal Society of Chemistry. Inglaterra (1991).

30. M.D. Luque de Castro y M. Varcárcel. "Integration of separation and detection in continuous-flow systems". *Trends Anal. Chem.*, 10 (1991) 114.

31. J.F. Van Staden, A.E. Joubert y H.R. Vliet. "Flow-injection determination of nitrate in natural waters with copper and copperized cadmium tubes in the reaction manifold system". *Fresenius Z. Anal. Chem.*, 325 (1986) 150.

- *Aumento de la estabilidad de los reactivos*: las enzimas inmovilizadas sobre soportes adecuados suelen ser más estables que en disolución y se han utilizado ampliamente en sistemas de análisis en flujo tanto para determinar substratos^{32,33} como actividades enzimáticas³⁴.
2. Aumento de la selectividad utilizando fases sólidas. Los métodos FIA son más selectivos que sus homólogos manuales puesto que al realizar las medidas sin llegar a condiciones de equilibrio se eliminan interferencias de especies que reaccionen más lentamente que el analito³⁵. La selectividad de los sistemas FIA puede mejorarse substancialmente empleando fases sólidas como medio de eliminar interferencias³⁶, mediante medidas de velocidad de reacción basadas en enzimas inmovilizadas³⁷ y acoplando sistemas de flujo a técnicas de separación más poderosas como el HPLC³⁸.

A.5.3 Clasificación de los sensores de flujo

De acuerdo con la localización de la zona de reconocimiento, donde tiene lugar la reacción, separación y detección, podemos clasificar los sensores en flujo en dos tipos básicos¹³ (ver Figura 3):

1. **Optosensor convencional**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo especial que se encuentra en el compartimento de muestra del instrumento.
2. **Optosensores de fibra óptica**, donde la zona de reconocimiento está incorporada dentro de una célula de flujo que se sitúa fuera del instrumento.

32. J. Ruz, F. Lázaro y M.D. Luque de Castro. "Immobilized enzymes in flow-injection analysis: present and trends". *J. Autom. Chem.*, 10 (1988) 15.

33. E.H. Hansen. "Flow injection enzymatic assays". *Anal. Chim. Acta*, 216 (1989) 257.

34. J.M. Fernández Romero y M.D. Luque de Castro. "Flow-injection configurations for enzyme activity determination". *Chim. Oggi*, Noviembre (1988) 17.

35. M. Valcárcel y A. Ríos. "Selectivity in analytical chemistry". *Analisis*, 18 (1990) 469.

36. S.R. Bysouth, J.F. Tyson y P.B. Stockwell. "Use of masking agents in the determination of lead in tap water by flame atomic absorption spectrometry with flow injection pre-concentration". *Analyst*, 115 (1990) 571.

37. A. Ríos, M.D. Luque de Castro y M. Valcárcel. "Analytical potential of flow-reversal injection analysis". *Anal. Chem.*, 60 (1988) 1540.

38. J. Rizucka y G.D. Christian. "Reversible optosensing in packed flow-through detectors: flow injection or chromatography?". *Anal. Chim. Acta*, 234 (1990) 31.

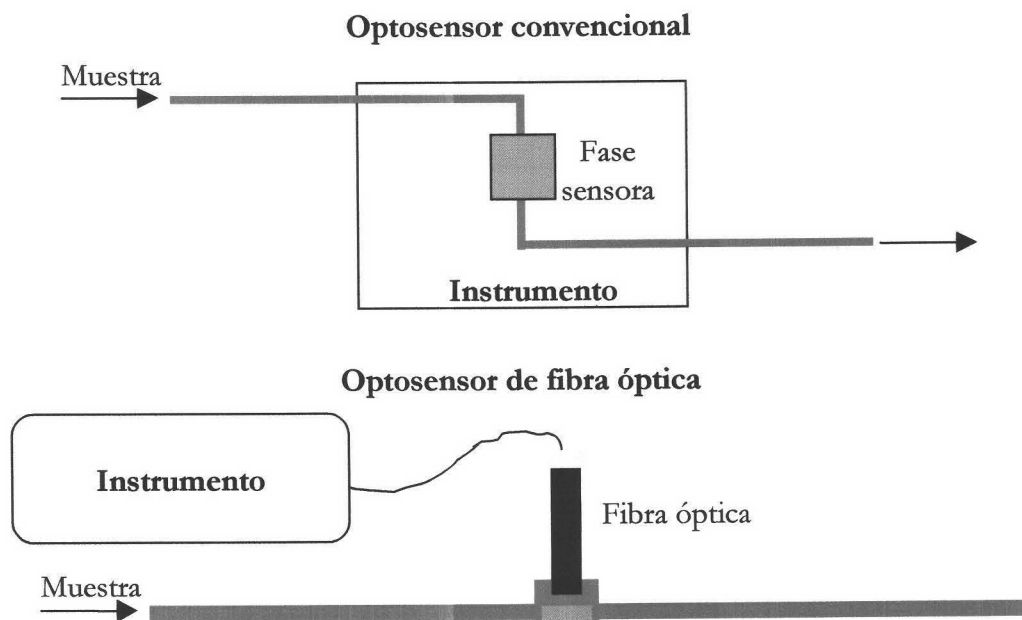


Figura 3. Tipos básicos de optosensores de flujo.

A.5.4 Características que deben cumplir los sensores de flujo

Los optosensores deben reunir una serie de características necesarias para un adecuado funcionamiento:

1. El sistema debe ser reversible (o fácilmente regenerable si es irreversible)
2. La cinética de los procesos que tengan lugar debe ser rápida.
3. La fase de reconocimiento químico debe estar inmovilizada eficientemente para que pueda ser usada en un gran número de determinaciones.
4. La zona sensible y el sistema de detección deben ser totalmente compatibles, lo cual no siempre es posible.

Como ya se ha comentado, uno de los rasgos más sobresalientes de los optosensores es su total compatibilidad con sistemas de inyección en flujo. Esto hace posible mejorar las características intrínsecas de los mismos (automatización, flexibilidad, acondicionamiento, calibrados de muestra sencillos, etc.) así como ampliar su aplicación a muestras reales de prácticamente todo tipo. Posiblemente, uno de los grandes aportes de estos sistemas es su facilidad para acoplar un sistema de regeneración de la fase sensora en

el caso de irreversibilidad en la reacción de reconocimiento, de una forma simple y automática⁸.

A.5.5 Ventajas e inconvenientes de los sensores de flujo

Como conclusión, podemos señalar que los optosensores presentan una serie de ventajas como son:

- Una mayor sensibilidad al reducirse la dispersión de la muestra inyectada.
- Una mejora indirecta de la selectividad eliminando especies interferentes y señales parásitas a través de medidas cinéticas.
- Una sencilla regeneración de la fase sensora, de forma simple y automática, en el caso de irreversibilidad de la reacción de reconocimiento.
- Una mejora de las características intrínsecas de los sensores derivadas del empleo de la técnica FIA como son automatización, flexibilidad, acondicionamiento y desarrollo de métodos sencillos, desarrollo previo de reacciones químicas, etc..

Por el contrario, las mayores desventajas de los sensores en flujo son:

- La necesidad de un sistema para impulsar la muestra.
- La dificultad del análisis remoto a largas distancias y en micromuestras, que se reduce drásticamente en el caso de los optosensores de fibra óptica.
- La necesidad de que la zona sensible y el detector sean compatibles.
- La posibilidad la existencia de problemas, si las cinéticas derivadas de los pasos de separación y reacción son demasiado lentas.

A.5.6 Revisión bibliográfica

Debido a la importancia de los optosensores en esta Memoria, se ha procedido a realizar una revisión bibliográfica de los trabajos publicados en este tema en los últimos años.

Atendiendo al sistema de detección usado, en la bibliografía aparecen optosensores con detección fotométrica, fluorimétrica y quimioluminiscente aplicados, principalmente, a la determinación de principios activos farmacológicos en preparados farmacéuticos y

fluidos biológicos, aunque también se aplican al análisis de alimentos, cosméticos y aguas de consumo.

- **Optosensores fotométricos**

En 1998, Ortega Barrales *y col.*³⁹ propusieron un optosensor fotométrico para la determinación de tiamina en presencia de riboflavina, piridoxina e hidroxicoalamina aplicándolo a la determinación de tiamina en preparados farmacéuticos en presencia de otras vitaminas del grupo B, consiguiendo buenos porcentajes de recuperación y límites de detección adecuados para su utilización en laboratorios de control farmacéutico.

En 2000, Ayora Cañada *y col.*⁴⁰ propusieron un optosensor para la determinación de paracetamol basándose en la interacción que se producía entre este analito y la resina Sephadex QAE A-25, obteniendo límites de detección de 0.022 µg/mL. Basándose en este trabajo, Ruiz Medina *y col.*⁴¹ propusieron un optosensor fotométrico para la determinación secuencial de ácido ascórbico y paracetamol, usando la alternancia de dos portadores que además actuaban como sistemas de regeneración obteniendo límites de detección de 0.02 µg/mL en ambos casos y buenos porcentajes de recuperación cuando lo aplicaron al análisis de preparados farmacéuticos. Además, también propusieron otro optosensor para la determinación de adrenalina en preparados farmacéuticos obteniendo un límite de detección de 0.17 µg/mL, una desviación estándar del 1.4% para 10 réplicas y 12 análisis por hora⁴².

En 2001, Capitán Vallvey *y col.*⁴³ propusieron dos sensores de flujo fotométricos para la determinación directa de los antioxidantes butil-hidroxianisol y propil-galato, aplicándolos a la determinación de esos compuestos en alimentos y cosméticos. Además,

39. P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "A selective optosensor for UV spectrophotometric determination of thiamine in the presence of other vitamins B". *Anal. Chim. Acta*, 376 (1998) 227.

40. M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 59.

41. A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera y A. Molina Díaz. "A flow-through solid phase UV spectrophotometric biparameter sensor for the sequential determination of ascorbic acid and paracetamol". *Anal. Chim. Acta*, 404 (2000) 131.

42. A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "Sensitive determination of adrenaline by means of a flow-through solid phase UV spectrophotometric sensing device". *Mikrochim. Acta*, 134 (2000) 101.

43. L.F. Capitán Vallvey, M.C. Valencia y E.A. Nicolás. "Monoparameter sensors for the determination of the oxidants butylated hydroxyanisole and n-propyl gallate in foods and cosmetics by flow injection spectrometry". *Analyst*, 126 (2001) 897.

validaron la respuesta de los sensores usando el método de adición de patrón y comparando los resultados con el método de referencia basado en HPLC. Miró *y col.*⁴⁴ propusieron un optosensor fotométrico para la determinación de nitrito a niveles traza mediante la derivatización en línea y la interacción de este derivado con sílica gel, obteniendo un límite de detección de 0.46 ng/mL con una desviación estándar inferior al 4% y aplicándolo al análisis de nitrito en muestras de agua. Ortega Barrales *y col.*⁴⁵ propusieron un optosensor para la determinación simultánea de dos especies catiónicas (tiamina y piridoxina) aplicándolo satisfactoriamente al análisis en productos farmacéuticos.

Y en el año 2002, podemos citar los optosensores fotométricos propuestos por Capitán Vallvey *y col.*⁴⁶ y Ortega Barrales *y col.*⁴⁷ para la determinación de butilhidroxitolueno en alimentos y cosméticos y para la determinación simultánea de ácido ascórbico y tiamina en preparados farmacéuticos, respectivamente.

- **Optosensores fluorimétricos**

En 1999, Ruiz Medina *y col.*⁴⁸ propusieron un optosensor fluorimétrico para la determinación selectiva de piridoxina usando como fase sensora la resina Sephadex SP-C25, obteniendo un límite de detección de 0.33, 0.67 y 5.70 ng/mL para 2000, 1000 y 250 μ L de muestra respectivamente, aplicándolo satisfactoriamente a la determinación de esta vitamina en preparados farmacéuticos. Segura Carretero *y col.*⁴⁹ propusieron un optosensor fluorimétrico para la determinación de mercurio a niveles traza en aguas de mar basándose en la inmovilización en una resina neutra del tiocromo formado por la oxidación de la tiamina por el Hg(II), obteniendo un límite de detección de 3 ng/mL cuando usaban 4 mL

-
44. M. Miró, W. Frenzel, V. Cerdá y J.M. Estela. "Determination of ultratrace of nitrite by solid-phase preconcentration using a novel flow-through spectrophotometric optrode". *Anal. Chim. Acta*, 437 (2001) 55.
 45. P. Ortega Barrales, A.D. Vidal, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "Simultaneous determination of thiamine and pyridoxine in pharmaceuticals by using a single flow-through biparameter sensor". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 619.
 46. L.F. Capitán Vallvey, M.C. Valencia y E.A. Nicolás. "Flow-through sensor for determination of butylated hydroxytoluene in cosmetics". *Anal. Lett.*, 35 (2002) 65.
 47. P. Ortega Barrales, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "A flow-through solid-phase spectroscopic sensing device implemented with FIA solution measurements in the same flow cell: determination of binary mixtures of thiamine with ascorbic acid or acetylsalicylic acid". *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 227.
 48. A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Díaz Molina. "Flow injection solid phase spectrofluorimetric determination of pyridoxine in presence of group B-vitamins". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 363 (1999) 265.
 49. A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro y A. Sanz Medel. "Low-level mercury determination with thiamine by fluorescence optosensing". *Talanta*, 49 (1999) 907.

de muestra. Badía *y col.*^{50,51} propusieron dos optosensores fluorimétricos, uno para la determinación de warfarina en agua obteniendo 2 ng/mL como límite de detección y otro la determinación de warfarina y carbaril en agua. Y en este mismo año, Recalde Ruiz *y col.*⁵² propusieron un optosensor fluorimétrico para la determinación de cianuro basándose en la disminución de la emisión fluorescente de un compuesto, retenido en la fase sensora, al interaccionar con el Cu(II), de forma que la presencia de cianuro en el medio disminuye la cantidad de Cu(II) y por tanto aumenta la emisión fluorescente del compuesto retenido, siendo este incremento de emisión fluorescente directamente proporcional a la cantidad de cianuro en el medio.

En 2000, Yang *y col.*⁵³ propusieron un optosensor fluorimétrico basándose en el aumento de la emisión fluorescente que se producía en una fase sensora construida reteniendo heptakis (2,6-di-O-isobutil)-beta-ciclodextrina en una membrana de PVC cuando se inyectaba en el sistema de flujo una disolución de tetraciclina. De esta forma desarrollaron un optosensor selectivo para tetraciclina obteniendo un límite de detección de $8 \cdot 10^{-7}$ M.

En el año 2001, Ruiz Medina *y col.*⁵⁴ propusieron un optosensor fluorimétrico para la determinación selectiva y sensible de dipiridamol en preparados farmacéuticos y muestras biológicas usando como fase sensora la resina Sephadex QAE A-25, obteniendo un límite de detección de 0.94 µg/L.

-
50. R. Badía y M.E. Díaz García. "Cyclodextrin-based optosensor for the determination of warfarin in waters". *J. Agr. Food Chem.*, 47 (1999) 4256.
 51. R. Badía, L. Bruzzone y M.E. Díaz García. "Fluorimetric flow through sensors for pesticides based on a "host guest" recognition mechanism". *Quim. Anal.*, 18 (1999) 114.
 52. D.L. Recalde Ruiz, E. Andrés García y M.E. Díaz García. "Continuous fluorimetric flow sensor for cyanide determination". *Quim. Anal.*, 18 (1999) 111.
 53. R.H. Yang, K.M. Wang, D. Xiao, X.H. Yang y L.D. Zhang. "A selective sensing membrane for the determination of tetracycline with heptakis(2,6-di-O-isobutyl)-beta-cyclodextrin as the substrate". *Microchem. J.*, 64 (2000) 213.
 54. A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba y A. Molina Díaz. "A flow-through optosensing device with fluorimetric transduction for rapid and sensitive determination of dipyrindamole in pharmaceuticals and human plasma". *Eur. J. Pharm. Sci.*, 13 (2001) 385.

- **Optosensores fosforimétricos**

Son muy pocos los optosensores fosforescentes propuestos hasta la actualidad.

En 1998, Álava Moreno *y col.*⁵⁵ y Badía y Díaz García⁵⁶ propusieron un optosensor fosforimétrico para la determinación de antraciclinas (daunorubicina, doxorubicina y epirubicina) en fluidos biológicos y un bio-optosensor fluorimétrico para la determinación de surfactantes aniónicos en muestras de agua, respectivamente.

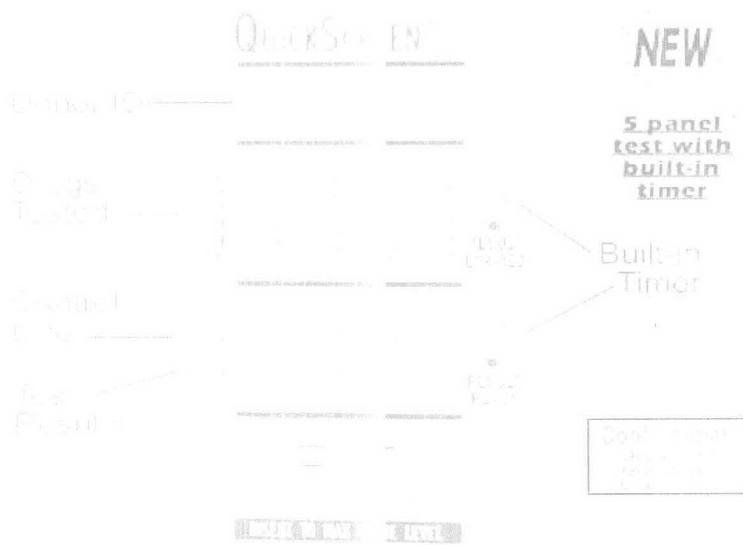
En 1999, San Vicente de la Riva *y col.*⁵⁷ propusieron un optosensor fosforescente selectivo para la determinación de plomo en agua de mar, basándose en la formación e inmovilización de quelatos de Pb(II), obteniendo un límite de detección de 1 ng/mL para 2 mL de muestra y aplicando el optosensor propuesto a la determinación de plomo en muestras de agua de mar que contenían pocos ng/mL de Pb (II).

Y en 2001, Jin *y col.*⁵⁸ propusieron un optosensor fosforimétrico para la medida de pH basado en el fenómeno de la transferencia de energía.

- **Optosensores quimioluminiscentes**

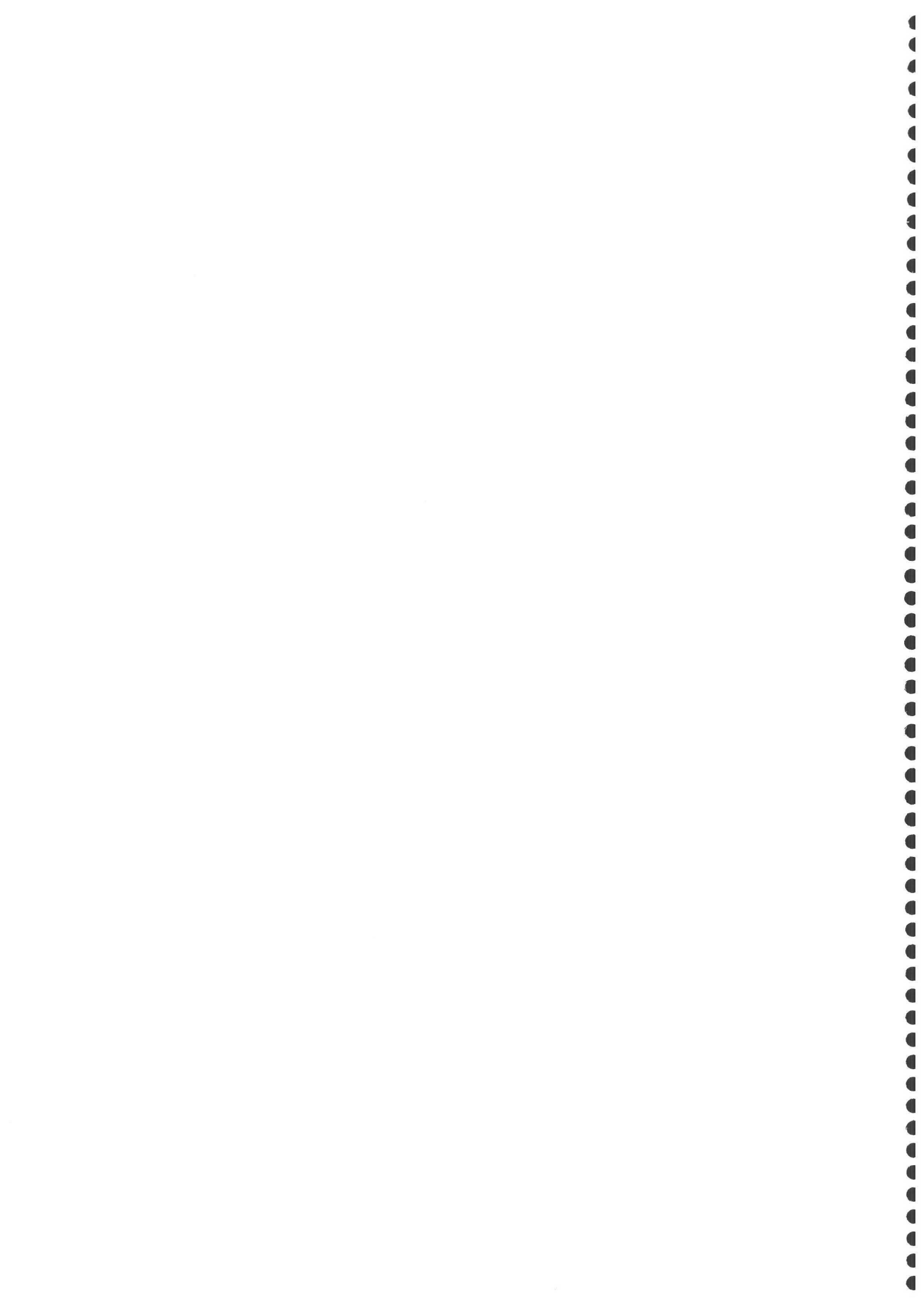
En la bibliografía consultada, sólo ha sido citado un optosensor quimioluminiscente desarrollado por Song y Wang⁵⁹ en 2001 para la determinación de riboflavina en preparados farmacéuticos y fluidos biológicos.

-
55. F. Álava Moreno, M.J. Valencia González y M.E. Díaz García. "Room temperature phosphorescence optosensor for anthracyclines". *Analyst*, 123 (1998) 151.
 56. R. Badía y M.E. Díaz García. "Room temperature phosphorescence flow-through biosensing of anionic surfactants". *Anal. Chim. Acta*, 371 (1998) 73.
 57. B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro y A. Sanz Medel. "Flow-through room temperature phosphorescence optosensing for the determination of lead in sea water". *Anal. Chim. Acta*, 395 (1999) 1.
 58. W.J. Jin, J.M. Costa Fernández y A. Sanz Medel. "Room temperature phosphorescence pH optosensor based on energy transfer". *Anal. Chim. Acta*, 431 (2001) 1.
 59. Z.H. Song y L. Wang. "Reagentless chemiluminescence flow sensor for the determination of riboflavin in pharmaceutical preparations and human urine". *Analyst*, 126 (2001) 1393.



PARTE B

Metodologías analíticas de screening

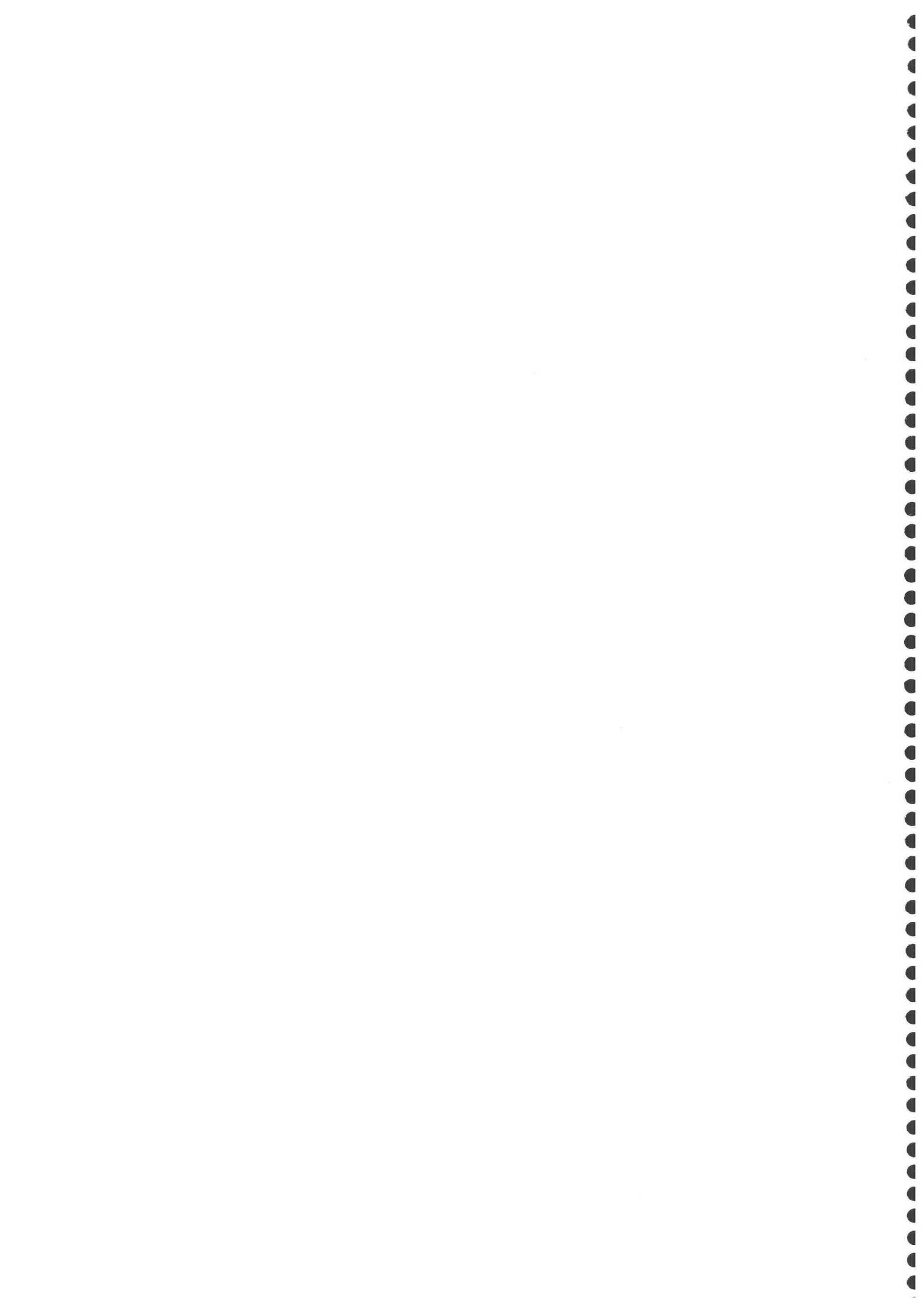


INTRODUCCIÓN

PARTE B

METODOLOGÍAS ANALÍTICAS DE SCREENING

B.1 Generalidades, definición y características de los test de screening	59
B.1.1 Generalidades	59
B.1.2 Definición y esquema de funcionamiento.....	60
B.1.3 Ventajas y características más relevantes de los test de screening	60
B.2 Clasificación de los test de screening	62
B.3 Test de screening para principios activos.....	64
B.4 Test de screening para hidrocarburos aromáticos policíclicos	66



B.1 Generalidades, definición y características de los test de screening

B.1.1 Generalidades

Hoy día, tanto para los análisis clínicos, como el control ambiental y de procesos industriales se llevan a cabo técnicas analíticas perfectamente establecidas en los laboratorios de rutina, siendo las más utilizadas la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y la cromatografía de gases-masas (GC-MS). Entre las ventajas de estas técnicas cabe destacar su selectividad y sensibilidad; sin embargo, se trata de una instrumentación cara y sofisticada, que precisa de buena habilidad del operario, instalaciones apropiadas, además de no permitir la monitorización “in situ”. En la mayoría de los casos se hace necesario una etapa de preparación de las muestras previa al análisis lo que se traduce en un mayor tiempo de análisis.

Asimismo, debe tenerse en cuenta que en los campos de los análisis clínicos y el control ambiental, aunque es preciso realizar un seguimiento constante, la mayoría de las muestras que se analizan en los laboratorios de control no presentan agentes dopantes ni contaminantes. Además, en ciertas ocasiones, no es necesaria la determinación cuantitativa sino que es suficiente con una determinación cualitativa, pues la sola presencia de estas sustancias es indicio de dopaje o contaminación.

Todas estas cuestiones, hacen que sea necesario el desarrollo de nuevas metodologías y métodos de análisis económicos, favoreciendo el desarrollo de instrumentación sencilla que pueda dar soluciones a los problemas que actualmente se plantean. Dentro de esta línea, el desarrollo de los “test de dopaje” y “test de contaminación ambiental” capaces de proporcionar respuestas binarias “SI/NO” al problema analítico surgen como un complemento valiosísimo de los métodos de rutina.

La importancia y el potencial de estos test se pone de manifiesto en el incremento en el número de publicaciones que recoge la bibliografía durante los últimos 20 años, ratificando que en la actualidad constituyen un tema de interés creciente en la Química Analítica.

B.1.2 Definición y esquema de funcionamiento

Un test de screening se define como “aquel que es capaz de llevar a cabo la selección de aquellas muestras cuyo contenido es similar o mayor que uno previamente establecido como umbral⁶⁰. Por lo tanto, sólo sobre aquellas muestras que probablemente estén contaminadas será necesario llevar a cabo un análisis más exhaustivo, utilizando para ello una técnica analítica convencional, lo que permitirá así obtener una información analítica más exacta⁶¹. Un esquema de funcionamiento de los test de screening se muestra en la Figura 4.

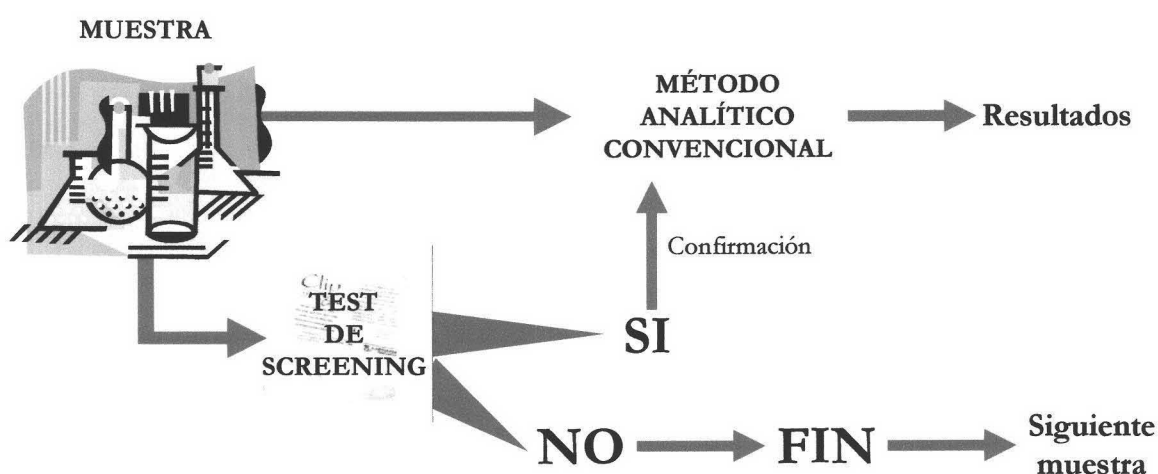


Figura 4. Esquema de funcionamiento de los test de screening.

B.1.3 Ventajas y características más relevantes de los test de screening

Entre las ventajas de los test de screening se debe destacar su rapidez, simplicidad, minimización de errores debido a tratamientos previos de la muestra y, muy importante, el ahorro de tiempo y dinero, pues solamente las muestras que proporcionen una respuesta positiva al test necesitarán ser confirmadas con otra técnica más sofisticada, eliminándose todas aquellas que den respuestas negativas al test.

Realmente, no existen diferencias significativas entre “análisis” y “test de screening” pero se pueden detallar algunas características relevantes que diferencian un test de un análisis

60. M. Valcárcel, S. Cárdenas y M. Gallego. “Sample screening systems in analytical chemistry”. Trends Anal. Chem., 18 (1999) 685.

61. B. San Vicente de la Riva. Tesis Doctoral “Metodologías luminiscentes para la determinación de metales tóxicos en muestras de interés medioambiental”. Universidad de Oviedo, 2001.

convencional (véase Figura 5). Si bien todos los test no cumplen todas las características, al menos deben cumplir tres o más de ellas⁶¹.

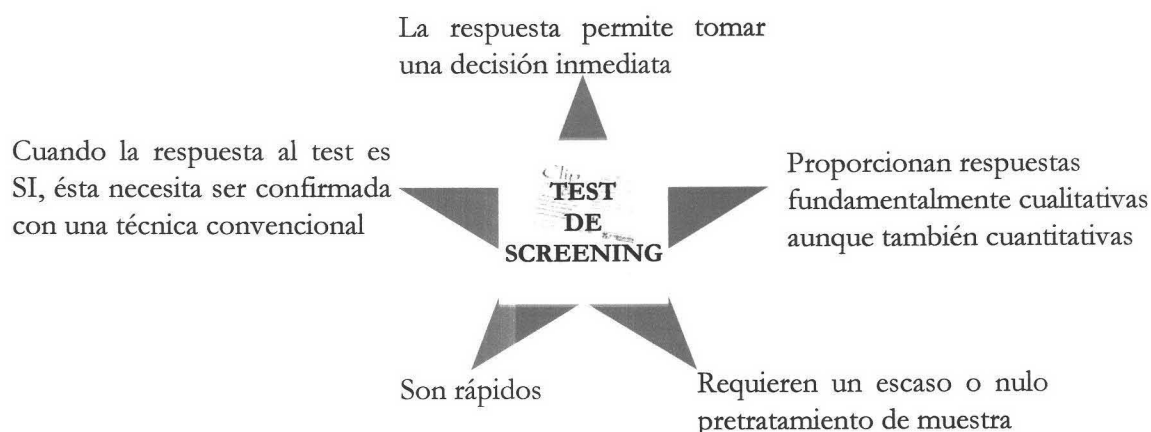


Figura 5. Características más relevantes de los test de screening.

Una de las características más relevantes de los test es el tipo de respuesta binaria, esto es SI/NO, asociada a los mismos. De este tipo de respuesta se debe resaltar su carácter cualitativo. No obstante, puede considerarse que en algunos procesos también proporcionan cierto carácter cuantitativo, pero, al igual que en las respuestas proporcionadas por los métodos convencionales, estas respuestas SI/NO también se encuentran sometidas a errores. Así podemos destacar:

- **Falsos negativos:** Se producen cuando el resultado del test es NO pero debería ser SI. Por ejemplo, una muestra de orina de un deportista que ha consumido un agente dopante daría negativo (NO) en el test, considerándose por lo tanto que no se ha dopado y sin embargo sí lo ha hecho.
- **Falsos positivos:** Se producen cuando el resultado del test es SI pero debería ser NO. Por ejemplo, un deportista que no ha consumido ningún agente dopante pero la muestra de orina analizada da positivo al realizarle el test, considerándose que el deportista se ha dopado y sin embargo no lo ha hecho.

Es muy importante resaltar que son los falsos negativos los que suponen una mayor peligrosidad en la aplicación de los test, por ser muestras que se desecharán sin ser

analizadas por métodos convencionales a pesar de contener en analito o analitos buscados. Sin embargo, los falsos positivos proporcionan, como único inconveniente, la necesidad de su análisis por un método convencional, y por tanto, el gasto de tiempo, reactivos, etc., que ello conlleva.

B.2 Clasificación de los test de screening

Según aparece recogido en la bibliografía, los test de screening pueden ser clasificados atendiendo a diversos criterios⁶⁰. Así:

1. Según el tratamiento previo de la muestra:

- a) **Test de screening directo.** Es el más simple y el que mejor se ciñe a la definición dada para un test, pues supone la determinación directa sobre la muestra sin necesidad de llevar a cabo ningún tratamiento previo de la misma. Así, se aplica sobre una alícuota de la muestra, la cual, en el caso de dar una respuesta positiva (SI), se verá sometida a la confirmación por un método convencional de análisis. Dicha confirmación podrá realizarse sobre la misma alícuota o incluso sobre otra alícuota de la muestra (véase Figura 6).

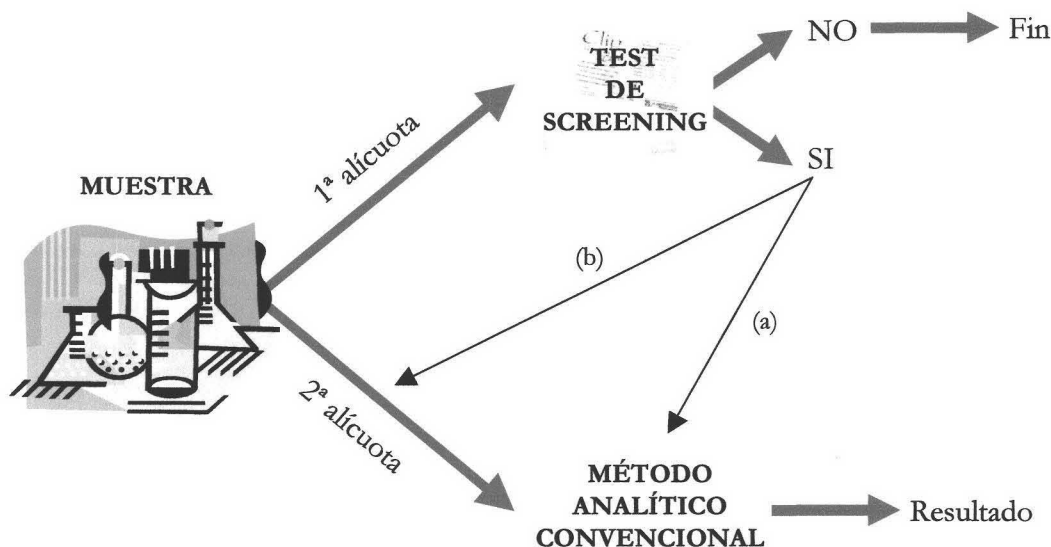


Figura 6. Esquema de posibilidades para el desarrollo de los test de screening directo sobre una muestra.

- b) **Test de screening con pretratamiento simple.** En este caso es necesario llevar a cabo un pretratamiento de la muestra antes de proceder a la aplicación del test. Generalmente este pretratamiento es rápido, simple y no exhaustivo. Si la respuesta de la alícuota sometida al mismo proporciona una respuesta positiva (SI) al test, una segunda alícuota sobre la que probablemente no será necesario aplicar dicho pretratamiento, será confirmada mediante un método convencional de análisis.
 - c) **Test de screening con pretratamiento total de la muestra.** Este es el caso más desfavorable a la hora de la aplicación de los test de screening. A diferencia de los casos anteriores, aquí siempre se trabaja con alícuotas que han sufrido un intenso tratamiento. Por ende, su aplicación sólo será justificada en aquellas situaciones en las que los métodos convencionales de análisis conlleven un coste de equipamiento o mantenimiento excesivamente caro.
2. Según el estado de agregación de la muestra:
- a) **Test de screening en muestras líquidas.** Es el más simple y el que normalmente se realiza sin pretratamiento de muestra o con tratamiento simple.
 - b) **Test de screening en muestras gaseosas.** En este caso la muestra a analizar es un gas y puede o bien sufrir un tratamiento previo y ser transformada a líquida antes de ser sometida al test o, si el test es sensible a gases, se usa de forma directa.
 - c) **Test de screening en muestras sólidas.** En este caso la muestra debe sufrir un tratamiento exhaustivo y ser transformada en una muestra, normalmente líquida, antes de aplicarle el test.
3. Según el sistema de detección usado:
- a) **Test de screening con detección idéntica** a la empleada en el proceso analítico convencional.
 - b) **Test de screening con detección diferente** a la empleada en el proceso analítico convencional.

4. Según el tipo de respuesta binaria proporcionada por el test:

a) *Test de screening discriminatorio* cuando proporcionan información individualizada de un analito o grupo de analitos.

b) *Test de screening global* cuando la información se refiere a varias especies consideradas como un único conjunto.

Además de estos criterios existen otros y que también se utilizan para la clasificación de los test como son:

- Atendiendo a la relación señal-analito se clasifican en *directos* e *indirectos*.
- En función del tipo de sistema de detección en *ópticos*, *electroanalíticos*, *de masas*, etc..
- Según los métodos convencionales de análisis en *independientes* o *de utilización durante el proceso analítico*.
- Según el formato en convencionales, sensores, kits de test u otros.

B.3 Test de screening para principios activos

Debido al gran número de análisis que deben hacerse en los laboratorios de control de procesos de la industria farmacológica, a la importancia del deporte en nuestra sociedad y al gran número de sustancias existentes para la alteración de las competiciones deportivas, se hace necesario el desarrollo de nuevos métodos rápidos, fáciles de usar y de bajo costo para el control de principios activos.

Son muchos los test de screening desarrollados para el control de principios activos farmacológicos principalmente enfocados a la detección de éstos en fluidos biológicos humanos (orina, suero, sangre, saliva, etc.) y en animales, consiguiendo prácticamente los mismos resultados que con los métodos convencionales^{62,63} pero abaratando y agilizando su control, y por tanto, favoreciendo su aplicación.

62. K.L. Anderson, W.A. Moats, J.E. Rushing y J.M. O'Carroll. "Detection of milk antibiotic residues by use of screening tests and liquid chromatography after intramammary administration of amoxicilin or penicillin G in cows with clinical mastitis". Amer. J. Vet. Res., 59 (1998) 1096.

63. C. Barrett, C. Good y C. Moore. "Comparison of point-of-collection screening of drugs of abuse in oral fluid with a laboratory-based urine screen". Forensic Sci. Int., 122 (2001) 163.

Los test de screening de principios activos farmacológicos se pueden clasificar en función del tipo de sistema de detección empleado. Así existen test espectrofotométricos (colorimétricos), fluorimétricos y los más relevantes en número de artículos publicados son los que se basan en inmunoensayo.

Los test espectrofotométricos se basan en una reacción selectiva entre un determinado reactivo y el principio activo o un grupo de principios activos de una misma familia, de forma que la aparición de un color y, por tanto, del aumento de la absorbancia a una determinada longitud de onda, indican la presencia por encima de un nivel umbral de ese o esos compuestos.

Así, Yamada *y col.*⁶⁴ desarrollaron un test de screening para el control de metilendioximetanfetamina y otros compuestos de la misma familia usando una reacción selectiva con ácido cromotrópico en medio sulfúrico por la que aparece coloración rojo-violeta en disolución acuosa. Bilia *y col.*⁶⁵ desarrollaron un test de screening para el estudio de la acción de principios activos empleados en enfermos de malaria usando espectrofotometría y corroborando la respuesta binaria del test mediante el tadem HPLC/batería de diodos/MS. Alston y Ng⁶⁶ desarrollaron un test de screening rápido para el control del ácido gamma-butírico adaptando el test del hidroxamato férrico para la detección de ésteres a la determinación de este ácido en orina humana.

Sólo se ha encontrado un trabajo publicado en el que se use como sistema de detección la fluorescencia en el desarrollo de un test de screening para el control de principios activos y fue llevado a cabo por Pagniez y Le Pape⁶⁷ en 2001. En este trabajo llevan a cabo la evaluación de un reactivo fluorescente (alamar blue) que responde selectivamente a un grupo de antihongos (anfotericina, fluconazol, 5-fluorocitosina e itraconazol) para el desarrollo de un test de screening.

64. H. Yamada, S. Ikeda wada y K. Oguri. "Highly specific and convenient color reaction for methylenedioxymethamphetamine and related drugs using chromatographic acid. Application as a drug screening test". *J. Health Sci.*, 45 (1999) 303.

65. A.R. Bilia, D. Lazari, L. Messori, V. Taglioli, C. Temperini y F.F. Vincieri. "Simple and rapid physico-chemical methods to examine action of antimalarial drugs with hemin – its application to *Artemisia annua* constituents". *Life Sci.*, 70 (2002) 769.

66. W.C.alston y K. Ng. "Rapid screening test for gamma-hydroxybutyric acid (liquid X) in human urine". *Forensic Sci. Int.*, 126 (2002) 114.

67. F. Pagniez y P.Le Pape. "New fluorimetric screening test for possible antifungal drugs". *J. Mycologie Medicale*, 11 (2001) 73.

Los test de screening basados en el inmunoensayo para el control de principios activos en fluidos biológicos humanos y animales son los más ampliamente desarrollados en la bibliografía. Así se encuentran en la bibliografía test basados en reacciones bioquímicas para salbutamol⁶⁸, fentanil⁶⁹, oxitetraciclina⁷⁰, un grupo de penicilinas (penicilina G, ampicilina y amoxicilina)⁷¹, ivermectina⁷², sulfametazina⁷³ y un grupo de tetraciclinas (tetraciclina, oxitetraciclina y clorotetraciclina)⁷⁴.

Además, es de resaltar el amplio abanico de test de screening para la detección de forma rápida del abuso y/o consumo de drogas que crean dependencia (cannabinoides, opiáceos, cocaína, amfetaminas, metanfetaminas, benzodiazepinas, etc.)⁷⁵⁻⁷⁷.

B.4 Test de screening para hidrocarburos aromáticos policíclicos

Es evidente que existe una creciente necesidad de control de la presencia de HAPs en los diversos ambientes en los que se encuentran, principalmente, en los de tipo urbano y en alimentos, debido a que están directamente en contacto con el ser humano y a su gran carácter cancerígeno sobre los seres vivos.

-
68. C.T. Elliotts, G.A. Baxter, S.A. Hewitt, C.J.M. Arts, M. Van Baak, K.E. Hellenas y A. Johanson. "Use of biosensor for rapid drug residue analysis without sample deconjugation or clean-up: a possible way forward". *Analyst*, 123 (1998) 2469.
 69. H. Kaferstein y G. Sticht. "Comparison of nonradiative microtiter plate enzyme immunoassays for the sensitive detection of fentanyl". *Forensic Sci. Int.*, 113 (2000) 353.
 70. H.J. Lee, M.H. Lee e I.K. Han. "Application of ELISA for the detection of oxytetracycline residue in live animals". *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 13 (2000) 1775.
 71. H.J. Lee, M.H. Lee e I.K. Han. "Application of ELISA for the detection of penicillin antibiotic residues in live animals". *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 13 (2000) 1604.
 72. S.R.H. Crooks, P. Ross, C.S. Thompson y C.T. Elliott. "Detection of unwanted residues of ivermectin in bovine milk by dissociation-enhanced lanthanide fluoroimmunoassay". *Luminescence*, 15 (2000) 371.
 73. H.J. Lee, M.H. Lee e I.K. Han. "Application of ELISA for the detection of sulphamethazine residue in live cattle". *Asian Australas. J. Anim. Sci.*, 14 (2001) 378.
 74. H.J. Lee, M.H. Lee, P.D. Ryu, H. Lee y M.H. Cho. "Enzyme-linked immunosorbent assay for screening the plasma residues of tetracycline antibiotics in pigs". *J. Vet. Med. Sci.*, 63 (2001) 553.
 75. A. Leino, J. Saarimies, M. Gronholm y P. Lillsunde. "Comparison of eight commercial on-site screening devices for drugs-of-abuse testing". *Scand. J. Clin. Lab. Inest.*, 61 (2001) 325.
 76. M.T. French, M.C. Roebuck, K.A. McGeary, D.D. Chitwood y C.B. McCoy. "Using the drug abuse screening test (DAST-10) to analyze health services utilization and cost for substance users in a community-based setting". *Subst. Use Minuse*, 36 (2001) 927.
 77. J.R. Knight, L. Sherritt, L.A. Shrier, S.K. Harris y G. Chang. "Validity of the CRAFFT substance abuse screening test among adolescent clinic patients". *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 156 (2002) 607.

En la actualidad, la mayoría de los test de screening propuestos para la detección y estudio de la genotoxicidad de los HAPs están basados en interacciones de tipo bioquímico entre éstos y ciertos genes, bacterias o incluso embriones animales.

En 1988, Matsumoto⁷⁸ empezó a utilizar los embriones de pollos para el estudio de la genotoxicidad de especies apolares (HAPs), esto sirvió de base para el desarrollo de un test de screening denominado “Chick Embryotoxicity Screening Test” conocido por sus siglas CHEST⁷⁹⁻⁸¹. Este test es uno de los más utilizados para la determinación y estudio de la genotoxicidad de los HAPs y es, de todos los test de screening de HAPs, el más ampliamente citado y utilizado en la bibliografía⁸²⁻⁸⁵.

Además del CHEST existe otro test de screening de propiedades parecidas pero que en vez de embriones animales utiliza una bacteria, en concreto la bacteria de la salmonela. Este test fue descrito por Marvin *y col.*⁸⁶ en 1995 y le denominaron “Salmonella microsome test” o “Ames Test”. Este test de screening también ha sido ampliamente

-
78. H. Matsumoto. “Chemical characterization of a polar portion in the neutral fraction derived from airborne particulate extracts responsible for the embryotoxicity in the chicken embryo”. *J. Toxicol. Environ. Health* 24 (1988) 533.
 79. B. Brunstrom, D. Broman y C. Naf. “Embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in three domestic avian species, and of PAHs and coplanar polychlorinated biphenyls (PCBs) in the common eider”. *Environ. Pollut.*, 67 (1990) 133.
 80. B. Brunstrom, D. Broman y C. Naf. “Toxicity and EROD-inducing potency of 24 polycyclic aromatic hydrocarbons in chick embryos”. *Arch. Toxicol.*, 65 (1991) 485.
 81. B. Brunstrom. “Embryolethality and induction of 7-ethoxyresorufin-o-deethylase in chick embryo by polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons having an Ah receptor affinity”. *Chem. Biol. Interact.*, 81 (1991) 69.
 82. L. Maltova, M. Machalaca, K. Nezveda, M. Granatova y Z. Nevorankova. “Biochemical screening of highly toxic aromatic contaminants in river sediment and comparison of sensitivity of biological model system”. *Chemosphere*, 30 (1995) 1363.
 83. S.E. Ottinger, K. Mayura, S.L. Lemke, K.S. McKenzie, N.Y. Wang, L.F. Kubena y T.D. Phillips. “Utilization of electrochemically generated ozone in the degradation and detoxication of benzo[a]pyrene”. *J. Toxicol. Environ. Health PT A*, 57 (1999) 565.
 84. B. Binkova, D. Vesely, D. Vesela, R. Jelinek y R.J. Sram. “Genotoxicity and embriotoxicity of urban air particulate matter collected during winter and summer period in two different districts of the Czech Republic”. *Mutat. Res.-Genet. Toxicol. E. M.*, 440 (1999) 45.
 85. K. Mayura, H.J. Huebner, M.R. Dwyer, K.S. McKenzie, K.C. Donnelly, L.F. Kubena, T.D. Phillips. “Multi-byoassay approach for assessing the potency of complex mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons”. *Chemosphere*, 38 (1999) 1721.
 86. C.H. Marvin, J.A. Lundrigan, B.E. McCarry y D.W. Bryant. “Determination and genotoxicity of high molecular mass polycyclic aromatic hydrocarbons isolated from coal-tar-contaminated sediment”. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14 (1995) 2059.


empleado en el campo del estudio de los HAPs^{85,87} y se ha comparado con el CHEST en el estudio de mezclas de HAPs⁸⁵.

En el año pasado, McCoy *y col.*⁸⁸ han propuesto un nuevo test de screening para el estudio de la genotoxicidad de los HAPs, usando un gen, el citocromo P450, como biomarcador de HAPs. Este test recibe el nombre de “Human Reporter Gene System” y se conoce por las siglas HRGS.

Como se puede observar estos test están basados en interacciones bioquímicas y, por tanto, están más enfocadas al estudio de la genotoxicidad de los HAPs que en su detección y/o determinación. Además, debido a sus características bioquímicas, necesitan de un especialista para su utilización y debido al tipo de moléculas que se usan suelen ser sistemas costosos.

Para solventar estos problemas, en la bibliografía aparecen otros test basados en reacciones o determinaciones químicas, que simplifican y abaratan el uso de los test de screening para el control de HAPs pero el número de trabajos encontrados en la bibliografía es escaso. Así, en 2000, Buratti *y col.*⁸⁹ proponen un test de screening para la discriminación entre fumadores y no fumadores basado en el control de la especie química 1-hidroxipireno en orina. Y en 2001, Bessant *y col.*⁹⁰ utilizan la espectroscopía de fluorescencia sincrónica combinada con métodos quimiométricos para el desarrollo de un test de screening rápido para el control de HAPs en la transformación de aceites.

-
87. S. Kevekordes, J. Porzig, T. Gebel y H. Dunkelberg. “Combined effects in mutagenicity of halogenated aliphatic hydrocarbons and polycyclic aromatic hydrocarbons in Salmonella TA98 and TA 100”. *Zbl. Hyg. Umweltmed.*, 200 (1998) 531.
 88. D.L. McCoy, J.M. Jones, J.W. Anderson, M. Harmon, I. Hartwell y J. Hameedi. “Distribution of cytochrome P450 1A1-inducing chemicals in sediments of the Delaware River-Bay system, USA”. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21 (2002) 1618.
 89. M. Buratti, O. Pellegrino G. Brambilla y A. Columbi. “Urinary excretion of 1-hydroxypyrene as a biomarker of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons from different sources”. *Biomarkers*, 5 (2000) 368.
 90. C. Bessant, L. Ritchie, S. Saini, B. Pahlavanpour y G. Wilson. “Chemometric evaluation of synchronous scan fluorescence spectroscopy for the determination of regulatory conformance and usage history of insulation oils”. *Appl. Spectrosc.*, 55 (2001) 840.



PARTE C
Instrumentación en el desarrollo de
optosensores fluorescentes

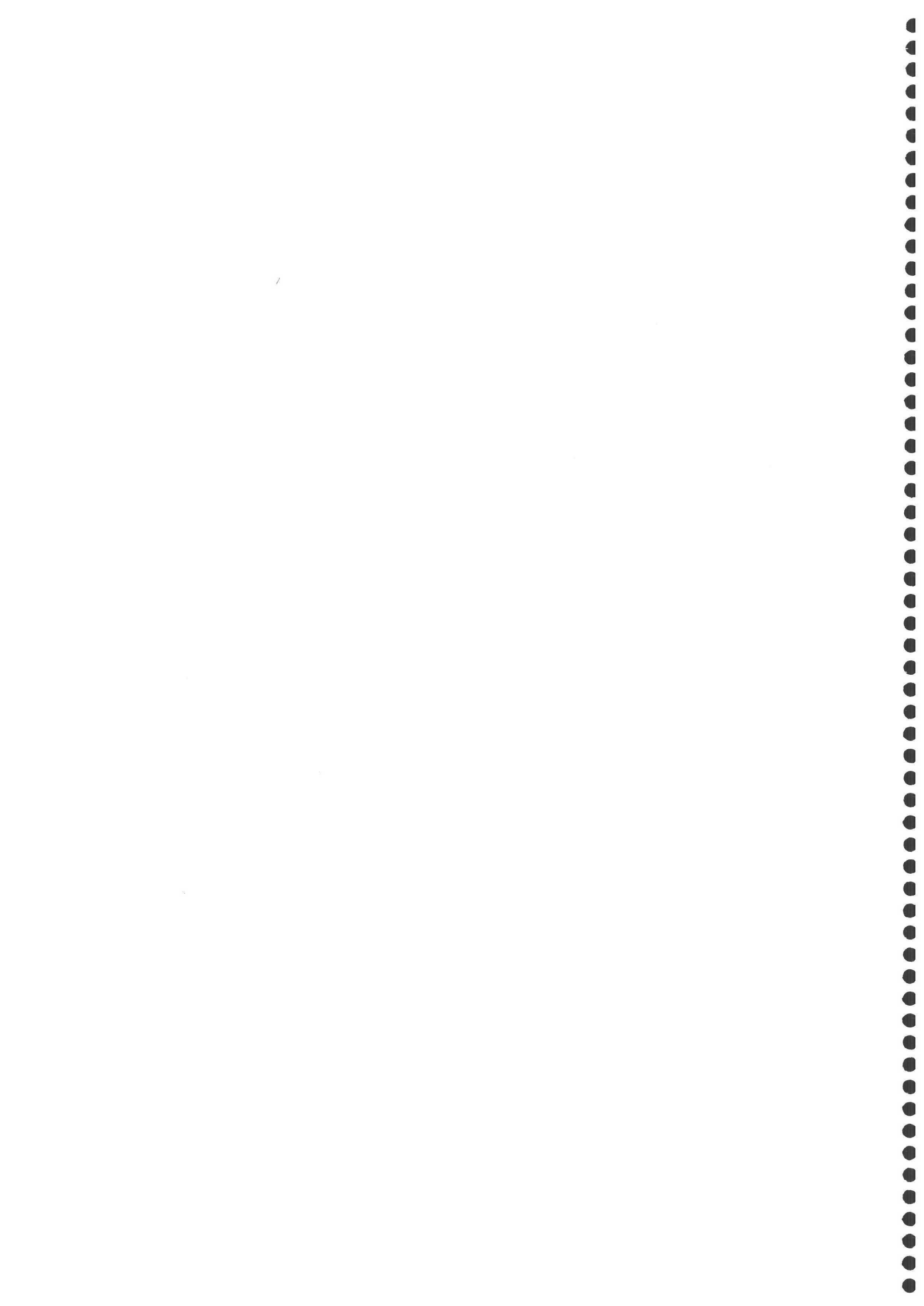


INTRODUCCIÓN

PARTE C

INSTRUMENTACIÓN EN EL DESARROLLO DE OPTOSENSORES FLUORESCENTES

C.1 Aspectos generales	73
C.2 Fuentes de excitación.....	74
C.2.1 Lámparas convencionales.....	74
C.2.2 Láseres.....	75
C.2.3 Diodos fotoemisivos.....	75
C.3 Selectores de longitud de onda	77
C.3.1 Filtros.....	77
C.3.2 Monocromadores.....	78
C.4 Fibras ópticas	79
C.5 Compartimento de muestra	82
C.6 Detectores y sistemas de detección	83
C.6.1 Fototubos y tubos fotomultiplicadores.....	83
C.6.2 Detectores multicanal: dispositivo de acoplamiento de carga.....	85



C.1 Aspectos generales

La instrumentación que se utiliza en el desarrollo de optosensores es prácticamente igual a la que se utiliza para llevar a cabo medidas de luminiscencia en instrumentos convencionales pero añadiendo ciertas particularidades que hacen posible la utilización de sistemas de flujo y el acoplamiento de la fase sensora al instrumento.

Hoy en día se pueden encontrar en la literatura numerosas referencias relativas a la instrumentación empleada en análisis químico para llevar a cabo medidas de luminiscencia⁹¹⁻⁹⁶, siendo una de las más actualizadas en cuanto a los avances acaecidos en los últimos años la correspondiente a Segura Carretero y col.⁹⁷ que dedican un capítulo del libro *“Fosforescencia Molecular Analítica: Una aproximación práctica”* a la instrumentación empleada para llevar a cabo medidas de luminiscencia.

Para adquirir datos luminiscentes son necesarios una serie de componentes básicos: una fuente radiante para la excitación, un selector de longitud de onda de excitación, un compartimento para la muestra, un dispositivo para seleccionar la longitud de onda de emisión y un sistema de detección (véase Figura 7). En el caso concreto de los sensores fluorescentes, los componentes son los mismos aunque con ciertas particularidades (uso de fibra óptica, cambio en el compartimento de muestra, detectores multicanal, etc.).

En este apartado de la introducción se van a abordar los componentes básicos en el desarrollo de sensores fluorescentes, destacando las aportaciones más recientes recogidas en la bibliografía, indicando sus aspectos positivos y negativos.

-
91. R.J. Hurtubise, G.D. Christian y J.B. Callis. “Trace analysis: spectroscopic methods for molecules”. Wiley-Interscience, 1986, Nueva York.
 92. T. Vo-Dinh. “Room-temperature phosphorimetry for chemical analysis”. Wiley-Interscience, 1984, Nueva York.
 93. R.J. Hurtubise. “Solid-surface luminescence analysis”. Marcel Dekker, 1981, Nueva York.
 94. G.W. Ewing. “Analytical instrumentation handbook” 2nd edn. Macer Dekker, 1997, Nueva York
 95. D.A. Skoog, F.J. Holler y T.A. Nieman. “Principios de análisis instrumental”, 5^a edn. Mc-Graw Hill, 2000, Madrid.
 96. H. Günzler y A. Williams. “Handbook of analytical techniques”, 1^a edn. Wiley-VCH, 2001.
 97. A. Segura Carretero, J.F. Fernández Sánchez y J. Rodríguez Fernández. “Capítulo III: Instrumentación” del libro A. Fernández Gutiérrez y S.G. Schulman (Eds) “Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica”. Editorial Universidad de Granada, 2001, Granada.

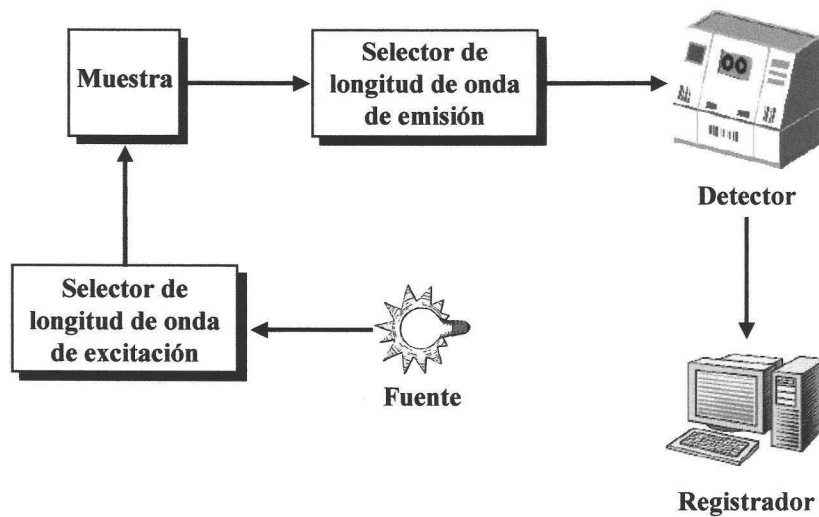


Figura 7. Diagrama de bloques general para los componentes de instrumentos para llevar a cabo medidas de luminiscencia.

C.2 Fuentes de excitación

C.2.1 Lámparas convencionales

Hoy día, las fuentes más usadas en instrumentación luminiscente para la medida de fluorescencia son la lámpara de arco de xenón (lámpara de descarga de gas) y la lámpara de mercurio de alta presión. De las dos lámparas, la de arco de xenón es la que se usa con más frecuencia debido a su emisión continua en la región ultravioleta-visible⁹¹ (véase Figura 8) mientras que la lámpara de mercurio de alta presión se utiliza cuando las especies luminiscentes pueden excitarse con una de las líneas de emisión del mercurio.

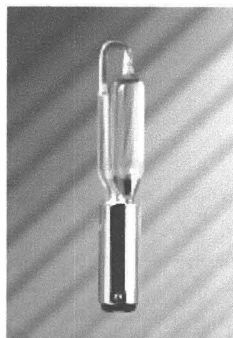


Figura 8. Lámpara de arco de Xenón.

C.2.2 Láseres

Los láseres presentan grandes ventajas como su gran intensidad, alto grado de monocromaticidad y coherencia espacial con respecto a las lámparas convencionales. En 1981, Wright *et al.*⁹⁸ compararon la capacidad teórica de una lámpara de arco de xenón y un láser como fuentes de excitación en fluorimetría.

En general, un láser es más eficiente que una lámpara de arco de xenón ya que la anchura de la línea de emisión de la fuente láser es habitualmente más estrecha que la anchura de la absorción y todos los fotones que inciden sobre la muestra tienen la posibilidad de ser absorbidos.

C.2.3 Diodos fotoemisivos.

Los diodos fotoemisivos, también llamados diodos de emisión de luz, son más conocidos por sus siglas inglesas LED (“*Light Emission Diode*”). Aunque parecen bombillas diminutas, son realmente diferentes a éstas tanto en su fabricación como en la forma en la que producen luz y son fuentes muy fidedignas de luz que, en función de su configuración, pueden satisfacer diferentes aplicaciones.

Un diodo es un simple y diminuto dispositivo electrónico que limita la dirección que los electrones pueden tomar en un circuito electrónico. Los LEDs son un tipo especial de diodos, formados básicamente por cuatro componentes: una estructura de plomo, una unión positivo-negativa o unión p-n (que generalmente está fabricada con galio combinado con arsénico, fósforo, aluminio o indio), cable para las conexiones y todos estos componentes encapsulados en una base epoxy. La base epoxy que reviste los componentes electrónicos del diodo fotoemisor es una resina sólida cristalina irrompible que los hace indestructibles y por tanto, favorece la longevidad de los LEDs, posibilitando una duración de 10 años o más funcionando constantemente⁹⁹.

La intensidad de luz que producen los LEDs se mide en milicandelas y es siempre función de la corriente entrante en el LED, tal y como expresa la Figura 9.

98. J.C. Wright, G.M. Hieftje, J.C. Travis y F.E. Lytle. “Lasers in chemical analysis”. Humana Press, 1981, Clifton.

99. <http://www.glow-bug.com/products/faq.html>

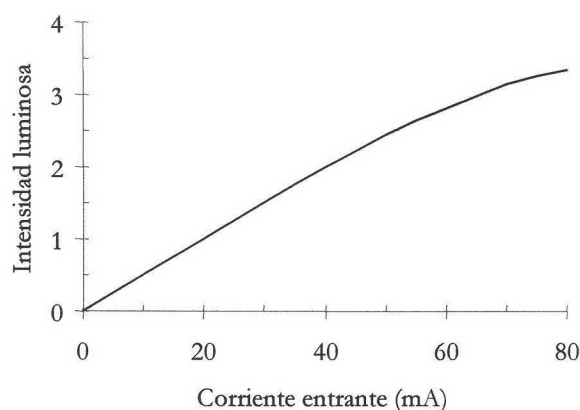


Figura 9. Dependencia de la intensidad lumínica de un LED con la intensidad de corriente.

Hoy en día los LEDs se comercializan en dos tamaños: T-1 (3 mm) y T-1 $\frac{3}{4}$ (5 mm), y son de dos tipos:

- *LED en ángulo recto* (“*Right Angle LED*” o RA LED): véase la Figura 10^a.
- *Barras de luz*: véase la Figura 10b.

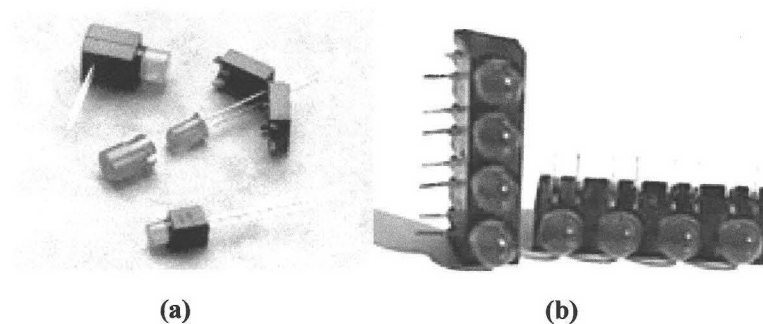


Figura 10. Diodos fotoemisivos: a) LEDs en ángulo recto; b) LEDs tipo barra de luz de cuatro unidades.

Ambos LEDs comerciales están disponibles para todas las longitudes de onda del espectro visible (rojos, naranjas, amarillos, verdes, turquesas y azul) e incluso blancos (básicamente LEDs azules dopados con un fosforóforo).

Por lo comentado, los LEDs son un nuevo dispositivo, sencillo, barato y cómodo que permite excitar un compuesto químico a una determinada longitud de onda y debido a su pequeño tamaño y versatilidad son de uso reciente para el desarrollo de sensores.

Además de los LEDs existen otros diodos fotoemisivos que usan compuestos orgánicos en su fabricación, los llamados diodos fotoemisivos orgánicos y conocidos por sus siglas en inglés “Organic Light Emitting Diodes” OLED¹⁰⁰⁻¹⁰⁶.

C.3 Selectores de longitud de onda

Los componentes ópticos usados para la selección de la longitud de onda en trabajos luminiscentes son prácticamente los mismos que los usados en análisis por absorción ultravioleta-visible. Por tal motivo, en las próximas dos secciones sobre filtros y monocromadores, sólo se dará una visión global de estos dos dispositivos de selección de longitudes de onda.

C.3.1 Filtros

Los filtros son el sistema más sencillo de selección de longitudes de onda de excitación y de emisión.

La Figura 11 muestra las características de transmisión de filtros comunes de absorción y de interferencia. En general, los filtros se catalogan por la longitud de onda a la cual se obtiene la transmisión máxima y por su ancho de banda efectivo.

Frecuentemente, los filtros se usan para minimizar el ruido de fondo de las redes de los monocromadores y ambos tipos de filtros se pueden usar en la selección de las longitudes de onda.

-
100. Y. Hamada, T. Sano, K. Shibata y K. Kuroki. “Influence of the emission site on the running durability of organic electroluminescent devices”. *Jpn. J Appl. Phys.*, 34 (1995) L824.
 101. J. Shi y C.W. Tang. “Doped organic electroluminescent devices with improved stability”. *Appl. Phys. Lett.*, 70 (1997) 1665.
 102. T. Wakimoto, Y. Fukuda, K. Nagayama, A. Yokoi, H. Nakada y M. Tsuchida. “Organic EI cells using alkaline metal-compounds as electron injection materials”. *IEEE Trans. Electron. Dev.*, 44 (1997) 1245.
 103. M.A. Baldo, D.F. O’Brien, Y. You, A. Shoustikov, S. Sibley, M.E. Thompson y S.R. Forrest. “Highly efficient phosphorescent emission from organic electroluminescent devices”. *Nature* 395 (1998) 151.
 104. M.A. Baldo, S. Lamansky, P.E. Burrows, M.E. Thompson y S.R. Forrest. “Very high-emitting devices based on electrophosphorescence”. *Appl. Phys. Lett.*, 75 (1999) 4.
 105. T. Tsutsui, M.J. Yang, M. Yahiro, K. Nakamura, T. Watanabe, T. Tsuji, Y. Fukuda, T. Wakimoto y S. Miyaguchi. “High quantum efficiency in organic light-emitting devices with iridium-complex as a triplet emissive center”. *Jpn. J. Appl. Phys.*, 38 (1999) L1502.
 106. T. Watanabe, K. Nakamura, S. Kawami, Y. Fukuda, T. Tsuji, T. Wakimoto, S. Miyaguchi, M. Yahiro, M.J. Yang y T. Tsutsui. “Optimization of emitting efficiency in organic LED cells using Ir complex”. *Synthetic Metals*, 122 (2001) 203.

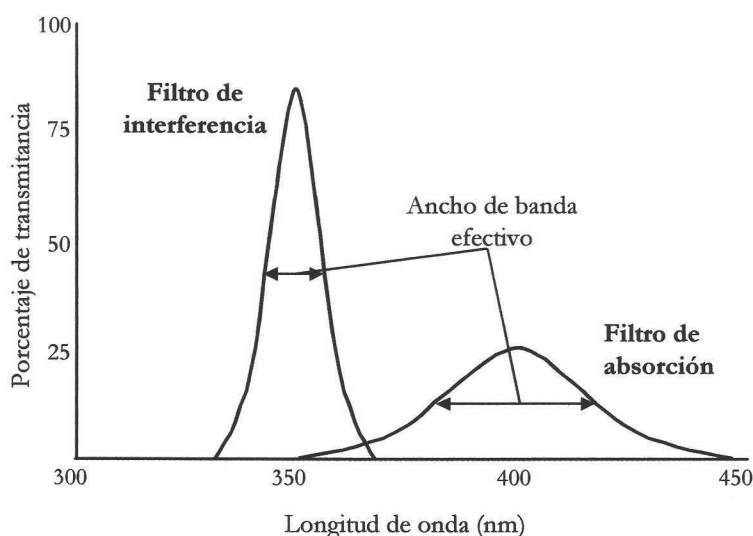


Figura 11. Anchura de banda efectiva para dos tipos de filtros.

C.3.2 Monocromadores

Un monocromador produce un haz de radiación de estrecho paso de banda lo cual permite que la longitud de onda se pueda variar. Los elementos fundamentales de un monocromador son una rendija de entrada, un elemento dispersante y una rendija de salida. El elemento de dispersión puede ser una red de difracción o un prisma.

Las redes de difracción pulimentadas son las más usadas en los instrumentos de luminiscencia. Las ranuras de la redes están aluminizadas y tienen la pendiente precisa para difractar la máxima cantidad de radiación para un determinado ángulo.

Los montajes más comunes para monocromadores en los luminómetros comerciales son dos: el montaje Ebert y el montaje Czerny-Turner. En estos montajes, la red de difracción va girando para cambiar la longitud de onda de salida mientras que el ángulo entre el rayo incidente y el difractado permanece constante.

La Figura 12a muestra el diseño de un monocromador de red común y la Figura 12b muestra la luz que incide sobre un detector cuando éste se coloca en la rendija de salida del monocromador y se gira la red de difracción.

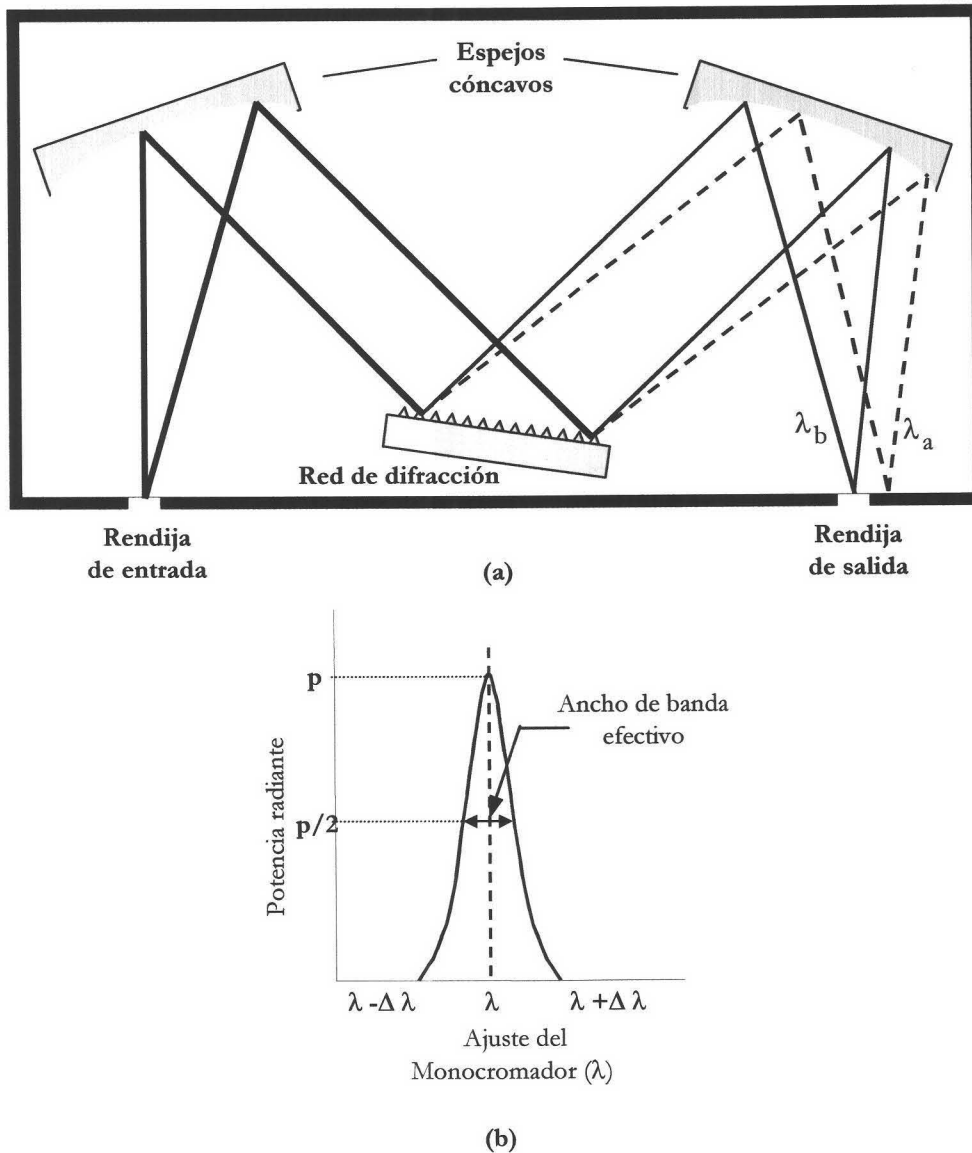


Figura 12. a) Esquema de un monocromador de red ($\lambda_A > \lambda_B$). b) Intensidad de una rendija de salida cuando el monocromador se ajusta desde $\lambda - \Delta\lambda$ a $\lambda + \Delta\lambda$.

C.4 Fibras ópticas

Una fibra óptica es un material dieléctrico transparente a la energía electromagnética¹⁰⁷. Como puede verse en la Figura 13, en el caso más sencillo (fibras de salto de índice), la fibra óptica está constituida por dos cilindros concéntricos: el núcleo central de índice de refracción n_1 , por donde se propaga la luz, y la capa o material de revestimiento que se encuentra recubriendo este núcleo y, cuyo índice de refracción n_2 , es

107. R.G. Seippel. "Fiber Optics". Reston Publishing Company Inc., 1987, USA.

inferior al del núcleo e impide que la mayor parte de la luz se pierda al exterior. También, y aunque no es esencial, suele recubrirse la fibra por una vaina o funda externa, generalmente plástica, que proporciona a la fibra protección mecánica y térmica. La propagación de la luz a través de la fibra óptica tiene lugar mediante el fenómeno de reflexión total de la luz en el interior del núcleo, lo que ocurre como consecuencia de que $n_2 < n_1$ (Figura 14).

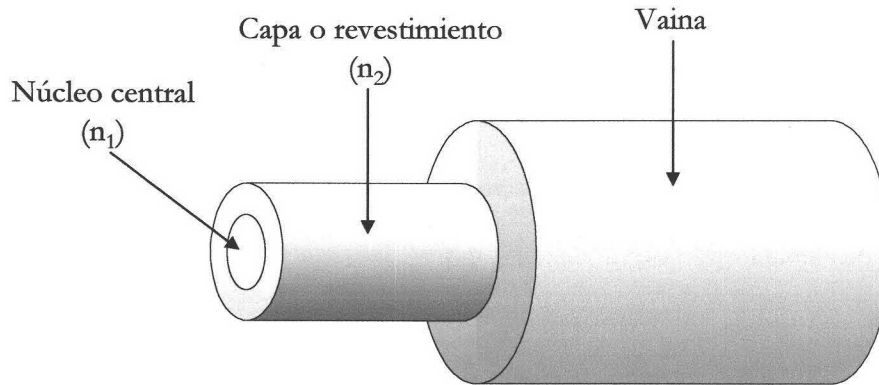


Figura 13. Partes de una fibra óptica.

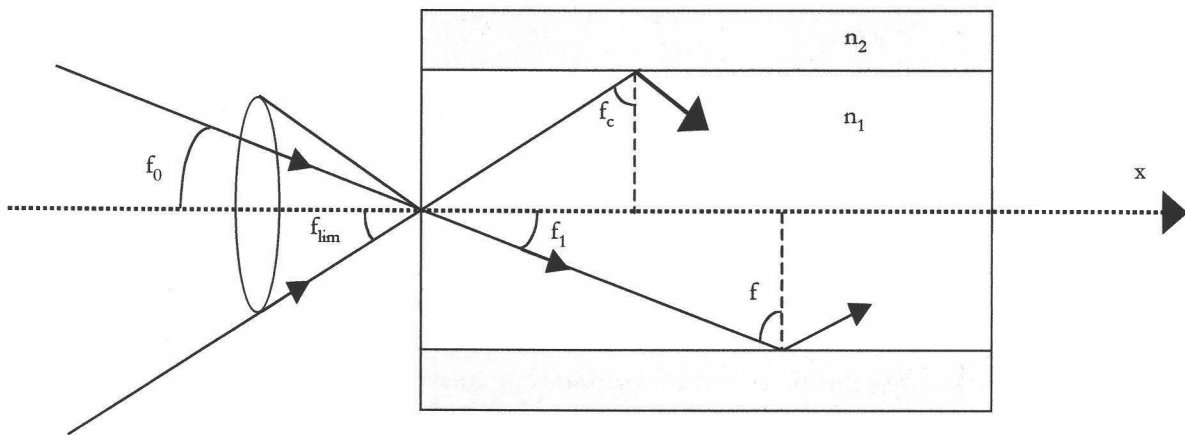


Figura 14. Transmisión de la radiación en una fibra óptica..

Los materiales utilizados para la producción de las fibras ópticas deben ser flexibles y muy transparentes. Las primeras fibras ópticas fabricadas tenían el núcleo de vidrio. Hoy en día se preparan de otros materiales como de sílice fundida (para poder trabajar en la zona del UV) o ciertos plásticos como poli(metacrilato) de metilo.

Existe una gran variedad de fibras ópticas en lo referente a estructura, geometría y materiales empleados. Estas variables van a determinar sus características de funcionamiento (atenuación, dispersión) así como sus propiedades físicas (índice de refracción), ópticas y espectroscópicas. Una clasificación general de las fibras y sus perfiles del índice de refracción ha sido dada por Yeh¹⁰⁸. Los tres tipos fundamentales de fibras ópticas son los siguientes (Figura 15):

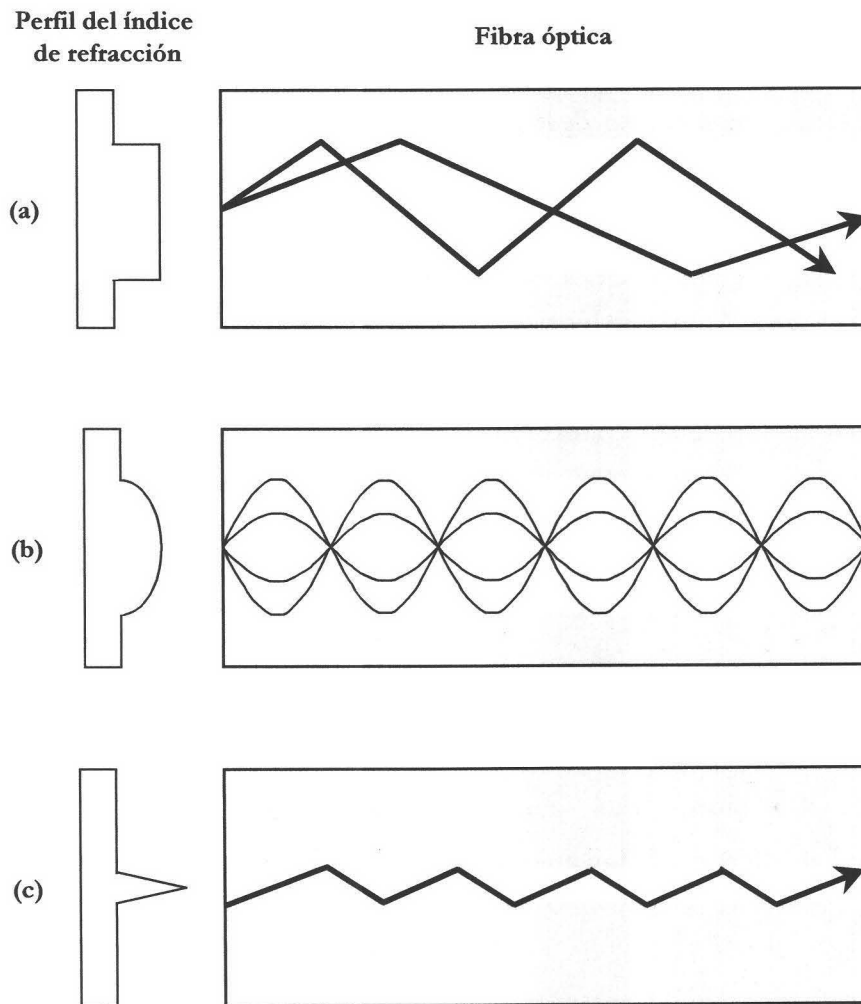


Figura 15. Tipos fundamentales de fibras ópticas: a) fibras de salto de índice, b) fibras de índice graduado, c) fibras monomodo.

- *Fibra de salto de índice o multimodo.* En ellas pueden penetrar rayos con ángulos de incidencia distintos, de modo que los rayos que avanzan según ángulos mayores

108. C. Yeh. "Handbook of Fiber Optics. Theory and Applications". Academic Press, 1990, Nueva York

respecto al eje de la fibra recorren distancias mayores y sufren cierto retraso. La velocidad máxima de transmisión y la longitud útil de la fibra están muy limitadas porque al cabo de cierta distancia, la señal se atenúa (Figura 15a).

- *Fibras multimodo de índice graduado.* En las que al vidrio se añaden ciertas impurezas, tales como óxido de boro o dióxido de germanio, con el objeto de que el índice de refracción varíe de forma parabólica según el perfil transversal de la fibra, desde el interior del núcleo hasta la superficie que limita con el revestimiento. De esta forma se consigue que todos los rayos tengan la misma velocidad neta a través de la fibra (Figura 15b).
- *Fibras monomodo.* Estas fibras ópticas tienen un núcleo de un diámetro extraordinariamente pequeño ($1\ \mu\text{m}$) de manera que la luz sólo puede propagarse según un único ángulo de incidencia. Estas fibras permiten que únicamente el rayo con un ángulo de incidencia característico sea capaz de atravesarla, quedando absorbidos todos los demás (Figura 15c).

C.5 Compartimento de muestra

El compartimento de muestra que se usa en el desarrollo de sensores va a depender del tipo de sensor. Así, en los optrodos, no existe compartimento de muestra propiamente dicho, pues la fase sensora está soportada sobre el extremo de las fibras ópticas que provienen de los selectores de longitud de onda y para llevar a cabo la medida, se sumerge directamente sobre la muestra.

En el caso de los optosensores de fibra óptica, el compartimento de muestra consiste en una celda de flujo, a la cual llegan las fibras ópticas provenientes de los selectores de longitud de onda. Y para los optosensores convencionales, el compartimento de muestra es el compartimento de muestra convencional del equipo comercial usado.

C.6 Detectores y sistemas de detección

C.6.1 Fototubos y tubos fotomultiplicadores

Los fototubos son sistemas de detección que constan de un cátodo semicilíndrico y un ánodo de filamento encerrados herméticamente en un recipiente transparente, en el que se ha hecho el vacío.

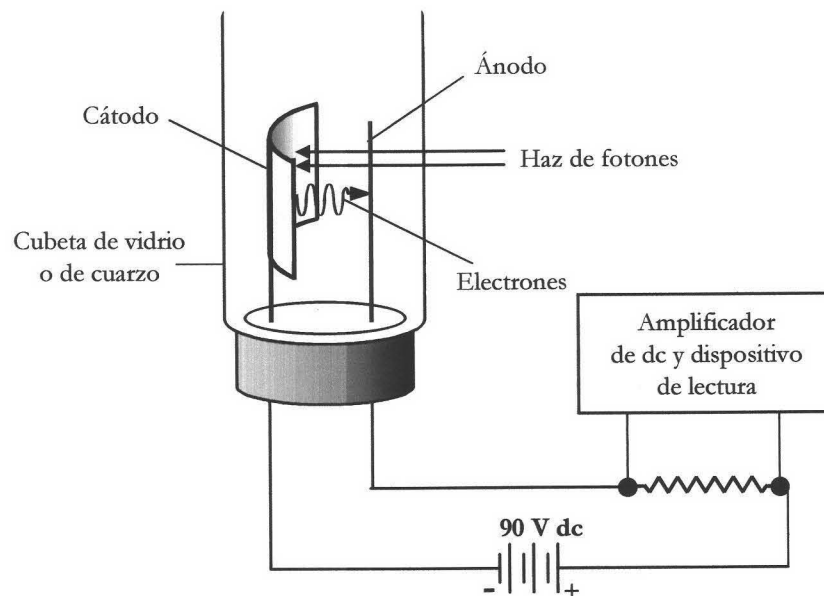


Figura 16. Fototubo y su circuito complementario.

La Figura 16 muestra la forma de un fototubo y su circuito complementario. Estos dispositivos independientes no se solían usar como sistemas de detección en los espectroluminómetros comerciales, sin embargo, en los últimos años, debido a la miniaturización, simplificación y abaratamiento de los sistemas de medida, se ha llegado a sustituir el tubo fotomultiplicador por un simple fototubo.

Los tubos fotomultiplicadores son detectores formados por varios fototubos conectados en serie. Son los más usados tanto en fluorescencia como en fosforescencia. Este tipo de detectores, que se esquematiza en la Figura 17, tienen una construcción similar a la de los fototubos pero son mucho más sensibles.

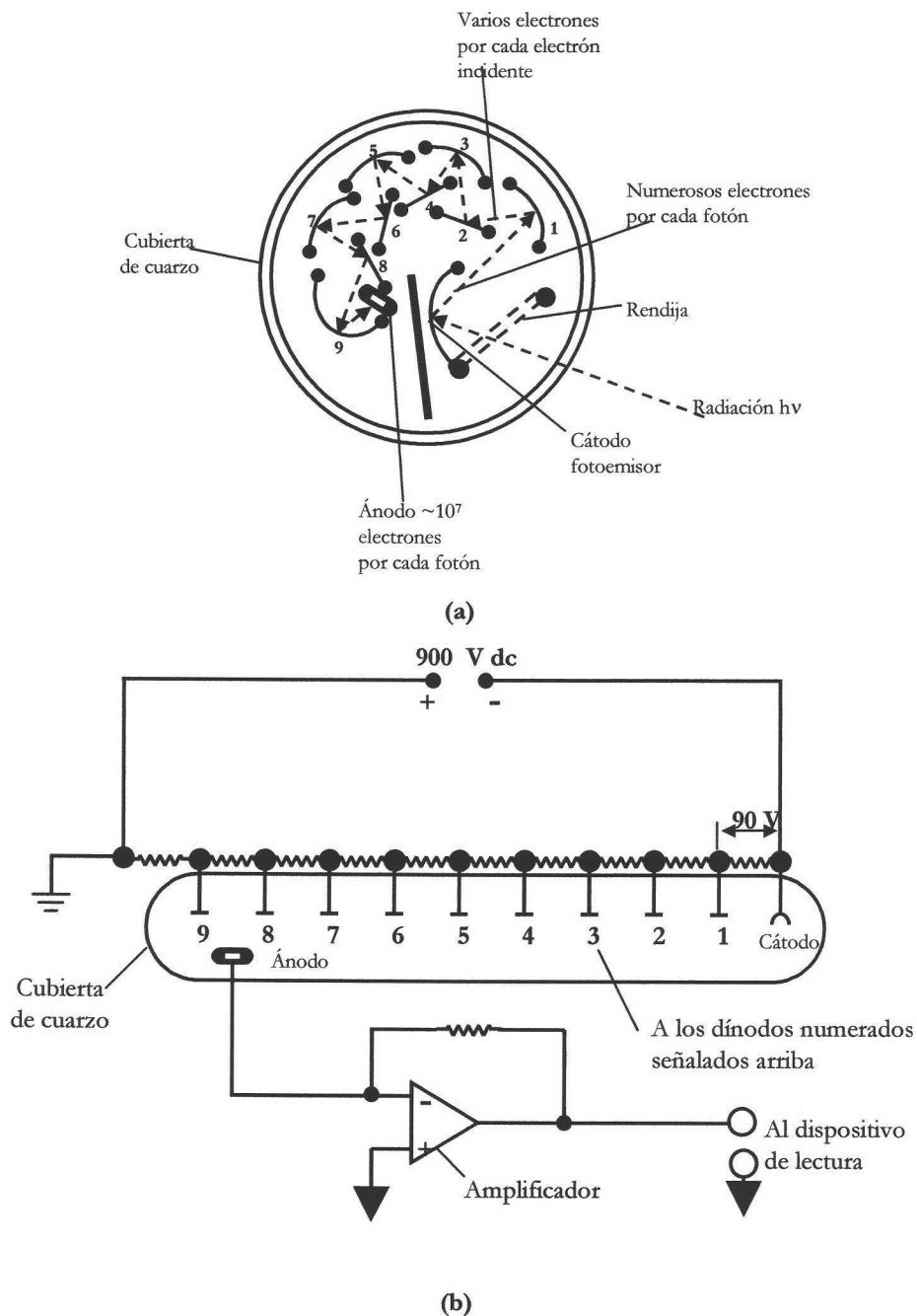


Figura 17. Diagrama de un tubo fotomultiplicador. a) Sección transversal del tubo, b) circuito eléctrico.

Una de las características más importantes de los tubos fotomultiplicadores es su sensibilidad relativa como función de la longitud de onda, por lo que un factor a tener en cuenta es la variación de la eficacia de los tubos fotomultiplicadores en ciertas regiones de

longitudes de onda. Esto tiene como consecuencia que los espectros que se obtienen no son los espectros reales y por esto varían entre instrumentos.

C.6.2 Detectores multicanal: dispositivo de acoplamiento de carga

El uso de los detectores multicanal en espectrometría de luminiscencia comienza en la década de los ochenta y aún está en desarrollo en la actualidad. Los modernos detectores multicanal constan de una serie de pequeños elementos fotoeléctricos en un único chip semiconductor, que contiene los circuitos electrónicos que hacen posible la determinación de la señal eléctrica, ya sea secuencialmente o simultáneamente¹⁰⁹.

La mayor ventaja de los detectores multicanal es su potencialidad en las medidas luminiscentes. Por ejemplo, si los tiempos de observación total empleados son iguales, la relación señal/ruido obtenida usando N detectores para observar simultáneamente N canales es $N^{1/2}$ mayor que la obtenida empleando un detector sencillo para observar N canales secuencialmente. Además, el tiempo requerido para N detectores observando simultáneamente N canales para obtener una relación señal/ruido dada es un factor N veces menor que el requerido para un detector sencillo observando secuencialmente N canales. Normalmente toda la ventaja del multicanal nunca se alcanza debido a que no se llega a las condiciones ideales¹¹⁰.

Existen diferentes tipos de detectores de imagen comercialmente disponibles¹¹¹⁻¹¹⁵ y en la actualidad los dispositivos de acoplamiento de carga (CCD) son los detectores multicanal más empleados en la construcción de sensores fluorescentes.

Los dispositivos de acoplamiento de carga se aproximan a las características de funcionamiento de los tubos fotomultiplicadores y, además, tienen la ventaja de ser

109. J.D. Ingle y S.R. Crouch. "Spectrochemical Analysis". Prentice Hall, 1988, Englewood Cliffs, NJ.

110. G.D. Christian, J.B. Callis, E.R. Davidson y E.L. Wehry. "Modern Fluorescence Spectroscopy". Plenum Press, 1981, Nueva York.

111. Y. Talmi. "Applicability of TV-Type multichannel detector to spectroscopy". Anal. Chem. 47 (1975) 658A.

112. A. Talmi, D.C. Baker, J.R. Jadamec y W.A. Saner. "Fluorescence spectrometry with optoelectronic image detectors". Anal. Chem. 50 (1978) 936A.

113. Y. Talmi. "Spectrophotometry and spectrofluorometry with the self-scanned photo-diode array". Appl. Spectrosc., 36 (1982) 1.

114. Y. Talmi. "Multichannel image detectors". ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1979, Washington, DC.

115. T. Talmi. "Multichannel image detectors". ACS Symposium Series, American Chemical Society, 1983, Washington, DC.

multicanal y bidimensionales. Por ello, este tipo de detectores se está empezando a usar cada vez más, siendo la forma de trabajar de los dispositivos de acoplamiento de carga semejante a la de una película fotográfica.

La Figura 18 corresponde a un plano transversal de uno de los píxeles que componen este dispositivo.

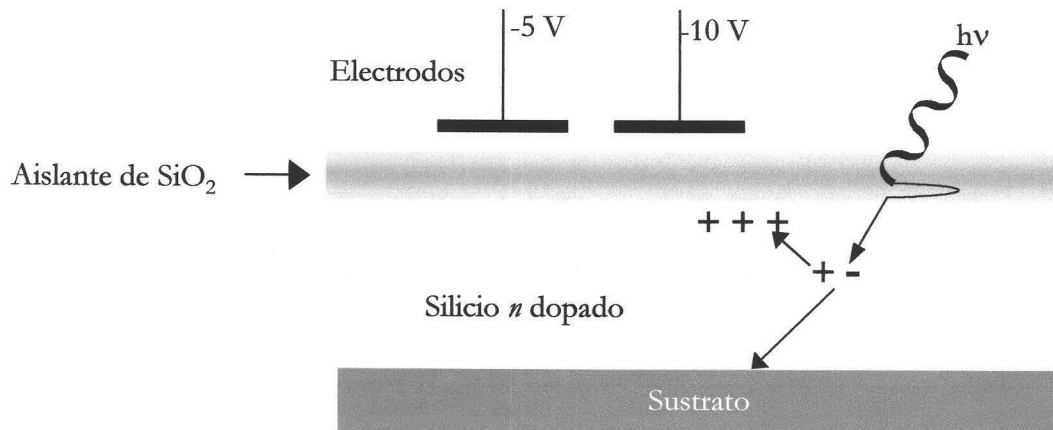


Figura 18. Sección transversal de un píxel.

En este caso el píxel dispone de dos electrodos conductores que se sitúan por encima de la capa aislante de sílice. La capa de sílice separa los electrodos de una región de silicio *n*-dopado constituyendo un condensador semiconductor de óxido de metal, que almacena las cargas formadas, mientras la radiación incide sobre el silicio dopado. Cuando se aplica una carga negativa a los electrodos, se crea una región de inversión de carga bajo éstos que es muy favorable al almacenamiento de huecos. Los huecos móviles, creados por la absorción de fotones, migran y se recogen en esta región. Esta región es capaz de mantener de 10^5 a 10^6 cargas antes de que pase al próximo píxel. La cantidad de carga generada durante la exposición a la radiación se mueve hasta un amplificador sensible a la carga para su medida.

El detector CCD está formado, típicamente, por 512×320 píxeles dispuestos en serie (Figura 19). En este dispositivo, el semiconductor está formado por silicio tipo *p* y el condensador está polarizado positivamente, de manera que los electrones formados por la absorción de radiación se recogen en el pozo debajo del electrodo, mientras que los huecos migran desde la capa tipo *n* hasta el sustrato. Para medir la carga acumulada se utiliza un circuito trifásico de reloj para desplazar gradualmente la carga hacia la derecha del registro del desplazamiento, de elevada velocidad, entonces las cargas se transfieren hacia abajo al

preamplificador y después al dispositivo de lectura. De esta manera, se completa un barrido fila por fila de la superficie del detector. En este caso, la lectura neutraliza la carga acumulada.

Los dispositivos de acoplamiento de carga ofrecen la ventaja de una mayor sensibilidad para bajos niveles de luz, mientras que, en algunos casos, la naturaleza destructiva de su proceso de lectura es una desventaja. Sin embargo, las cámaras CCD se están utilizando cada vez más en el diseño de sensores de fibra óptica.

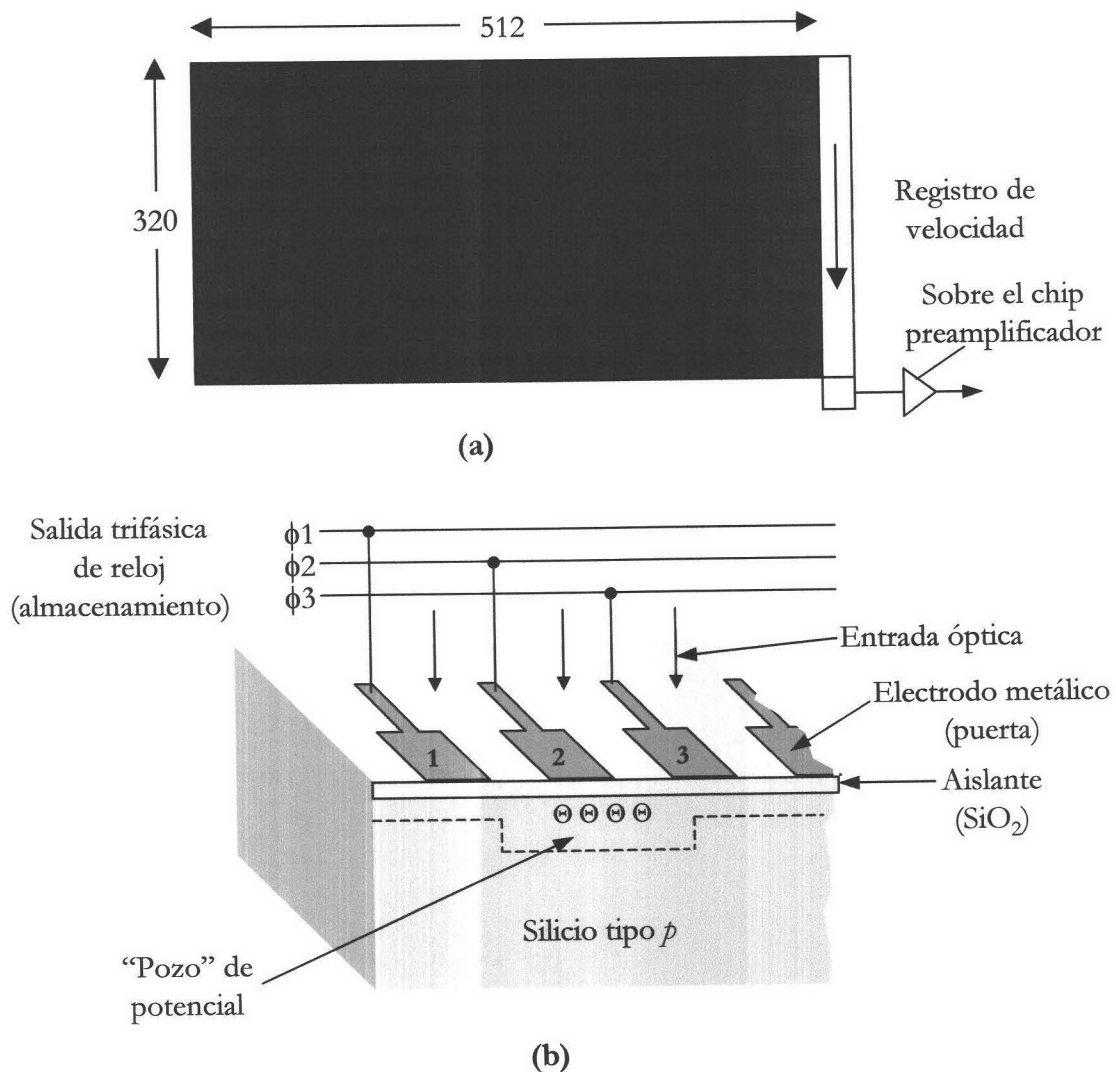
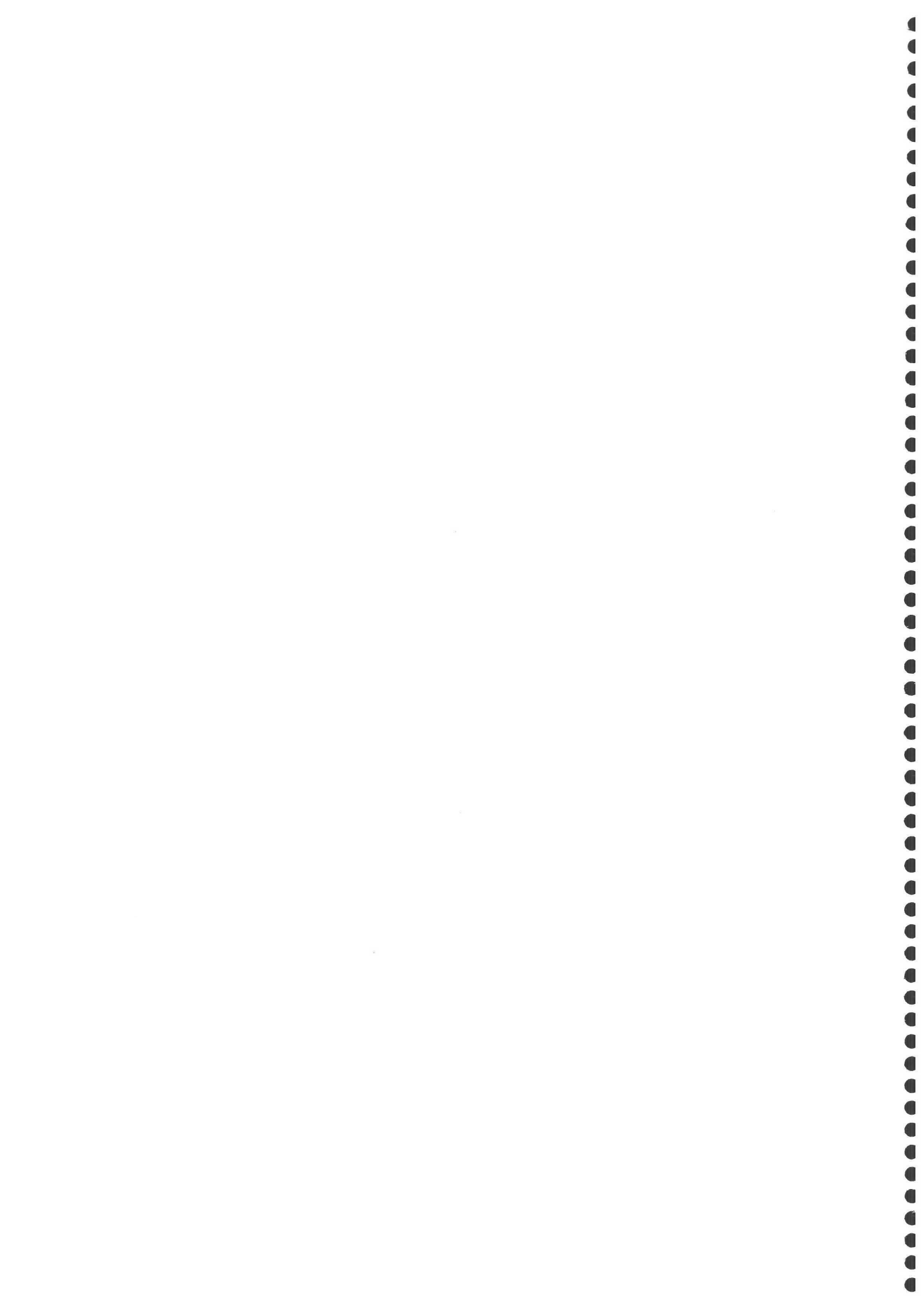
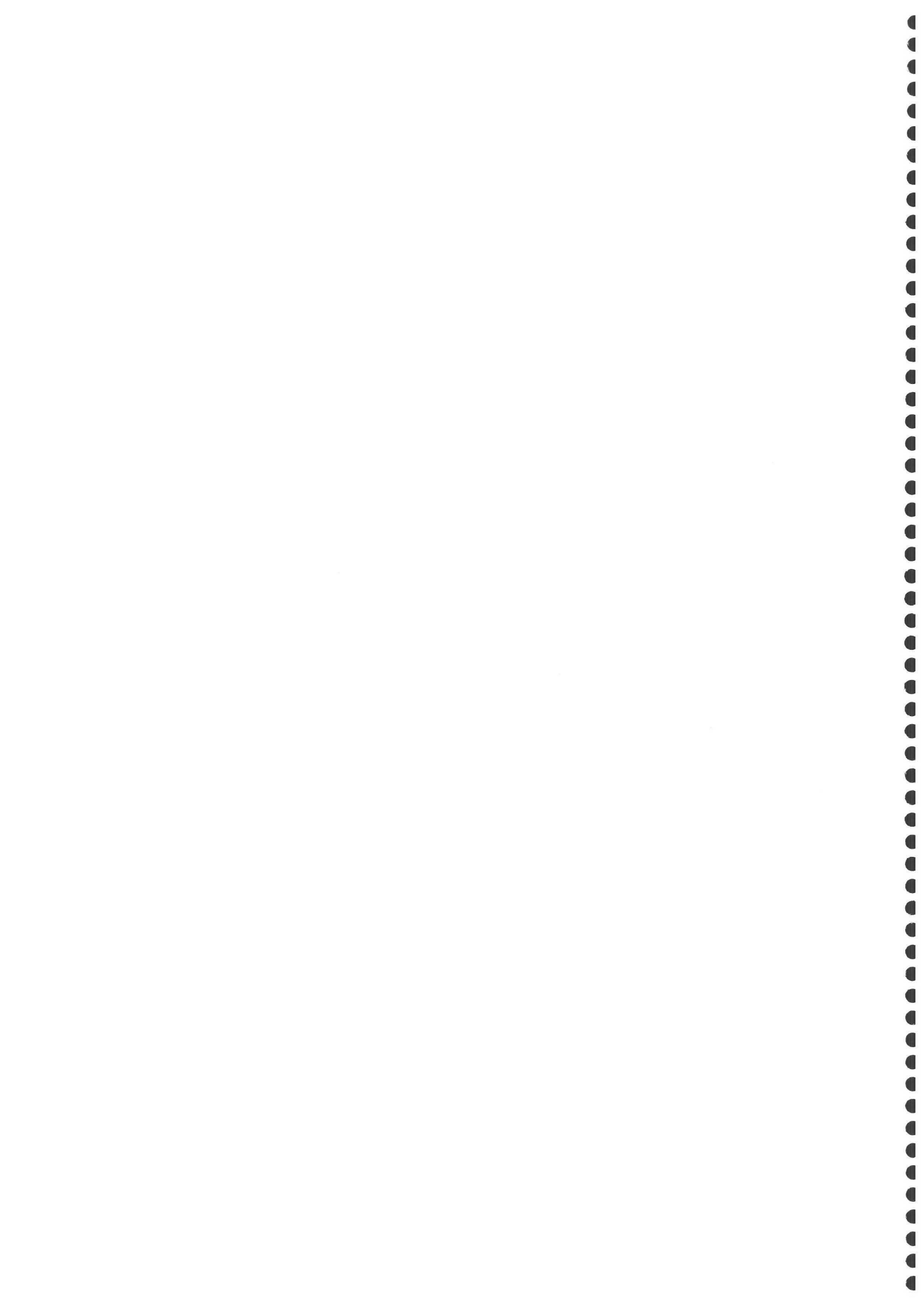


Figura 19. *Dispositivo de acoplamiento de carga. a) Dispositivo de 512x320 píxeles; b) esquema de cuatro de los detectores individuales.*



PARTE D
Redes neuronales en Química Analítica

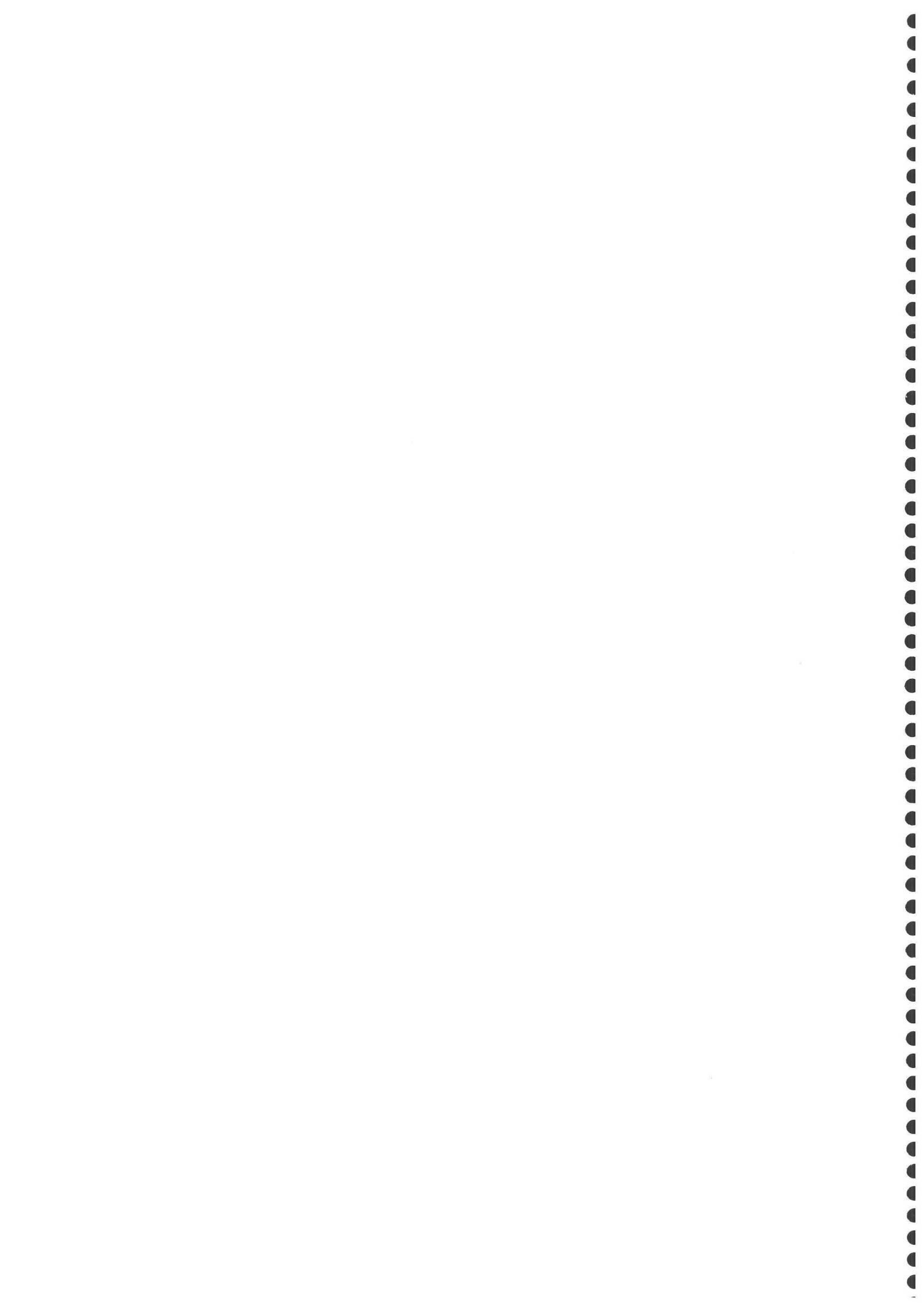


INTRODUCCIÓN

PARTE D

REDES NEURONALES EN QUÍMICA ANALÍTICA

D.1 Introducción a las redes neuronales artificiales.....	93
D.1.1 Analogía biológica.....	93
D.1.2 La neurona artificial.....	95
D.1.3 Conexiones entre neuronas	96
D.1.4 Definiciones de redes neuronales artificiales	96
D.2 Estructura de las redes neuronales artificiales	97
D.3 Modelos de redes neuronales.....	99
D.3.1 Perceptrón.....	99
D.3.2 Adaline y Madaline.....	100
D.3.3 Perceptrón multicapa.....	100
D.3.4 Otros modelos.....	101
D.4 Funcionalidad de las redes neuronales artificiales: reglas de aprendizaje y generalización	101
D.4.1 Reglas de aprendizaje.....	102
D.4.1.1 Reglas básicas de aprendizaje	103
D.4.1.2 Esquema de aprendizaje.....	105
D.4.2 Generalización de las redes neuronales artificiales.....	106
D.5 Método de aprendizaje por retropropagación de errores (backpropagation)	108
D.5.1 Tasa de aprendizaje y momento.....	110
D.5.2 QuickProp.....	111
D.6 Ventajas y desventajas en el uso de las Redes Neuronales	112
D.7 Aplicación de las redes neuronales a la Química Analítica.....	113



D.1 Introducción a las redes neuronales artificiales

Las redes neuronales artificiales (ANNs; *Artificial Neural Networks*) son sistemas paralelos para el procesamiento de datos, inspirados en el modo en el que las redes de neuronas biológicas del cerebro procesan éstos, es decir, que se han intentado plasmar los aspectos esenciales de una neurona real a la hora de diseñar una neurona “artificial”.

Estos modelos realizan una simplificación, averiguando cuáles son los elementos relevantes del sistema, bien porque la cantidad de información de que dispone es excesiva o bien porque es redundante. Una elección adecuada de sus características, más una estructura conveniente, es el procedimiento convencional utilizado para construir redes capaces de realizar una determinada tarea.

Es de prever que dichas ANNs tengan características similares a las del cerebro, con lo cual:

- Serán robustas y tolerantes a fallos.
- Serán flexibles. El cerebro se adapta a nuevas circunstancias mediante el aprendizaje.
- Podrán trabajar con información borrosa, incompleta, probabilística, con ruido o inconsistente.
- Serán altamente paralelas. El cerebro está formado por muchas neuronas interconectadas entre sí y es, precisamente el comportamiento colectivo de todas ellas, lo que caracteriza su forma de procesar la información.

El punto clave de las ANNs es la nueva estructuración de estos sistemas para el procesamiento de información y, a partir de esta información como ejemplo, las ANNs aprenden. Aprender en sistemas biológicos involucra la modificación de la interconectividad entre las neuronas; este concepto también es cierto para las ANNs.

D.1.1 Analogía biológica

Como ya se ha introducido, las ANNs tienen su punto de origen en el sistema nervioso animal. El pionero en la comprensión del funcionamiento del cerebro fue Ramón y Cajal quien, en 1899, introdujo la idea de neuronas como constituyentes básicos de la

estructura cerebral. Su principal característica observable es la interconectividad, recibiendo señales de las demás neuronas de su entorno a través de las dendritas. Esto produce una señal de salida que depende de los valores de todas las señales de entrada y que pasa a las demás neuronas a través de una fibra ramificada en conexiones sinápticas llamada axón (véase la Figura 20).

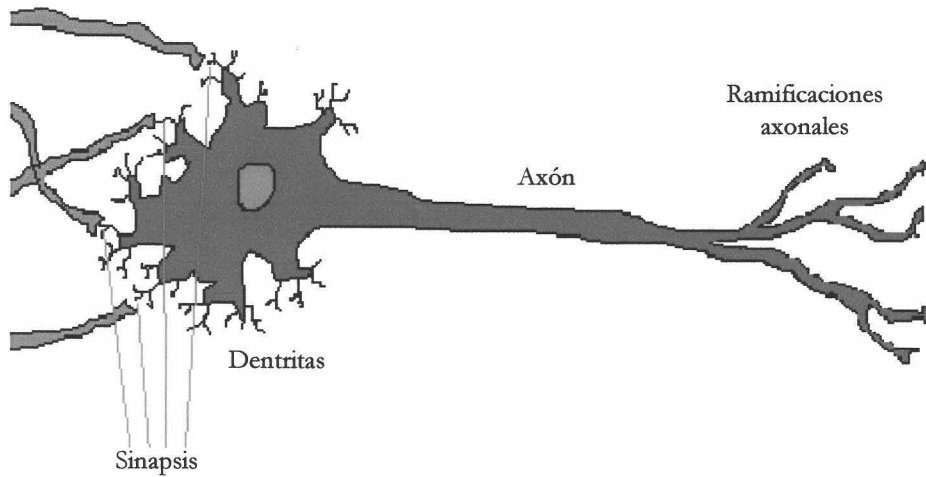


Figura 20. Neurona y conexiones sinápticas.

Se estima que el cerebro humano contiene cerca de 0.1 billón (10^{11}) de neuronas y de alrededor de 100 billones (10^{14}) de conexiones sinápticas mientras que estudios anatómicos del cerebro indican más de 1000 sinapsis a la entrada y salida de cada neurona. A pesar de que su velocidad es entre cinco y seis órdenes de magnitud menor que la de una puerta lógica, la enorme conectividad hace al cerebro animal más poderoso en determinadas tareas que el mejor de los supercomputadores.

Análogamente, en una ANN las señales de entrada se introducen por medio de una capa de nodos o neuronas de entrada, cada una de las cuales está unida a otras denominadas neuronas ocultas, dispuestas en capas, y que irán a su vez conectadas a los nodos de salida. Puede haber varias capas de nodos ocultos, aunque por simplicidad en la Figura 21 sólo se muestra una.

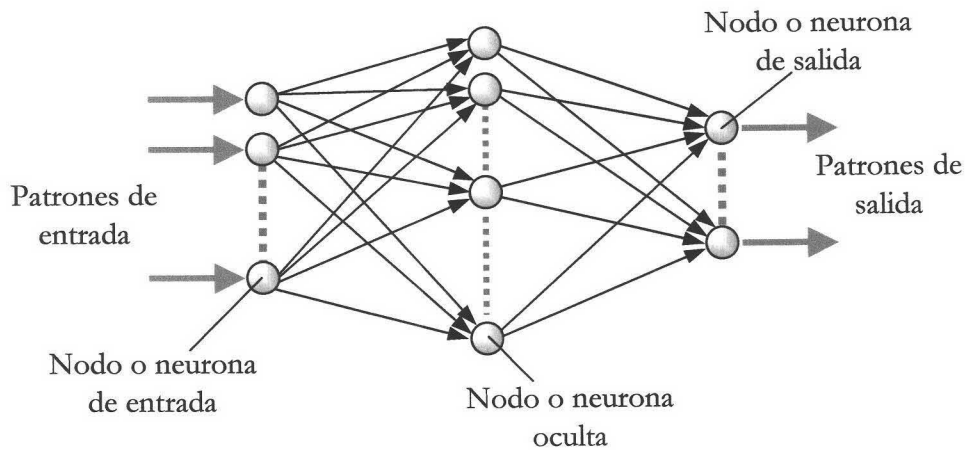


Figura 21. Red neuronal artificial típica.

D.1.2 La neurona artificial

Si se tienen N neuronas, podemos ordenarlas arbitrariamente y designarlas como unidades. Su trabajo es simple y único y consiste en recibir las entradas de las células vecinas y conectadas a ella y calcular un valor de salida, el cual es enviado a todas las células restantes (véase Figura 22).

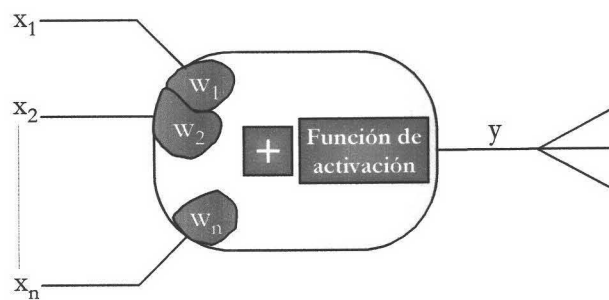


Figura 22. Neurona artificial.

Se conoce como capa o nivel a un conjunto de neuronas cuyas entradas provienen de la misma fuente (que puede ser otra capa de neuronas) y cuyas salidas se dirigen al mismo destino (que puede ser otra capa de neuronas). De esta manera se pueden destacar tres tipos de unidades (véase Figura 21):

- Las **unidades de entrada** reciben señales desde el entorno (son señales que proceden de sensores o de otros sectores del sistema).

- Las **unidades de salida** envían la señal fuera del sistema (son señales que pueden controlar directamente potencias u otros sistemas).
- Las **unidades ocultas** son aquellas cuyas entradas y salidas se encuentran dentro del sistema (son señales que no tienen contacto con el exterior).

D.1.3 Conexiones entre neuronas

Las conexiones que unen a las neuronas que forman una red neuronal artificial, tienen asociado un peso, que es el que hace que la red adquiera conocimiento.

Consideremos y_i como el valor de salida de una neurona i en un instante dado. Una neurona recibe un conjunto de señales que le dan información del estado de activación de todas las neuronas con las que se encuentra conectada. Cada conexión (sinapsis) entre la neurona i y la neurona j está ponderada por un peso w_{ji} . Normalmente, de forma simplificada, se considera que el efecto de cada señal es aditivo, de tal forma que la entrada neta que recibe una neurona (potencial postsináptico) net_j es la suma del producto individual por el valor de la sinapsis que conecta ambas neuronas:

$$net_j = \sum_i^N w_{ji} \cdot y_i$$

Esta regla muestra el procedimiento a seguir para combinar los valores de entrada a una unidad con los pesos de las conexiones que llegan a esa unidad y es conocida como regla de propagación.

D.1.4 Definiciones de redes neuronales artificiales

La definición más general considera una ANN como un entramado o estructura formada por muchos procesadores simples llamados nodos o neuronas, conectados por medio de canales de comunicación o conexiones. Cada una de ellas tiene una cantidad de memoria local, operando solamente con sus datos locales y sobre las entradas que recibe a través de esas conexiones.

Las ANNs llevan asociadas algún tipo de regla de aprendizaje o entrenamiento particular, por la cual, esas conexiones se ajustan según los ejemplos proporcionados. En

otras palabras, las ANNs aprenden a partir de ejemplos y muestran alguna capacidad para generalizar más allá de esos datos mostrados.

Otras definiciones de ANNs aparecidas en la bibliografía son:

- ☛ “Una red neuronal es un sistema compuesto de muchos elementos simples de proceso operando en paralelo cuya función está determinada por la estructura de la red, los pesos de las conexiones y el procesado realizado en los elementos o nodos de cálculo”.¹¹⁶
- ☛ “Una red neuronal es un procesador distribuido y con estructura paralela que tiene una tendencia natural a almacenar conocimiento experimental, haciéndolo apto para su uso. Se parece al cerebro en dos cosas: el conocimiento es adquirido por la red a través de un proceso de aprendizaje y este conocimiento se almacena en los pesos sinápticos o conexiones entre neuronas”.¹¹⁷
- ☛ “Una red neuronal es un circuito compuesto de un número elevado de elementos simples de proceso con una base neurológica. Cada elemento opera sólo con información local. Más aún, cada elemento opera asincrónicamente por lo que no hay un reloj total del sistema”.¹¹⁸
- ☛ “Los sistemas neuronales artificiales o redes neuronales son sistemas celulares físicos capaces de adquirir, almacenar y utilizar conocimiento extraído de la experiencia.”¹¹⁹

D.2 Estructura de las redes neuronales artificiales

Como se ha comentado anteriormente, las ANNs están constituidas por diferentes capas de neuronas. Se conoce topología de la red como la forma de interconectar las neuronas de una capa con la siguiente capa. En función de este concepto las redes neuronales se pueden clasificar en:

116. DARPA. “Neural Network Study”. AFCEA International Press, 1988, p.60.

117. S. Haykin, “Neural Networks: A Comprehensive Foundation”. MacMillan College, 1999, Nueva Jersey.

118. C. Bishop “Neural Networks for Pattern Recognition”. Clarendon Press, 1996, Oxford.

119. J.M. Zurada. “Introduction to Artificial Neural Systems”. PWS Publishing Company, 1992, Boston.

1. **Redes de propagación hacia delante (“*feed forward*”).** En la que las neuronas de cada capa están conectadas con las de la siguiente, de manera que reciben las entradas de una fuente y dirigen las salidas a la siguiente capa. Dentro de esta topología se puede hablar de dos bases estructurales:

- **Redes monocapa.** Una ANN formada por sucesivas capas tendrá como forma más simple una capa de nodos de entrada y otra de nodos de salida (véase Figura 23).

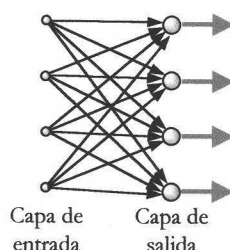


Figura 23. Red monocapa.

- **Redes multicapa.** Una ANN multicapa consiste en la extensión de la monocapa en una estructura con tantas capas ocultas como deseemos. Encontramos en esta arquitectura dos variantes: las ANNs totalmente conectadas (véase Figura 24a) y las parcialmente conectadas (véase Figura 24b) donde, dentro de éstas últimas, tenemos el caso de las ANNs localmente conectadas. Este subgrupo se caracteriza porque no todas las unidades de la capa oculta están conectadas a todas las unidades de entrada.

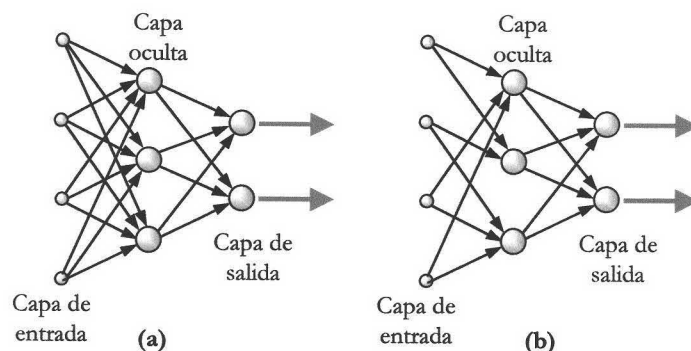


Figura 24. Redes multicapa. (a) Conexión total.
(b) Conexión parcial.

2. **Redes retroalimentadas o recurrentes (“feed back”).** La diferencia fundamental con las arquitecturas anteriores está en que aquí existe un lazo de realimentación. En la Figura 25 se muestra un tipo de arquitectura recurrente donde aparecen neuronas ocultas (opcional) y una realimentación formada por unidades de retardo denotadas por z^{-1} .

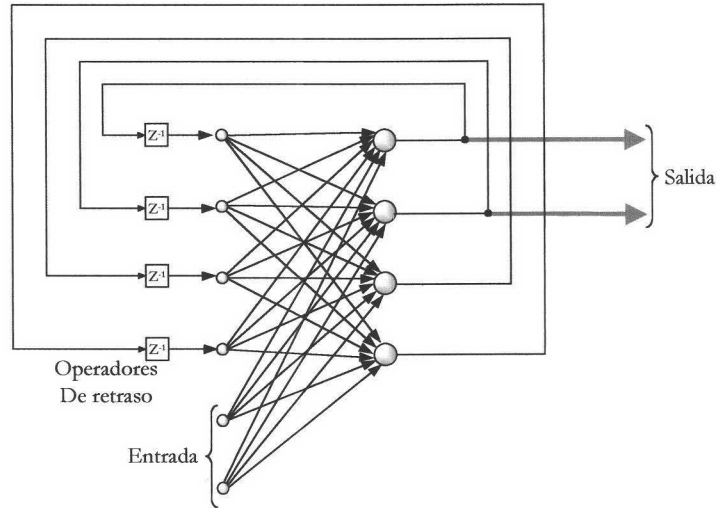


Figura 25. Red recurrente con neuronas ocultas.

D.3 Modelos de redes neuronales

D.3.1 Perceptrón

Un Perceptrón unicapa no es más que un conjunto de neuronas no unidas entre sí, de manera que cada una de las entradas del sistema se conecta a cada neurona, produciendo cada una de ellas su salida individual (véase Figura 26).

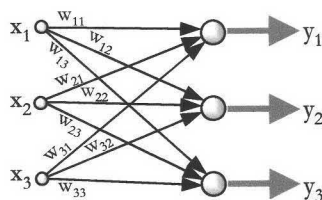


Figura 26. Modelo de Perceptrón.

Como ya hemos dicho, un conjunto de neuronas no sirve para nada si previamente no le enseñamos qué debe hacer. En el Perceptrón se pueden utilizar los métodos: supervisado, por refuerzo y no supervisado.

En el aprendizaje supervisado se presentan al Perceptrón unas entradas con las correspondientes salidas que queremos que aprenda. De esta manera la red primero calcula la salida que da ella para esas entradas y luego, conociendo el error que está cometiendo, ajusta sus pesos proporcionalmente al error que ha cometido (si la diferencia entre salida calculada y salida deseada es nula, no se varían los pesos).

D.3.2 Adaline y Madaline

Éste modelo es otro de los pioneros de las ANNs y es el más simple a la hora de aproximar. Se basa en el criterio del error cuadrático medio y fue introducido por Widrow. ADALINE sigue siendo de una sola capa como el Perceptrón, con la única diferencia de la función de transferencia lineal.

El método de entrenamiento que adopta este modelo es el de adaptación a los datos y se basa en el algoritmo de descenso en gradiente.

D.3.3 Perceptrón multicapa

Esta estructura nació con la intención de dar solución a las limitaciones del Perceptrón clásico o unicapa, y supuso el resurgimiento del movimiento conexionista. Como su nombre indica, se trata de unos cuantos (dos o tres) perceptrones unicapa conectados en cascada (véase Figura 27).

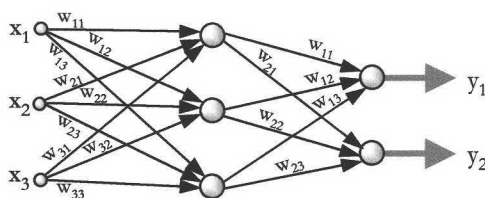


Figura 27. Modelo de Perceptrón multicapa.

El problema de este tipo de Perceptrón está en su entrenamiento, ya que es difícil modificar correctamente los pesos de la capa oculta. Para poder hacer aprender a un

Perceptrón de este tipo, se diseñó el algoritmo de retropropagación de errores (backpropagation), que tal como su nombre indica tiene la función de ir propagando los errores producidos desde la capa de salida hacia capas precedentes.

Este modelo de red es, con diferencia, el más ampliamente usado. Sus capacidades de aprendizaje y generalización han sido sobradamente establecidas por multitud de aplicaciones prácticas exitosas así como resultados teóricos firmemente establecidos. En particular, son el modelo usado en parte de los trabajos recogidos en esta Memoria.

D.3.4 Otros modelos

Dentro de los supervisados encontramos diversos modelos como los descritos brevemente a continuación:

- ☛ **Red neuronal con tiempo de retardo (Time Delay NN):** es una red multicapa donde las salidas de cada capa están retenidas durante un tiempo, conectándose todas a la vez a la siguiente capa. La aplicación donde más se encuentran estas redes es en las tareas de reconocimiento óptico.
- ☛ **Red neuronal probabilística (Probabilistic NN):** es una red de tres capas. Su mayor ventaja es que no necesita entrenamiento y la mayor desventaja que su funcionamiento es más lento.
- ☛ **Red neuronal de regresión generalizada (Generalized Regresion NN):** es una red, que, por lo general, no necesita un entrenamiento iterativo y se utiliza en problemas de clasificación o estimación de variables continuas.

D.4 Funcionalidad de las redes neuronales artificiales: reglas de aprendizaje y generalización

Para las aplicaciones de las redes neuronales artificiales al mundo real se deben cumplir dos tipos diferentes de requisitos en el procesado, por eso, podemos distinguir dos fases: la fase de aprendizaje o entrenamiento y la fase de prueba.

En la fase de entrenamiento se trata de determinar los pesos usando un conjunto de datos para definir el modelo neuronal. Una vez entrenado este modelo en la fase de prueba, se procesarán los patrones que constituyen la entrada habitual de la red, analizando así las prestaciones finales de la red.

- ☛ **Fase de prueba.** Los parámetros de diseño de la red neuronal se han obtenido unos patrones representativos de las entradas, a los que denominamos patrones de entrenamiento. Según el tipo de red, y en función de las ecuaciones dinámicas de prueba, los resultados pueden ser calculados de una vez o adaptados iterativamente. Para validar el diseño, una vez calculados los pesos, se comparan los valores de las neuronas de la última capa con la salida deseada.
- ☛ **Fase de aprendizaje.** Una característica básica de las ANNs es su capacidad de aprender. Aprenden por su actualización o cambio de los pesos sinápticos que caracterizan a las conexiones. Los pesos se adaptan de acuerdo a la información extraída de los patrones de entrenamiento nuevos que se van presentando.

Una vez acabado el proceso de entrenamiento se lleva a cabo la fase de generalización de la red neuronal, es decir, analizar la salida que proporciona ésta cuando se introducen entradas diferentes a las usadas en la etapa de entrenamiento.

En este apartado analizaremos los conceptos más importantes introducidos hasta ahora: aprendizaje y generalización.

D.4.1 Reglas de aprendizaje

Al igual que el funcionamiento de una red depende del número de neuronas de las que disponga y de cómo estén conectadas entre sí, cada modelo dispone de sus propias técnicas de aprendizaje. En el caso de las redes neuronales artificiales, se puede considerar que el conocimiento se encuentra en los pesos de las conexiones entre neuronas. Todo proceso de aprendizaje implica cierto número de cambios en estas conexiones. En realidad puede decirse que se aprende modificando los valores de los pesos de la red.

Mendel y McClaren (1970) definieron *aprendizaje* en el campo de las ANNs de la siguiente forma: “proceso por el cual los parámetros libres de una red neuronal son adaptados por medio

de un proceso de estimulación. El modo en que éstos cambios se produzcan nos indicarán el tipo de aprendizaje realizado.”

La definición de aprendizaje implica que la ANN estará estimulada desde fuera y que se producirán cambios como consecuencia directa de esta estimulación. La ANN responderá de alguna manera, ya que esos cambios se reflejarán en su estructura interna.

Existen varias clasificaciones posibles tanto en cuanto a las reglas, como a los esquemas de aprendizaje. Las distinciones se centran bien en la formulación matemática de los algoritmos de aprendizaje bien en sus características conceptuales. La división más genérica distingue entre aprendizaje supervisado y no supervisado.

En este apartado veremos una clasificación amplia que consta de cuatro reglas básicas de aprendizaje: aprendizaje por corrección del error, aprendizaje hebbiano, aprendizaje competitivo y aprendizaje de Boltzmann; junto con tres esquemas formales fundamentales que generan esas reglas de aprendizaje: aprendizaje supervisado, aprendizaje por refuerzo y aprendizaje auto-organizativo o no supervisado.

D.4.1.1 Reglas básicas de aprendizaje

Las reglas básicas del aprendizaje también se denominan algoritmos de aprendizaje al poseer una formulación matemática particular según el modo de actualización de los pesos sinápticos de la red. Cada regla, por tanto, tendrá unas ventajas específicas respecto las otras, dependiendo entre otros factores, de la aplicación.

1. ***Aprendizaje por corrección del error.*** En principio la señal proporcionada por una neurona de salida es diferente de la respuesta deseada para esa neurona por lo que es posible definir una señal de error. El propósito de este tipo de aprendizaje consiste en minimizar una función de error o coste basada en ese error cometido. Un criterio muy usado es el error cuadrático medio. La corrección de los pesos con ese fin es proporcional a la señal de error y a la de entrada.
2. ***Aprendizaje de Hebb o Hebbiano.*** En él, el ajuste de los pesos sinápticos será función de las actividades presinápticas y post-sinápticas, es decir, de la entrada y salida de la neurona. Como la definición es bastante amplia, existen muchos modelos para esta regla.

3. **Aprendizaje de Boltzmann.** Esta regla de aprendizaje fue derivada a partir de teorías de la información junto con consideraciones termodinámicas, debiendo su nombre a Boltzmann. En una máquina de Boltzmann, las neuronas constituyen una estructura recurrente y operan de forma binaria, esto es, +1/-1 son estados on/off. Además, se caracteriza por una función de energía E que está definida por los estados ocupados por cada neurona en la máquina. La máquina funciona de forma que se elige una neurona aleatoriamente y se le cambia de estado a una temperatura T (se trata de una analogía de una temperatura física) con una probabilidad determinada. Si esta regla se aplica sucesivamente la máquina alcanzará un equilibrio térmico.

4. **Aprendizaje competitivo.** Hay tres elementos fundamentales en este tipo de aprendizaje: a) Un conjunto de neuronas idénticas excepto porque existen algunas conexiones aleatoriamente distribuidas que responden de forma diferente a un conjunto de entradas. b) Un límite impuesto a los pesos relacionados con cada neurona. c) Un mecanismo que permite a las neuronas competir por el derecho a responder a unas entradas, de forma que sólo una neurona, o una por grupo activo, podrá hacerlo. La neurona que gana esa competición se llama “neurona que se lo lleva todo”. Una ANN de este tipo puede tener conexiones laterales con otras neuronas de tipo inhibitorio y el resto serán excitatorias (véase Figura 28).

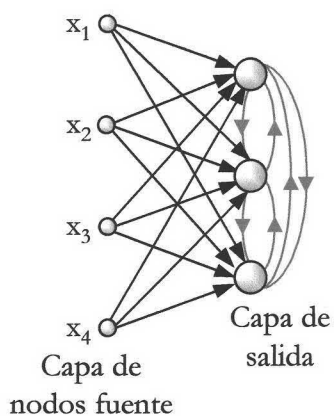


Figura 28. Red de aprendizaje competitivo.

D.4.1.2 Esquema de aprendizaje

Los esquemas de aprendizaje pueden ser clasificadas en dos bloques: aprendizaje supervisado y aprendizaje no supervisado.

Las ANNs de pesos fijos no cuentan con una regla de aprendizaje, por la cual, a través de un proceso iterativo, los pesos de la red sean ajustados por lo que un modelo podrá definirse de partida como supervisado o no supervisado. En cambio se incluyen en la clasificación de los esquemas de aprendizaje las ANNs de aprendizaje por refuerzo, si bien éstas podrían agruparse junto a las supervisadas. La distinción se apoya en que los sistemas supervisados se definen en términos de objetivos o respuestas deseadas que son empleadas directamente en el cálculo de unas determinadas funciones de error a minimizar, mientras que las de aprendizaje por refuerzo se basan en la asignación de un “premio” o un “castigo” según la actuación, sin tener en cuenta en realidad el valor de la señal deseada. Es pues, una sutil distinción entre aprendizaje instructivo y evaluativo o entre identificación y control.

1. **Aprendizaje supervisado.** También se llama aprendizaje activo o formulación basada en la aproximación y se caracteriza primordialmente por disponer de un maestro capaz de proveer a la ANN de una salida deseada con el fin de calcular una señal de error que sirva a la red para emular al maestro (véase Figura 29). Se encuentran íntimamente relacionadas con las reglas de aprendizaje por corrección del error presentadas en el apartado anterior.
2. **Aprendizaje por refuerzo.** También se denominan de formulación basada en la competición, refiriéndose al hecho de que el aprendizaje se realizará asignando nodos ganadores y perdedores dependiendo de los resultados obtenidos. Se basa en una aplicación de las señales de entrada-salida por medio de un proceso de prueba y error diseñado para maximizar un índice de actuación o éxito llamado señal de refuerzo.
3. **Aprendizaje auto-organizativo o no supervisado.** En este tipo de aprendizaje la red puede considerarse autónoma, determinando características generales de los datos presentados y aprendiendo a reflejar esas propiedades en las salidas correspondientes. Lo que en realidad son estas propiedades, y que la red puede

aprender a reconocer, dependerá del modelo neuronal concreto así como del método de aprendizaje utilizado (véase Figura 30).

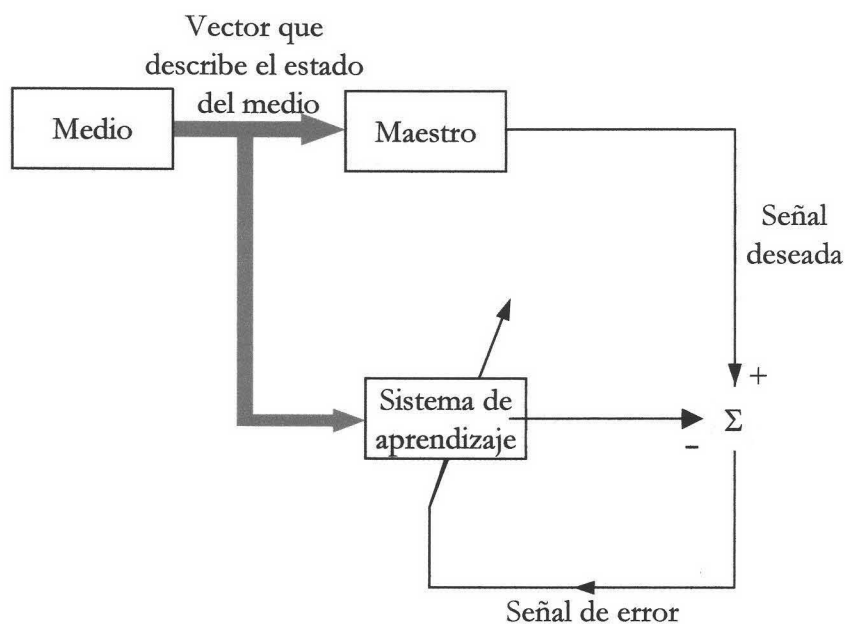


Figura 29. Diagrama de bloques del aprendizaje supervisado.

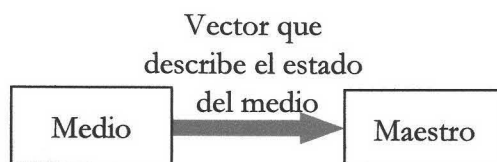


Figura 30. Diagrama de bloques del aprendizaje no supervisado.

D.4.2 Generalización de las redes neuronales artificiales

Diremos que una red neuronal es capaz de generalizar cuando existe una estrecha relación entre la salida deseada y la salida calculada por la red para muestras o ejemplos que nunca han sido usados para entrenarla. Esto es, dispondremos de un conjunto de datos, ejemplos o patrones para ajustar los pesos de la red según un determinado algoritmo de aprendizaje (conjunto de entrenamiento), así como de un conjunto de datos, ejemplos o patrones que la red nunca ha utilizado (conjunto de generalización). La generalización será la cualidad que poseen las ANNs para extraer información de los datos presentados en su entrenamiento y extender ese conocimiento más allá de esas situaciones conocidas.

El proceso de aprendizaje (entrenamiento de la red neuronal) puede ser visto como un problema de ajuste de una curva. La red puede ser considerada simplemente como un aplicador no lineal de datos entrada-salida. Esto permite asentar sin ningún tipo de misticismo por qué la red es capaz de generalizar: las redes neuronales así vistas tienen la propiedad de realizar buenas interpolaciones y/o extrapolaciones no lineales de los datos de entrada.

En el aprendizaje se puede cometer el error de entrenar en exceso la red de modo que ésta memorice y se comporte como una tabla sin ninguna capacidad para aportar respuestas válidas frente a los datos de prueba presentados. De esta manera, la generalización no siempre es posible. Hay tres condiciones típicamente necesarias (aunque no suficientes) para una buena generalización:

1. Que las entradas de la red contengan suficiente información perteneciente a la salida, de modo que sea factible la existencia de una función matemática que las relacione. Esto implica que el número de casos de entrenamiento sea suficientemente grande y representativo de todos los casos que queramos generalizar. La importancia de este punto estriba en que existen dos tipos de generalización: la interpolación y la extrapolación. La interpolación se aplica a casos que están más o menos cercanos a casos de entrenamiento; cualquier otra cosa es extrapolación. Por tanto, precisamos tener el número necesario de muestras de entrenamiento para evitar la extrapolación.
2. Que la función que intentamos aprender sea suave, esto es, que un pequeño cambio en las entradas debería, la mayoría de las veces, producir un pequeño cambio en las salidas.
3. Que apliquemos información adicional para optimizar nuestro modelo, haciendo uso de funciones correctoras, eligiendo las muestras idóneas para entrenar de forma que el aprendizaje sea óptimo, adecuando estructuras a la aplicación específica, etc..

D.5 Método de aprendizaje por retropropagación de errores (Backpropagation)

El algoritmo de retropropagación de errores (“*Backpropagation*”; BP) es un método basado en corrección de error. El algoritmo se basa en minimizar una función que mide el error cometido por la red con respecto al conjunto de entrenamiento. La optimización se realiza por descenso en gradiente.

El error cometido por la red se cuantifica como la diferencia entre la salida dada por la red y la que realmente debería ser. La dificultad reside en que hay un gran número de sinapsis que contribuyen a dicho error y que no se conoce cuál es la contribución directa de las unidades ocultas a éste error, por tanto, no se conoce cómo modificar correctamente los pesos de las sinapsis asociados a ellas.

El problema se puede abordar si se admite que el error que se observa en la capa de salida se debe primordialmente a la acción de las unidades ocultas ubicadas en la capa inmediatamente anterior, que a su vez se ven influenciadas por los elementos de la capa anterior, y así sucesivamente. El proceso adaptativo queda definido en dos etapas que se van repitiendo hasta que se da por realizado el aprendizaje. En la primera, se evalúa el nivel de actividad de todas las neuronas de la red manteniendo congelados los valores de las sinapsis, lo cual permite determinar la magnitud del error existente. En una segunda etapa, dicho error se propaga hacia atrás (o retropropaga) capa a capa modificando convenientemente los pesos que, en la etapa siguiente, servirán para calcular el nuevo error. Este proceso es el que da nombre al algoritmo de aprendizaje.

De modo esquemático, sea $\omega(t)$ el valor de los pesos en el paso t , entonces los pesos deben ser modificados según:

$$\begin{aligned}\omega(n+1) &= \omega(n) + \Delta\omega(n) \\ &= \omega(n) - \eta \nabla E\end{aligned}$$

donde ∇E es el vector gradiente de la función de error, E , con respecto a los pesos ω .

$$\nabla E = \left[\frac{\partial E}{\partial \omega_{j,p}} \right]_{j,p}$$

Consideremos una red con n neuronas de entrada, b neuronas ocultas y m neuronas de salida (véase la Figura 31). La función de activación es una función diferenciable de la entrada efectiva a la neurona:

$$a_j^p = F_j(e_j^p)$$

en la que

$$e_j^p = \sum_i \omega_{ij} a_i^p + \theta_j$$

que es la entrada efectiva a la unidad j -ésima para el ejemplo p -ésimo.

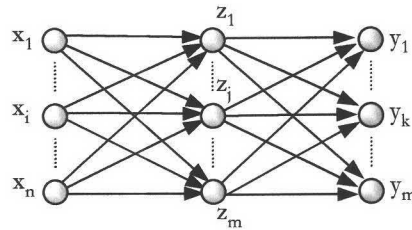


Figura 31. Red neuronal multicapa.

Tras la primera etapa en la que se evalúa el error cometido por la red, cada peso es ajustado según:

$$\Delta_p \omega_{ij} = \gamma \delta_j^p a_i^p$$

El valor de δ_j^p adopta formas distintas para el caso de unidades de salida o internas. Se comienza haciendo el ajuste para los pesos que unen las unidades de la capa oculta con la de salida. En este caso:

$$\delta_j^p = (d_j^p - a_j^p) F'_j(e_j^p)$$

para cualquier unidad de salida j . Si se trata de una unidad oculta, los valores de δ_j^p se calculan según:

$$\delta_j^p = F'_j(e_j^p) \sum_{b=1}^{N_o} \delta_b^p \omega_{bj}$$

Las ecuaciones anteriores nos dan un procedimiento recursivo para calcular los δ para todas las unidades de la red. Este procedimiento constituye la regla delta generalizada o el algoritmo de retropropagación de errores.

A continuación, mostramos la particularización de las expresiones del algoritmo para el caso en que la función de activación sea la logística. La función logística se define:

$$F(e_j^p) = \frac{1}{1 + \exp(-e_j^p)}$$

y su derivada es:

$$F'(e_j^p) = a_j^p(1 - a_j^p)$$

Los δ para las unidades de salida resultan:

$$\delta_j^p = (d_j^p - a_j^p)a_j^p(1 - a_j^p)$$

y para las unidades de la capa oculta:

$$\delta_j^p = a_j^p(1 - a_j^p) \sum_{b=l}^{N_0} \delta_b^p \omega_{bj}$$

D.5.1 Tasa de aprendizaje y momento

Cualquier método de descenso en gradiente requiere que el ajuste se realice mediante pasos infinitesimales, pero a efectos prácticos interesa una tasa de aprendizaje γ grande que permita un aprendizaje rápido. El problema es que se pueden presentar oscilaciones. Un modo de evitar las oscilaciones para valores grandes es realizar cambios en los pesos dependientes de los cambios anteriores añadiendo un término momento:

$$\Delta\omega_{ij}(t+1) = \gamma\delta_i^p a_j^p + \alpha\Delta\omega_{ij}(t)$$

donde α , llamada constante de momento, mide la importancia del ajuste anterior en el actual.

D.5.2 QuickProp

El método clásico de retropropagación de errores tiene una serie de inconvenientes, del que su lentitud es el más importante. Por ello, desde su propuesta en 1985 han aparecido múltiples propuestas de carácter heurístico para acelerar su convergencia.

Un conjunto importante de estas propuestas se basan en algoritmos de segundo orden, que además del gradiente usan más información sobre la forma de la función de error. La actualización de los pesos de las sinapsis es más eficaz si también se usa la cuadratura de la función de error. En los métodos de segundo orden se utiliza aproximaciones cuadráticas de la función de error.

Quickprop es uno de estos métodos que adopta un enfoque bastante simple: La idea es aproximar la superficie de error, como una función de cada peso, mediante un polinomio cuadrático (es decir, una parábola), y utilizar dos evaluaciones de la función de error y su gradiente para determinar los coeficientes del polinomio. En cada paso del algoritmo, el valor que se asigna a los pesos es el mínimo de la parábola. Esto nos lleva a la siguiente expresión para modificar los pesos en el paso t :

$$\Delta\omega(t+1) = \frac{g_i(t)}{g_i(t-1) - g_i(t)} \Delta\omega_i^{(t)}$$

donde

$$g_i(t) = \frac{\partial E}{\partial \omega_i(t)}$$

es decir, el gradiente de la función de error en el peso ω_i .

El algoritmo se puede iniciar realizando un paso de descenso en gradiente. Esto implica aceptar que el resultado de un ajuste cuadrático es obtener una parábola con un mínimo. Si en lugar de mínimo, la parábola tiene máximo, el algoritmo puede ir a un conjunto de pesos que empeoran la solución. Además, es necesario fijar un tamaño máximo de ajuste para solventar el problema de parábolas prácticamente planas.

D.6 Ventajas y desventajas en el uso de las Redes Neuronales

El poder de cálculo de las ANNs se encuentra en dos razones: su estructura, masivamente interconectada en paralelo y su habilidad para generalizar, ofreciendo las siguientes propiedades y ventajas:

1. **No linealidad.** Como una neurona es un dispositivo no lineal, la red neuronal será no lineal, hecho importante al trabajar con funciones inherentemente no lineales.
2. **Aplicación entrada-salida.** La ANN aprende de los ejemplos presentados construyendo una aplicación entrada-salida sin necesidad de conocer “*a priori*” las características del problema.
3. **Adaptabilidad.** La capacidad de las redes neuronales para adaptar sus pesos sinápticos a cambios en el ambiente (entradas) es una herramienta muy útil para realizar de forma adaptativa la clasificación de patrones, el procesado de la señal y el control.
4. **Información contextual.** Cada neurona en la red está potencialmente afectada por la actividad de todas las demás en la red. Consecuentemente, la red maneja la información contextual con naturalidad.
5. **Tolerancia a fallos.** Una red neuronal implementada en hardware tendrá inherentemente una cierta tolerancia a fallos tanto en cuanto esté sometida a condiciones anómalas y por ellas se vea degradada en su funcionamiento.
6. **Implementabilidad VLSI.** El alto grado de conectividad hace de las ANNs estructuras extraordinariamente rápidas en la ejecución de determinadas tareas, y al mismo tiempo, ideales para su implementación VLSI (Very Large Scale Integration).
7. **Uniformidad del análisis y el diseño.** De la nomenclatura usada en análisis y diseño, se infieren tres características: a) Las neuronas son los constituyentes mínimos en todas las redes neuronales, b) Esto hace posible el intercambio de teorías y algoritmos de aprendizaje, c) Las Redes Modulares serán implementadas a partir de bloques previos.

El uso de redes neuronales artificiales también presenta una serie de desventajas, como son su dificultad de interpretación por el experto de los parámetros y pesos que interconexionan las neuronas y por eso son consideradas como cajas negras, y su dificultad para incorporar conocimiento experto.

D.7 Aplicación de las redes neuronales a la Química Analítica

La Quimiometría como rama especializada dentro de la técnica y la ciencia es una disciplina joven. Las redes neuronales artificiales se desarrollaron independientemente de la Quimiometría, como una derivación de las descripciones anatómicas y biológicas de las redes neuronales reales.

El primer trabajo de ANNs aplicado a la Química Analítica data de 1971. Sin embargo estuvo en un estado de letargo hasta hace unos diez años, que se empezaron a emplear las ANNs para la resolución de mezclas complejas y para la clasificación y/o caracterización de productos alimenticios^{120,121}.

Las redes neuronales se empezaron a usar en Química Analítica para la identificación de ciertas especies llevando a cabo un análisis mediante espectrometría de

120. H.G. Schulze, L.S. Greek, B.B. Gorzalka, A.V. Bree, M.W. Blades y R.F.B. Turner. "Artificial neural network and classical least-squares methods for neurotransmitter mixture analysis". *J. Neurosci. Meth.*, 56 (1995) 155.

121. J. Klocker, B. Wailzer, G. Buchbauer y P. Wolschmann. "Aroma quality differentiation of pyrazine derivatives using self-organizing molecular field analysis and artificial neural network". *J. Agr. Food Chem.*, 50 (2000) 4069.

masas¹²²⁻¹²⁶. Paralelamente, se empezaron a usar las redes neuronales junto con la detección mediante espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier^{127,128}.

También en la bibliografía aparecen publicaciones en las que se usan las redes neuronales artificiales para el análisis mediante resonancia magnética nuclear de protones¹²⁹, métodos electroanalíticos¹³⁰⁻¹³², métodos espectrofotométricos en el infrarrojo cercano¹³³⁻¹³⁹ y espectrofotométricos ultravioleta-visible^{140,141}.

122. J. Chun, E. Atalane, A.C. Ward y M. Goodfellow. "Artificial neural network analysis of pyrolysis mass-spectrometric data in the identification of streptomyces strains". *Fems. Microbiol. Lett.*, 107 (1993) 321
123. J. Chun, E. Atalane, S.B. Kim, H.J. Kim, M.E. Hamid, M.E. Trujillo, J.G. Magee, G.P. Manfio, A.C. Ward y M. Goodfellow. "Rapid identification of streptomycetes by artificial neural network analysis of pyrolysis mass-spectra". *Fems. Microbiol. Lett.*, 114 (1993) 115.
124. R. Freeman, R. Goodacre, P.R. Sisson, J.G. Magee, A.C. Ward y N.F. Lightfoot. "Rapid identification of species within the microbacterium-tuberculosis complex by artificial neural network analysis of pyrolysis mass-spectra". *J. Med. Microbiol.*, 40 (1994) 170.
125. P.R. Sisson, F. Freeman, D. Law, A.C. Ward y N.F. Lightfoot. "Rapid determination of verocytotoxin production status in escherichia-coli by artificial neural network analysis of pyrolysis mass-spectra". *J. Anal. Appl. Pyrol.*, 32 (1995) 179.
126. S.G. Kang, D.H. Lee, A.C. Ward y K.J. Lee. "Rapid and quantitative analysis of clavulanic and production by the combination of pyrolysis mass spectrometry and artificial neural network". *J. Microbiol. Biotech.*, 8 (1998) 523.
127. D.A. Powdell, V. Turula, J.A. Dehaseth, H. Vanhalbeek y B. Meyer. "Sulfate detection in glycoprotein-derived oligosaccharides by artificial neural network analysis fourier-transform infrared-spectra". *Anal. Biochem.*, 220 (1994) 20.
128. Y. Lin, J. Wang, Z.R. Chem y X.T. Zhou. "Artificial neural network for the quantitative analysis of air toxic VOCs". *Anal. Lett.*, 34 (2001) 2203.
129. Y. Hiltunen, J. Kaartinen, J. Pulkkinen, A.M. Hakkinen, N. Lundbom y R.A. Kauppinen. "Quantification of human brain metabolites from in vivo H-1 NMR magnitude spectra using automated artificial neural network analysis". *J. Magn. Reson.*, 154 (2002) 1.
130. H. Chan, A. Butler, D.M. Falck y M.S. Freund. "Artificial neural network processing of stripping analysis response for identifying and quantifying heavy metals in the presence of intermetallic compound formation". *Anal. Chem.*, 69 (1997) 2373.
131. T. Khayamian, A.A. Ensafi y M. Atabati. "Extending the dynamic range of the determination of copper by adsorption differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network". *Microchem. J.*, 65 (2000) 347.
132. A.A. Ensafi, T. Khayamian y M. Atabati. "Simultaneous voltammetric determination of molybdenum and copper by adsorption cathodic differential pulse stripping method using a principal component artificial neural network". *Talanta*, 57 (2002) 785.
133. Y.L. Ren, Y.H. Gou, R.X. Ren, P.Y. Liu e Y. Guo. "Application of artificial neural network multivariate calibration to near-infrared spectrophotometric determination of powdered pharmaceutical metronidazole". *Spectrosc. Lett.*, 32 (1999) 431.
134. Y.L. Ren, Y.H. Gou, Z. Tang, P.Y. Liu e Y. Guo. "Nondestructive quantitative analysis of analgin powder pharmaceutical by near-infrared spectroscopy and artificial neural network technique". *Anal. Lett.*, 33 (2000) 69.
135. P.Y. Liu, Y.L. Ren, Y.H. Gou, Y. Guo, Z.M. Wang, Z. Tang, L.R. Tian e Y.R. Du. "Nondestructive quantitative analysis of trimethoprim powder pharmaceutical by artificial neural network and near-infrared spectroscopy". *Chem. J. Chinese Univ-Chinese*, 21 (2000) 544.
136. Y.B. Wang, H.F. Yuan, W.Z. Lu, H.X. Qi y Z.L. Yin. "Application of artificial neural network for the determination of diesel fuel flash point by near-infrared spectroscopy". *Chinese J. Anal. Chem.*, 28 (2000) 1070.
137. Y. Li, X.Y. Sun y J.D. Wang. "Determination of five component infrared spectra system with artificial neural network". *Spectrosc. Spectr. Anal.*, 20 (2000) 773.

Dentro de los métodos luminiscentes también se han utilizado las redes neuronales^{142,145} y son de gran importancia éstas en la resolución espectral y en la selección de las condiciones experimentales e instrumentales de los métodos luminiscentes.

Así, en 1997, Liu *y col.*¹⁴⁴ utilizaron un Perceptrón multicapa para llevar a cabo una calibración multivariante no lineal de datos fluorimétricos. En 1999 y 2000, respectivamente, Todeschini *y col.*¹⁴⁵ y Capitán Vallvey *y col.*¹⁴⁶ usaron una red de Kohonen en la selección de las longitudes óptimas para llevar a cabo una calibración multivariante PLS de una mezcla de compuestos cuyos espectros de fluorescencia estaban solapados.

En 2000, Li *y col.*¹⁴⁷ compararon los resultados obtenidos con un Perceptrón multicapa y una red de función base radial (radial basis function) para la determinación simultánea de una mezcla de colorantes fluorescentes mediante espectros de fluorescencia sincrónica.

En 2001, Dolenko *y col.*¹⁴⁸ utilizó las redes neuronales artificiales para la resolución espectral de una mezcla de dos sustancias fluorescentes usando para ello fluorescencia

-
138. Y. Guo, Y.H. Gou, Z. Tang, F.Q. Liu y L.R. Tian. "Nondestructive quantitative analysis of metformin powder pharmaceutical by artificial neural network and near-infrared spectrometry". *Chinese J. Anal. Chem.*, 29 (2001) 121.
139. R.X. Ren, Z. Tang, F.Q. Liu, Y.H. Gou, e Y.L. Ren. "Nondestructive quantitative analysis of paracetamol in powder pharmaceutical by artificial neural network and near-infrared spectroscopy". *Spectrosc. Spectr. Anal.*, 21 (2001) 521.
140. B. Rezaei, A.A. Ensafi y F. Shandizi. "Simultaneous determination of cobalt and nickel by spectrophotometric method and artificial neural network". *Microchem. J.*, 70 (2001) 35.
141. C.Y. He, Y.M. Sun, G.H. Wu y R. Chen. "Application of artificial neural network to simultaneous spectrophotometric determination of Cu, Co and Ni". *Spectrosc. Spectr. Anal.*, 21 (2001) 719.
142. P.B. Oldham, M.E. McCarroll, L.B. McGown e I.M. Warner. "Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry". *Anal. Chem.*, 72 (2000) 197R.
143. R.A. Agbaria, P.B. Oldham, M. McCarroll, L.B. McGown e I.M. Warner. "Molecular fluorescence, phosphorescence and chemiluminescence spectrometry". *Anal. Chem.*, 74 (2002) 3952.
144. P. Liu, Y.Z. Liang, S.G. Wang, X.H. Song y R.Q. Yu. "Artificial neural network for multivariate nonlinear calibration of fluorimetric data". *Acta Chim. Sin.*, 55 (1997) 386.
145. R. Todeschini, D. Galvagni, J.L. Vilchez, M. del Olmo y N. Navas. "Kohonen artificial neuronal networks as a tool for wavelength selection in multicomponent spectrofluorimetric PLS modelling: application to phenol, o-cresol and p-cresol mixtures". *Trend Anal. Chem.*, 18 (1999) 93.
146. L.F. Capitán Vallvey, N. Navas, M. del Olmo, V. Consonni y R. Todeschini. "Resolution of mixtures of three nonsteroidal anti-inflammatory drugs by fluorescence using partial least squares multivariate calibration with previous wavelength selection by Kohonen artificial neuronal networks". *Talanta*, 52 (2000) 1069.
147. Q.F. Li, X.J. Yao, X.G. Chen, M.C. Liu, R.S. Zhang, X.Y. Zhang y Z.D. Hu. "Application of artificial neural networks for the simultaneous determination of a mixture of fluorescent dyes by synchronous fluorescence". *Analyst*, 125 (2000) 2049.
148. S.A. Dolenko, I.V. Gerdova, T.A. Dolenko y V.V. Fadeev. "Laser fluorimetry of mixtures of polyatomic organic compounds using artificial neural networks". *Quantum Electron.*, 21 (2001) 834.

inducida por láser. Estos mismos autores en 2002, utilizaron las redes neuronales para el diagnóstico de la contaminación de aguas costeras usando espectros fluorescentes¹⁴⁹.

Las redes neuronales artificiales también se han utilizado con métodos separativos. Así, en 1997, Smith *y col.*¹⁵⁰ usaron las redes neuronales artificiales en el análisis de contaminantes ambientales mediante desorción térmica, cromatografía de gases y espectrometría de masas. Entre los años 1999 y 2001 se usaron las redes neuronales en cromatografía líquida para la predicción de tiempos de retención en cromatografía iónica (Havel *y col.*¹⁵¹ y Madden *y col.*¹⁵²) y para establecer relaciones entre la estructura y la retención mediante una red neuronal del tipo Perceptrón multicapa¹⁵³.

Además de con métodos cromatográficos, también se han usado con métodos electroforéticos¹⁵⁴. Principalmente, las redes neuronales se han usado para la optimización de los parámetros instrumentales y condiciones experimentales en la separación cromatográfica^{155,156}, para la resolución de electroferogramas¹⁵⁷⁻¹⁶⁰ y para el establecimiento

-
149. T.A. Dolenko, V.V. Fadeev, I.V. Gerdova, S.A. Dolenko y R. Reuter. "Fluorescence diagnostics of oil pollution in coastal marine waters by use of artificial neural networks". *Appl Opt.*, 41 (2002) 5155.
 150. G.C. Smith, G. Alnasser y J.J. Bromenshenk. "Artificial neural networks and thermal desorption gas chromatography-mass spectrometry (TD/GC/MS) in assessing environmental contaminants". *Abstr. Pap. Amer. Chem. Soc.*, 213 (1997) 390.
 151. J. Havel, J.E. Madden y P.R. Haddad. "Prediction of retention times for anions in ion chromatography using artificial neural networks". *Chromatographia* 49 (1999) 481.
 152. J.E. Madden, N. Avdalovic, P.R. Haddad y J. Havel. "Prediction of retention times for anions in linear gradient elution ion chromatography with hydroxide eluents using artificial neural networks". *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 173.
 153. Y.L. Loukas. "Artificial neural networks in liquid chromatography: efficient and improved quantitative structure-retention relationship models". *J. Chromatogr. A*, 904 (2000) 119.
 154. A.R. Timerbaev y O.A. Shpigun. "Recent progress in capillary electrophoresis". *Electrophoresis*, 21 (2000) 4179.
 155. L. Pokorna, A. Revilia, J. Havel y J. Patocka. "Capillary zone electrophoresis determination of galanthamine in biological fluids and pharmaceutical preparatives: experimental design and artificial neural network optimisation". *Electrophoresis*, 20 (1999) 1993.
 156. Q.F. Li, Y.Y. Zhou, H.W. Wang, H.Y. Zhang, S.H. Liu, X.G. Chen y Z.D. Hu. "Application of artificial neural networks in multifactor optimisation of selectivity in capillary electrophoresis". *Anal. Lett.*, 33 (2000) 2333.
 157. R.M. Latorre, S. Hernández Cassou y J. Saurina. "Artificial neural networks for quantification in unresolved capillary electrophoresis peaks". *J. Sep. Sci.*, 24 (2001) 427.
 158. G. Bocaz Beneventi, R. Latorre, M. Farkova y J. Havel. "Artificial neural networks for quantification in unresolved capillary electrophoresis peaks". *Anal. Chim. Acta*, 452 (2002) 47.
 159. V. Dohnal, H. Li, M. Farkova y J. Havel. "Quantitative analysis of chiral compounds from unresolved peaks in capillary electrophoresis using multivariate calibration with experimental design and artificial neural networks". *Chirality*, 14 (2002) 509.
 160. H.T. Liu, K.T. Wang, H.P. Xu, X.G. Chen y Z.D. Hu. "Application of experimental design and artificial neural networks to separation and determination of active components in traditional Chinese medicinal preparations by capillary electrophoresis". *Chromatographia*, 55 (2002) 579.

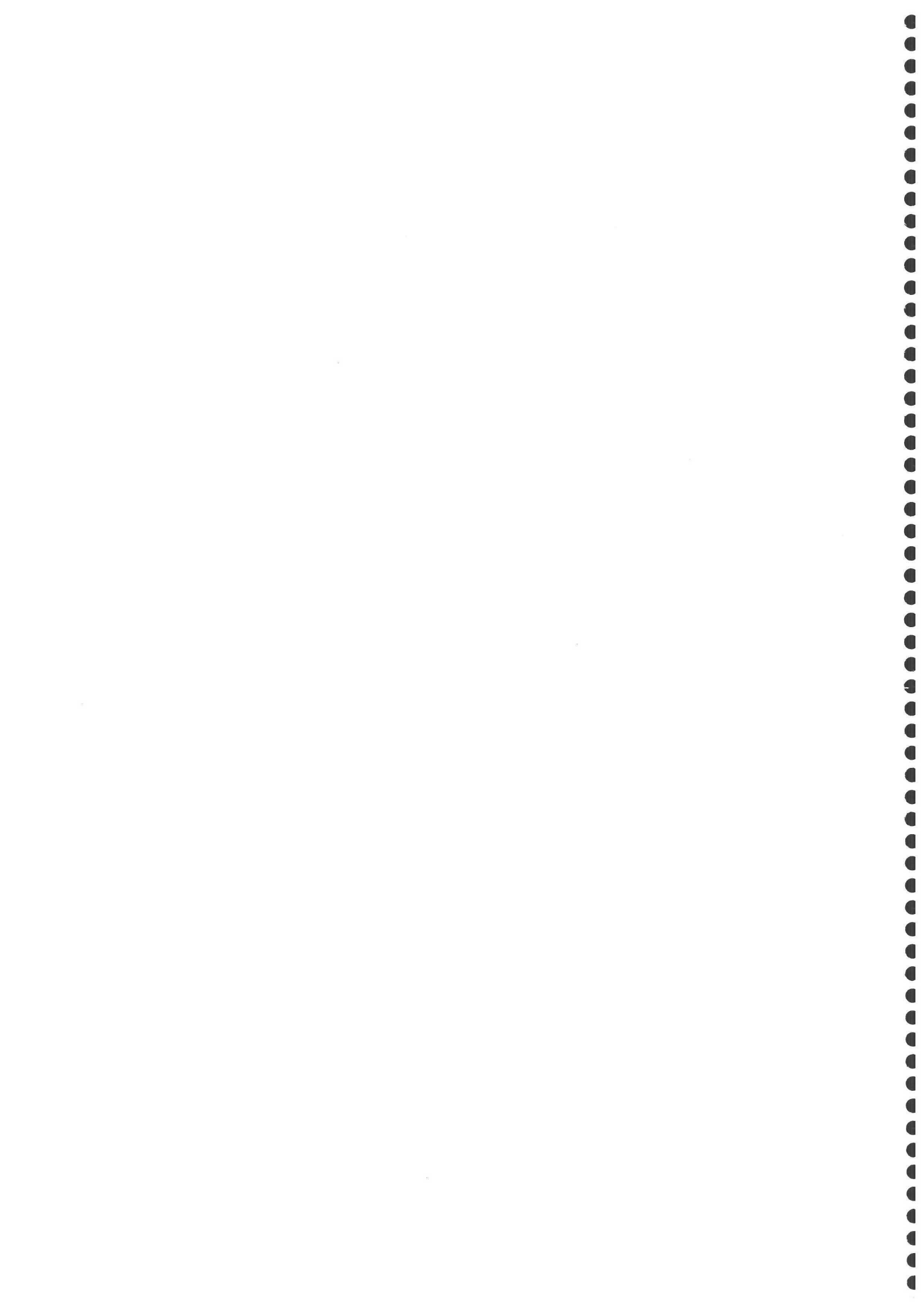
de curvas de calibrado no lineales¹⁶¹. Todos estos trabajos demuestran que las ANNs junto con los diseños experimentales reducen el número de experimentos necesarios para encontrar las condiciones óptimas de separación, que son útiles para la resolución de electroferogramas con picos solapados y la determinación de sustancias que no proporcionan una respuesta lineal de la altura o área de pico con la concentración.

Las redes neuronales artificiales también se han usado para solucionar problemas de resolución y principalmente de determinación simultánea de varios compuestos en el campo de los sensores luminiscentes y biosensores¹⁶².

Así, en 1977, Chan *y col.*¹⁶³ desarrollaron dos fases sensoras ópticas para la determinación de potasio y sodio usando una red neuronal con aprendizaje de retropropagación. En 1999, Legin *y col.*¹⁶⁴ desarrollaron un sensor multiparamétrico para la determinación de Fe(II), Fe(III), U(IV) y U(VI) usando redes neuronales para la resolución espectral de las mezclas.

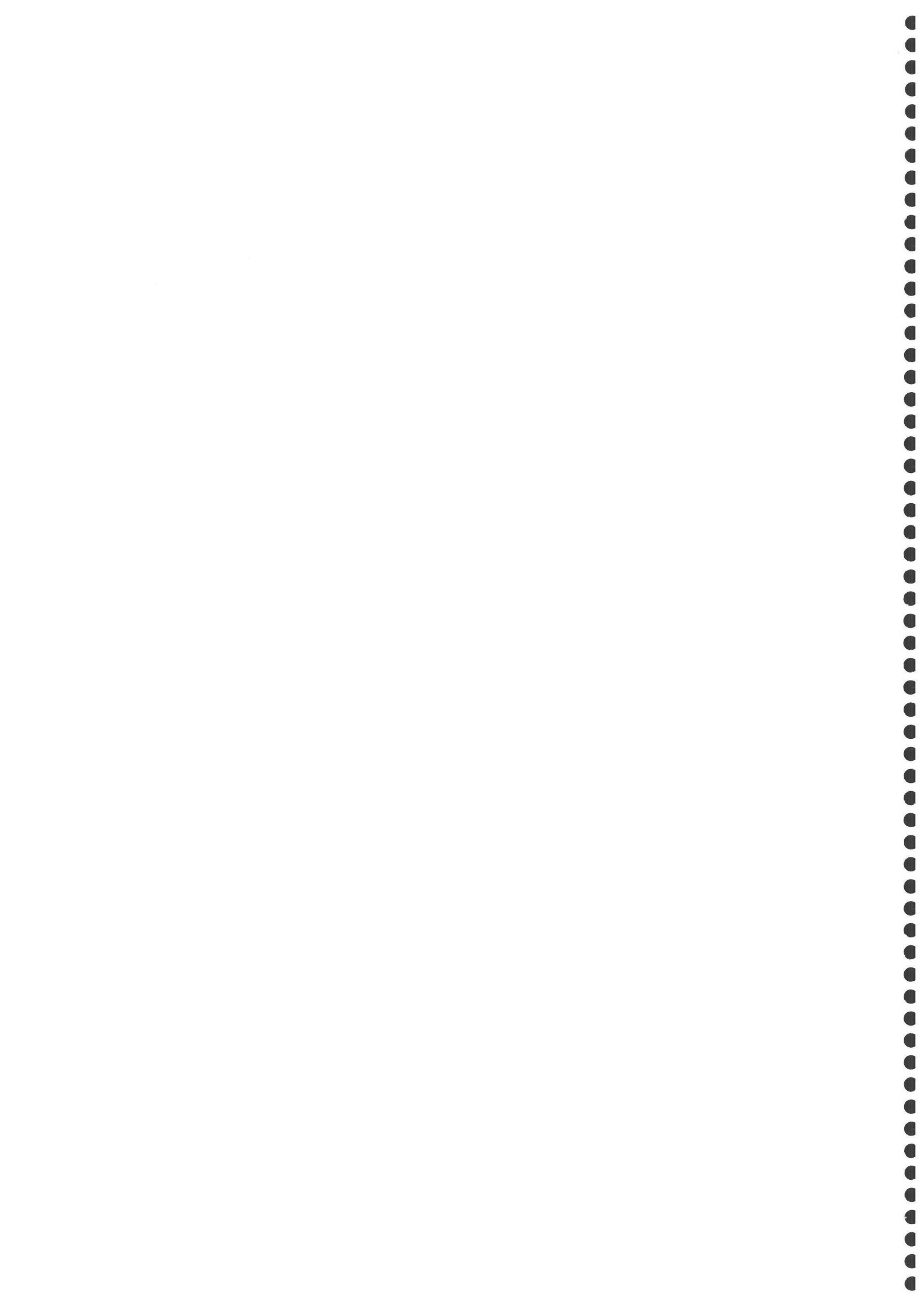
En el año 2000, Li *y col.*¹⁶⁵ desarrollaron un sensor de fibra óptica para la determinación simultánea de vitaminas B usando la fluorescencia sincrónica y las redes neuronales artificiales. En 2002, Raimundo y Narayanaswamy¹⁶⁶ propusieron un sensor de fibra óptica y redes neuronales artificiales para el control de la humedad y amonio en aire.

-
161. H. Li, Y.X. Zhang, P. Polaskova y J. Havel. "Enhancement of precision in the analysis of medicines by capillary electrophoresis using artificial neural networks". *Acta Chim. Sin.*, 60 (2002) 1264.
 162. D. Ivnitiski, I. Abdel Hamid, P. Atanasov y E. Wilkins. "Biosensor for detection of pathogenic bacteria". *Biosens Bioelectron.*, 14 (1999) 599.
 163. W.H. Chan, A.W.M. Lee, D.W.J. Kwong, Y.Z. Liang y K.M. Wang. "Simultaneous determination of potassium and sodium by optode spectra and an artificial neural network algorithm". *Analyst*, 22 (1997) 657.
 164. A.V. Legin, B.L. Seleznev, A.M. Rudnitskaya, Y.G. Vlasov, S.V. Tverdokhlebov, B. Mack, A. Abraham, T. Arnold, L. Baraniak y H. Nitsche. "Multisensor systems for determination of iron(II), iron(III), uranium(VI) and uranium(IV) in complex solution". *Czech. J. Phys.*, 49 (1999) 679.
 165. W. Li, J. Chen, B.R. Xiang y D.K. An. "Simultaneous on-line dissolution monitoring of multicomponent solid preparations containing vitamins B1, B2". *Anal. Chim. Acta*, 408 (2000) 39.
 166. I.M. Raimundo y R. Narayanaswamy. "Simultaneous determination of relative humidity and ammonia in air employing an optical fibre sensor and artificial neural network". *Sensor Actuator B-Chem.*, 74 (2001) 60.





**REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN
Y METODOLOGÍA**



REACTIVOS, INSTRUMENTACIÓN Y METODOLOGÍA

1 Reactivos y disoluciones	123
1.1 Reactivos	123
1.1.1 Analitos	123
1.1.2 Soportes sólidos	124
1.1.3 Disolventes orgánicos	124
1.1.4 Interferentes	125
1.2 Disoluciones	125
1.2.1 Analitos	125
1.2.2 Disoluciones reguladoras.....	125
1.2.3 Disoluciones regeneradoras	126
1.2.4 Disoluciones de interferentes.....	126
2 Instrumentación.....	127
2.1 Medidas de fluorescencia.....	127
2.2 Control de temperatura.....	129
2.3 Pesada.....	129
2.4 Material para análisis por inyección en flujo.....	129
2.5 Material adicional.....	129
3 Metodología	131
3.1 Selección de la fase sensora.....	132
3.2 Características espectroscópicas	133
3.2.1 Características espectroscópicas en disolución.....	133
3.2.2 Características espectroscópicas en fase sólida.....	133

3.3	Diseño del sistema de flujo	134
3.4	Selección de la disolución regenerante	136
3.5	Selección de parámetros instrumentales de medida	137
3.5.1	Optimización de la sensibilidad del detector	137
3.5.2	Optimización de las rendijas	138
3.5.3	Resolución del instrumento.....	138
3.6	Optimización de variables experimentales.....	139
3.6.1	pH, tipo y concentración de disolución reguladora.....	139
3.6.2	Tipo y porcentaje de disolvente orgánico	139
3.7	Optimización de variables de flujo.....	140
3.7.1	Velocidad de flujo.....	140
3.7.2	Volumen de muestra inyectado	141
3.8	Establecimiento del método analítico.....	141
3.8.1	Procedimiento operatorio.....	141
3.8.2	Recta de calibrado.....	141
3.8.3	Parámetros de fiabilidad	141
3.8.4	Método de adición de patrón.....	147
3.9	Aplicaciones.....	148
3.9.1	Determinación de principios activos	149
3.9.2	Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos	150

1 Reactivos y disoluciones

1.1 Reactivos

Los reactivos empleados en la parte experimental de la presente Memoria se pueden agrupar en: analitos, soportes sólidos, disolventes orgánicos e interferentes.

1.1.1 Analitos

Los analitos empleados se muestran en la Tabla R-1 junto con la abreviatura empleada en el texto, datos correspondientes a su casa comercial suministradora, pureza y referencia (ref.).

Tabla R-1. Analitos

Analito	Siglas	Casa suministradora, pureza y referencia
Nafronil	NFL	Sigma, 99.0%, ref.: N-1391
Naproxeno	NAP	Sigma, ref.: M-4015
Propranolol	-	Sigma, ref.: P-0884
Naftaleno	NAPH	Supelco, ref.: LA-83011
Acenaftileno	ACEN	Supelco, ref.: LA-88342
Acenafteno	ACE	Supelco, ref.: LA-92694
Fluoreno	FLU	Supelco, ref.: LA-74473
Fenantreno	PHE	Supelco, ref.: LA-92542
Antraceno	ANT	Supelco, ref.: LA-86593
Fluoranteno	FLT	Supelco, ref.: LA-88185
Pireno	PYR	Supelco, ref.: LA-74472
Criseno	CHRY	Supelco, ref.: LA-38984
Benzo[a]antraceno	BaA	Supelco, ref.: LA-91542
Benzo[k]fluoranteno	BkF	Supelco, ref.: LA-84149
Benzo[b]fluoranteno	BbF	Supelco, ref.: LA-94245
Benzo[a]pireno	BaP	Supelco, ref.: LA-88347
Indeno [1,2,3-c,d]pireno	IcdP	Supelco, ref.: LA-63804
Benzo[g,h,i]perileno	BghiP	Supelco, ref.: LA-94961
Dibenzo[a,h]antraceno	DBahA	Supelco, ref.: LA-94494

Todos los HAPs se adquirieron conjuntamente en una colección (KIT 610-N) de Supelco con referencia 4-7351.

1.1.2 Soportes sólidos

Las resinas usadas como soportes sólidos se muestran en la Tabla R-2 junto con los datos correspondientes a su carácter iónico o no iónico, casa comercial suministradora y referencia.

Tabla R-2. Resinas

Tipo de resina	Carácter iónico	Casa comercial y referencia
Gel de Sílica "Davisil"	No iónico	Supelco, ref.: 236845
Gel de Sílica "Merck"	No iónico	Supelco, ref.: 242179
Amberlita XAD 2	No iónico	Supelco, ref.: 20275
Amberlita XAD 4	No iónico	Supelco, ref.: 20276
Amberlita XAD 7	No iónico	Supelco, ref.: 13361-U
Dowex 1x2	Aniónico	Fluka, ref.: 44295
Dowex 1x4	Aniónico	Supelco, ref.: 1X4200
Dowex 1x8	Aniónico	Fluka, ref.: 44335
Dowex 50wx2	Catiónico	Fluka, ref.: 44460
Dowex 50wx4	Catiónico	Fluka, ref.: 44480
Dowex 50wx8	Catiónico	Fluka, ref.: 44515

1.1.3 Disolventes orgánicos

Los disolventes orgánicos empleados se muestran en la Tabla R-3 junto con los datos correspondientes a su pureza, casa comercial suministradora y referencia.

Tabla R-3. Disolventes orgánicos

Disolvente	Pureza, casa comercial y referencia
Etanol	99.8%, Merck, ref.: 1.00983
Metanol	99.8%, Scharlau, ref.: Me0302
Acetona	99.5%, Merck, ref.: 1.00014
Acetonitrilo	99.5%, Panreac, ref.: 131881
1,4-Dioxano	>99.9%, Sigma, ref.: D-9553
N,N-Dimetilformamida	99.5%, Merck, ref.: 3053

1.1.4 Interferentes

Los compuestos químicos usados en el estudio de interferentes se muestran en la Tabla R-4 junto con los datos correspondientes a la casa comercial suministradora, pureza y referencia.

Tabla R-4. Interferentes

Reactivo	Pureza, casa suministradora y referencia
Albúmina humana	96-99%, Sigma, ref.: A-1653
NaNO ₃	Panreac, ref: 131702
KNO ₃	Panreac, ref: 131524
Ca(NO ₃) ₂	Panreac, ref: 131231
Mg(NO ₃) ₂	Panreac, ref: 131402
Na ₂ SO ₄	Panreac, ref: 131715
NaCl	Panreac, ref: 121659
NaHCO ₃	Panreac, ref: 121638

1.2 Disoluciones

1.2.1 Analitos

Se prepararon disoluciones madre de nafronil, naproxeno y propranolol de 25 µg/mL, disolviendo 2.5 mg de cada uno en agua bidestilada hasta un volumen final de 100 mL. Para los HAPs y debido a su baja solubilidad en agua, se prepararon disoluciones madre de 50 µg/mL de cada uno en etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, 1,4-dioxano y N,N-dimetilformamida disolviendo 2.5 mg de analito en 50 mL de cada uno de los disolventes orgánicos.

1.2.2 Disoluciones reguladoras

En la Tabla R-5 se presentan las diferentes disoluciones reguladoras utilizadas junto con la sal, cantidad de la misma y reactivo usado para ajustar el pH.

Tabla R-5. Disoluciones reguladoras

Disolución reguladora	Sal	Cantidad (g)	Ajuste pH
HAc/AcNa 0.1 M de pH 5.0	CH ₃ COONa	0.820	NaOH
Citrato/HCl 0.1 M de pH 5.0	C ₆ H ₅ Na ₃ O ₇ · 2 H ₂ O	0.751	HCl
Ftalato/HCl 0.1 M de pH 5.0	C ₈ H ₅ KO ₄	2.042	HCl
Glicina/HCl 0.1 M de pH 2.5	C ₂ H ₅ NO ₂	0.751	HCl
Ftalato/HCl 0.1 M de pH 2.5	C ₈ H ₅ KO ₄	2.042	HCl
Ftalato/HCl 0.1 M de pH 6.0	C ₈ H ₅ KO ₄	2.042	HCl
H ₂ PO ₄ ⁻ / HPO ₄ ²⁻ 0.1 M de pH 6.0	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.380	NaOH
H ₂ PO ₄ ⁻ / HPO ₄ ²⁻ 0.1 M de pH 7.0	NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	1.380	NaOH

1.2.3 Disoluciones regeneradoras

Se han probado distintas disoluciones que permitieran que el optosensor propuesto fuese un sistema reutilizable. Las disoluciones ensayadas fueron:

- Ácidos: HCl 6 M, HNO₃ 6 M y H₂SO₄ 6 M
- Bases: NaOH 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4 y 8 M
- Disolventes orgánicos puros (etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, 1,4-dioxano y dimetilformamida) y disoluciones en agua bidestilada en diferentes proporciones (v/v).

1.2.4 Disoluciones de interferentes

Para llevar a cabo el estudio de la influencia de la presencia de altos contenidos proteicos en orina, se adicionó albúmina sólida a la orina para simular concentraciones de 80, 160 y 800 mg/L. La Tabla R-6 muestra las cantidades pesadas de albúmina para preparar 50 mL de orina a las concentraciones anteriormente citadas.

Para llevar a cabo el estudio de interferentes iónicos, se prepararon 100 mL de disoluciones de 1 g/L de cada una de las especies iónicas (excepto para la especie HCO₃⁻ que se preparó una disolución de 10 g/L). La Tabla R-7 muestra las especies ensayadas, el compuesto químico de partida y la cantidad pesada.

Tabla R-6. Disoluciones de interferentes proteicos (albúmina)

Concentración (mg/L)	Cantidad de albúmina pesada (mg)
80	4
160	8
800	40

Tabla R-7. Disoluciones de interferentes iónicos

Especie iónica	Sal	Cantidad pesada (g)
Na ⁺	NaNO ₃	0.370
K ⁺	KNO ₃	0.259
Ca ²⁺	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	0.590
Mg ²⁺	Mg(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	0.964
SO ₄ ²⁻	Na ₂ SO ₄ ·10H ₂ O	0.335
Cl ⁻	NaCl	0.165
HCO ₃ ⁻	NaHCO ₃	1.380
NO ₃ ⁻	NaNO ₃	0.137

2 Instrumentación

2.1 Medidas de fluorescencia

Las medidas de intensidad relativa de fluorescencia (I.R.F.), la respuesta del optosensor y el registro de los espectros se han llevado a cabo en un espectrómetro de luminiscencia Aminco-Bowman Series 2 equipado con una lámpara de Xenón continua de 150 W. Este espectrofluorímetro está conectado a través de una interfase GPIB (IEEE-488) con un ordenador tipo PC compatible con microprocesador 386 (33 MHz) bajo sistema operativo OS/2 versión 2.0. El ordenador lleva instalado un programa de gestión de datos AB2 (Aminco-Bowman) versión 1.40.

Para la consecución del capítulo III de la presente Memoria, donde se desarrollan dos optosensores fluorescentes de fibra óptica para la determinación de principios activos farmacológicos, se utilizó un luminómetro modular que consta de:

- Una lámpara continua de Xe de 150 W (Shimadzu, ref.: 206-11695) equipada con una fuente de alimentación de alto voltaje (Shimadzu ref.: 200-84042-01), un reflector (Shimadzu ref.: 205-84334) y un espejo elipsoidal recubierto de SiO₂ para la condensación de la luz.
- Filtros de corte de la casa comercial Oriel.
- Fibras ópticas (Eurofibroptic PG Series) de apertura numérica 0.50, ángulo de aceptación de 60°, diámetro interno de 1.5 mm y longitud 100 cm.
- Tubo fotomultiplicador Shimadzu R212-09.

Para la consecución del apartado 2 del capítulo VII de la presente Memoria, donde se desarrolla un optosensor fluorescente de fibra óptica, se utilizó un espectrógrafo modular que consta de:

- Una lámpara continua de Xe de 150 W (Shimadzu, ref.: 206-11695) equipada con una fuente de alimentación de alto voltaje (Shimadzu ref.: 200-84042-01), un reflector (Shimadzu ref.: 205-84334) y un espejo elipsoidal recubierto de SiO₂ para la condensación de la luz.
- Un monocromador de excitación (Shimadzu ref.: 209-55517-01) equipado con una red de difracción cóncava de 1300 líneas/mm y rendijas de tamaño variable (de 1.5 a 20 nm).
- Un filtro de interferencia (Oriel, modelo 53425) con una transmisión máxima a 390 nm y una anchura de banda de 10 nm.
- Fibras ópticas (Eurofibroptic PG Series) de apertura numérica 0.50, ángulo de aceptación de 60°, diámetro interno de 1.5 mm y longitud 120 cm.
- Espectrógrafo Acton Research Corporation modelo Spectrapro-300i.
- Adaptador de fibra óptica Acton Research Corporation modelo FC-446-020.
- Detector de acoplamiento de carga de 1024 x 256 pixels (de tamaño 19 x 19 μm y corriente oscura 0.2 e⁻/píxel/h a -110°C) equipado con un

intensificador (OMA4, EG&G PAR modelo 1530 C/CUV 1024S) y refrigerado con nitrógeno líquido.

2.2 Control de temperatura

El control de la temperatura y su mantenimiento en la realización de las medidas de fluorescencia se efectuó con un Ultratermostato Selecta modelo Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10.0 y 99.9 °C con una precisión de ± 0.1 °C, provisto de sistema circulatorio.

2.3 Pesada

Las pesadas se llevaron a cabo mediante la utilización de un granatario y una balanza de precisión.

- Granatario Cobos modelo serie CB (sensibilidad 1 mg).
- Balanza Mettler modelo AE240 (sensibilidad 0.01 mg).

2.4 Material para análisis por inyección en flujo

- Bomba peristáltica Gilson Miniplus 3 de cuatro canales.
- Válvulas de inyección de 6 vías Supelco Rheodyne modelo 5020.
- Célula de flujo de cuarzo Hellma modelo 176.052-QS con un paso de luz de 1.5 mm y una altura del centro de la ventana de 15 mm.
- Jeringas esterilizadas de 10 mL Plastipak.
- Tubos de Teflón (politetrafluoroetileno) de 0.8 mm de diámetro interno.
- Conexiones Omnifit de teflón.
- Material de flujo (tubos, conectores, válvulas, etc.) de material inerte.

2.5 Material adicional

- Baño de ultrasonidos Selecta modelo Ultrasons de 40 Khz de frecuencia.
- Centrifugadora Heraeus modelo Labofuge 200.
- Micropipetas Transferpette Brand Typ Digital de 10-50 μL , 50-250 μL y 200-1000 μL .

- Mortero de ágata.
- Tamices con paso de luz 0.160 mm, 0.120 mm y 0.080 mm (Filtro).
- Material de vidrio como pipetas, graduadas y aforadas de diversos volúmenes comprendidos entre 1 y 50 mL, tubos de ensayo, tubos de tapón de rosca, matraces aforados y vasos diversos.

Los recursos informáticos utilizados en la presente Memoria han sido:

- Alamin 1.0¹. Programa quimiométrico utilizado para determinar los parámetros de fiabilidad del método propuesto y analizar la veracidad de la metodología de la adición de estándar.
- Microsoft Excel 2000. Hoja de cálculo usada para llevar a cabo los cálculos de la respuesta del optosensor y media aritmética, desviación estándar y error de las réplicas llevadas a cabo.
- Surfer 5.02. Programa de diseño gráfico para el tratamiento de tridimensionales y curvas de nivel.
- AB2 (Aminco-Bowman) versión 1.40. Programa de gestión de datos para la adquisición y manipulación de los datos experimentales obtenidos por el espectroluminómetro Aminco-Bowman Series 2.
- Simulador SNNS (Stuttgart Neural Network Simulator)².
- Programas diseñados por el Grupo de Investigación “*Sistemas inteligentes*” del Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial de la Universidad de Granada³.

-
1. A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, F. Alés Barrero y M. Román Ceba. “Alamin- A chemiometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology”. Trends Anal. Chem., 16 (1997) 381.
 2. Stuttgart Neural Network Simulator. Universidad de Stuttgart, Universidad de Tübingen, Alemania (1989-2002). <http://www-ra.informatik.uni-tuebingen.de/SNNS/>.
 3. J.M. Benítez, J.D. Castro e I. Requena. “Are artificial neural networks black boxes?”. IEEE Trans. \ on Neural Networks, 8 (1997) 1156.

3 Metodología

Para llevar a cabo la optimización de los parámetros y variables estudiadas se han realizado tres medidas para cada valor de parámetro o variable experimental con respecto al tiempo, obteniéndose el fiagrama (registro de la intensidad relativa de fluorescencia con el tiempo) (véase Figura R-1) y calculando su intervalo de error mediante la ecuación:

$$\text{Intervalo de error} = \pm \frac{s \cdot t}{\sqrt{n}}$$

donde s es la desviación estándar de las medidas, n es el número de réplicas realizadas (normalmente tres) y t es la t de student para $n-1$ grados de libertad y un nivel de confianza del 95% (que para el caso de tres réplicas tiene el valor de 4.303).

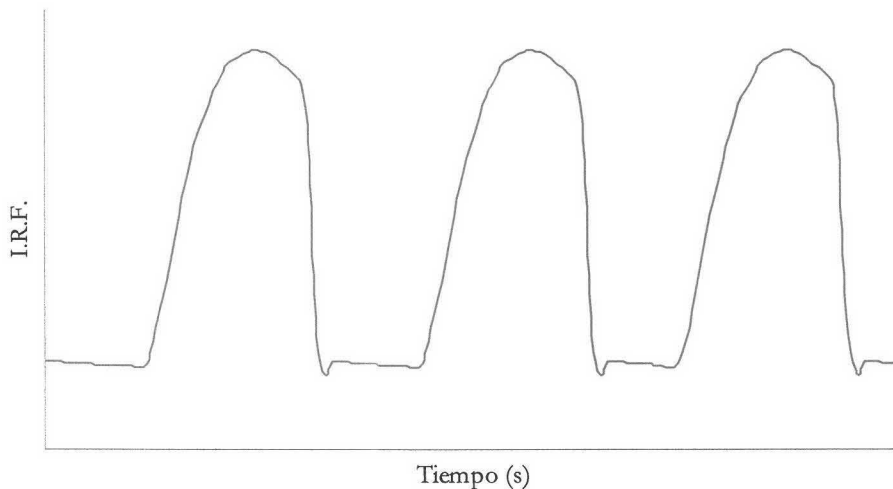


Figura R-1. Ejemplo de fiagrama.

Así, se establece la intensidad relativa de fluorescencia (I.R.F.) como la cantidad de luz, en unidades arbitrarias, que llega al detector del luminómetro. Por otro lado, se ha establecido la **respuesta del optosensor** como la diferencia entre la I.R.F. obtenida cuando el analito está soportado sobre la fase sensora (señal) y la I.R.F. obtenida por la dispersión de la luz de la resina (ruido) (véase Figura R-2).

Por último, el **tiempo de respuesta del optosensor** es el tiempo que transcurre desde que se inyecta el analito hasta que se obtiene la mayor señal (véase la Figura R-3).

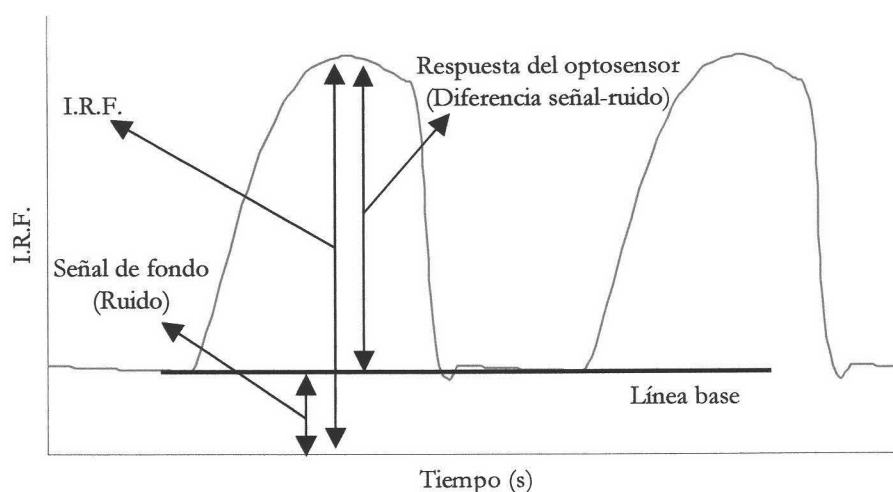


Figura R-2. Definición de línea base, I.R.F., señal de fondo o ruido y respuesta del optosensor o diferencia señal-ruido.

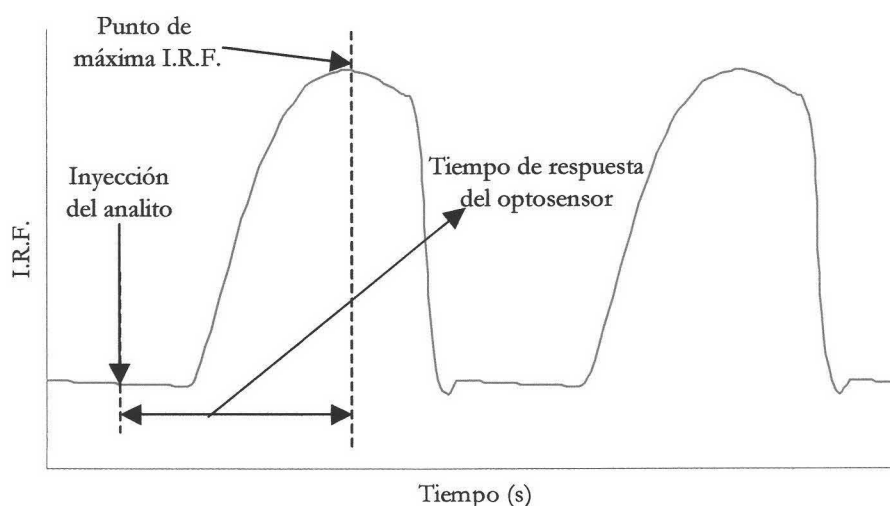


Figura R-3. Definición del tiempo de respuesta del optosensor.

3.1 Selección de la fase sensora

Para el desarrollo de un optosensor se ha de elegir una fase sensora que permita una fijación selectiva en su estructura química del analito en estudio y que ésta tenga propiedades fluorescentes adecuadas.

Para ello, se han evaluado 11 tipos de resinas diferentes: no iónicas (Gel de Sílica Davisil, Gel de Sílica Merck, Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7),

aniónicas (Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8) y catiónicas (Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8).

Además del tipo de resina, el tamaño de la misma también influye en la interacción que se produce entre el analito y la fase sensora y por tanto, en las características analíticas del optosensor. Por ello, se trituraron las resinas en un mortero de ágata y se tamizaron obteniendo cuatro tamaños diferentes de partícula: < 80 μm , entre 80 y 120 μm , entre 120 y 160 μm y >160 μm).

Para la selección de la fase sensora, las diferentes resinas (a un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm) se empaquetaron en la célula de flujo y se evaluó la respuesta del optosensor obtenida por cada una de ellas así como el error de las medidas. Una vez seleccionada ésta, se procedió al estudio del efecto del tamaño de partícula evaluando la respuesta del optosensor y el error producido para cada tamaño ensayado de la resina seleccionada.

3.2 Características espectroscópicas

3.2.1 Características espectroscópicas en disolución

Se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente en disolución acuosa de cada uno de los analitos estudiados, para obtener sus características espectroscópicas en disolución. Éstas se utilizaron como punto de partida en cada optimización de los parámetros y variables que afectan a las características analíticas del optosensor.

3.2.2 Características espectroscópicas en fase sólida

Para ello, una suspensión de la resina seleccionada en una disolución de concentración conocida del analito se empaquetó en una cubeta de flujo convencional y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas del analito soportado en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada se empaquetó en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda del analito, obteniendo las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión del analito en estudio.

Para determinar cuales son las longitudes de onda de onda más apropiadas para la medida de fluorescencia se procedió a la eliminación de la contribución de la fase sensora,

mediante una substracción de los espectros obtenidos cuando el analito estaba fijado y cuando no lo estaba (véase Figura R-4).

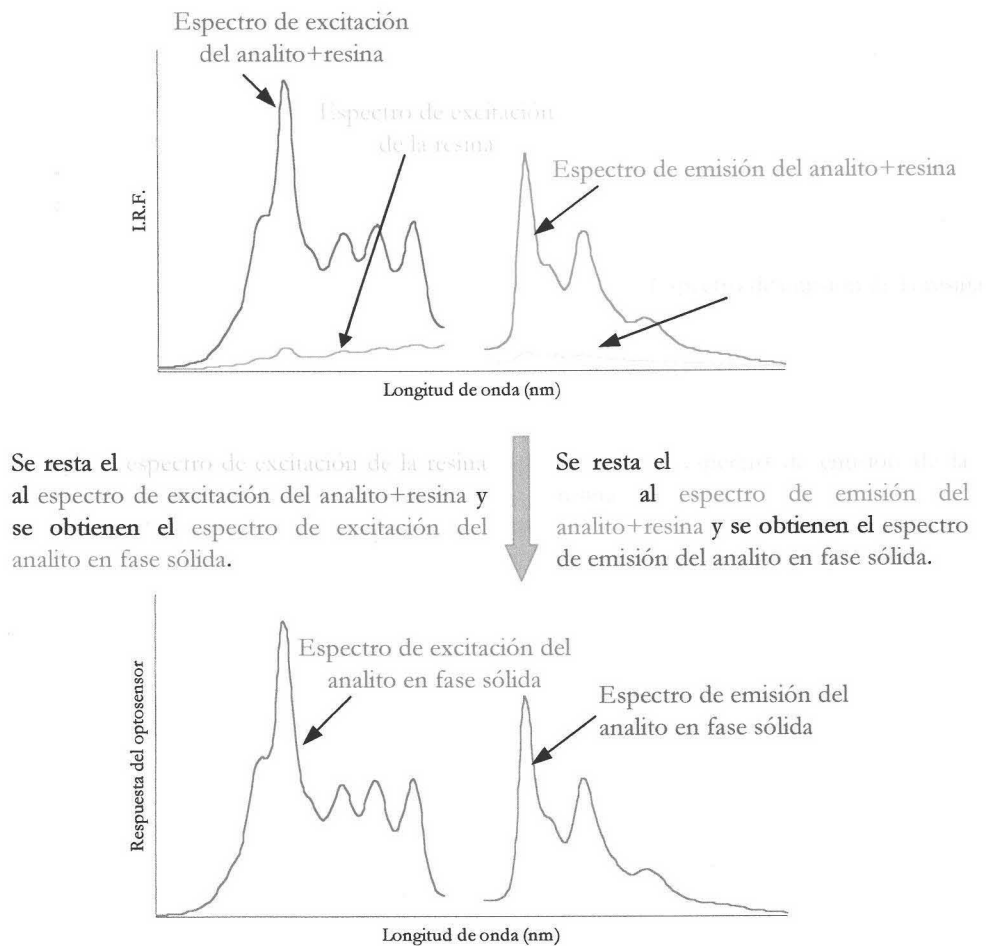


Figura R-4. Esquema general de la obtención de las características espectroscópicas en fase sólida.

3.3 Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor convencional es necesario acoplar la fase ópticamente activa con un sistema de análisis en flujo. Todo sistema FIA consta de, al menos, cuatro partes (véase la Figura R-5): una unidad de propulsión, un sistema de inyección, una zona de reacción y un sistema de detección.

El sistema FIA utilizado en la presente Memoria presenta una serie de particularidades y está formado por una bomba peristáltica que impulsa a una disolución portadora, una válvula de inyección de muestra, una válvula de regeneración y un sistema de detección, que para optosensores convencionales es una cubeta de flujo situada en el compartimento de muestra del espectroluminómetro (ver Figura R-6).

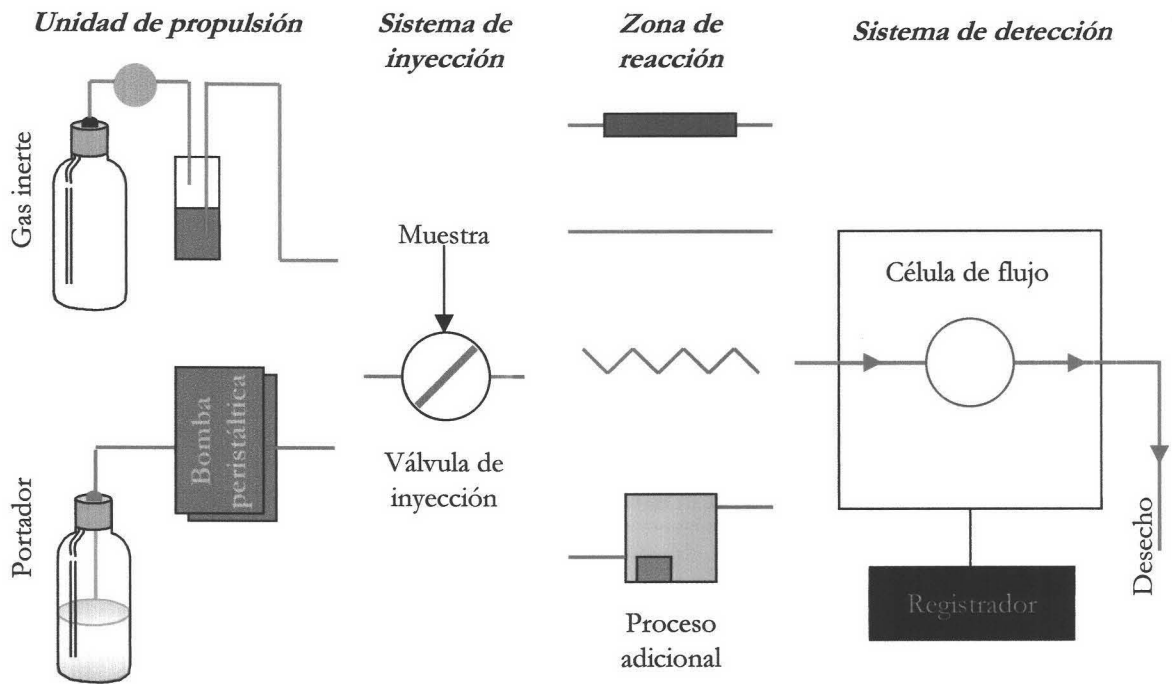


Figura R-5. Esquema general de un sistema FIA.

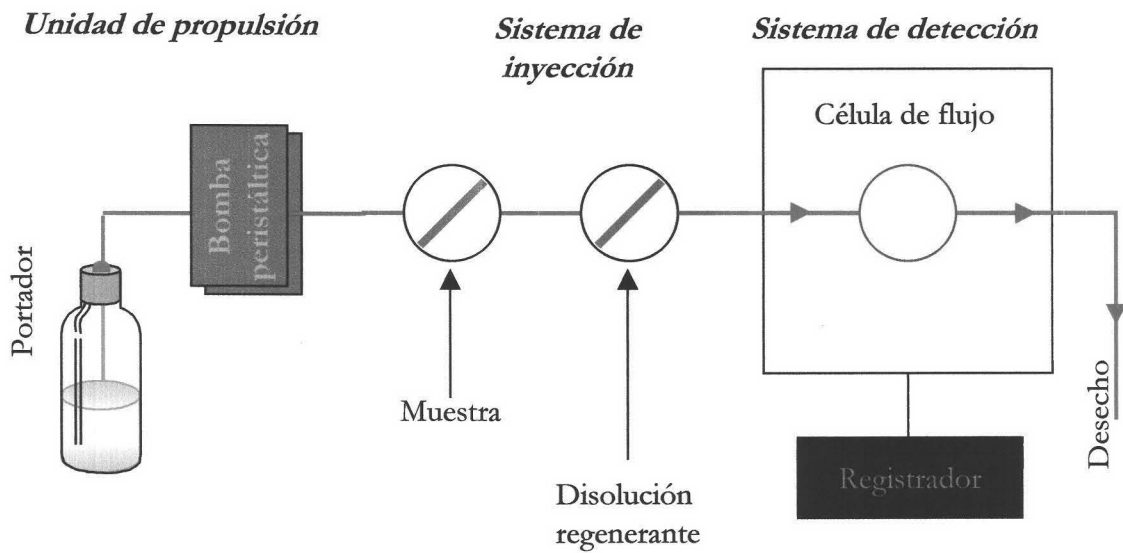


Figura R-6. Esquema del sistema FIA empleado.

En la cubeta, la resina se retiene mecánicamente por una malla de tela y se hace coincidir la fase sensora con el haz de excitación y el monocromador de emisión del instrumento (véase la Figura R-7).

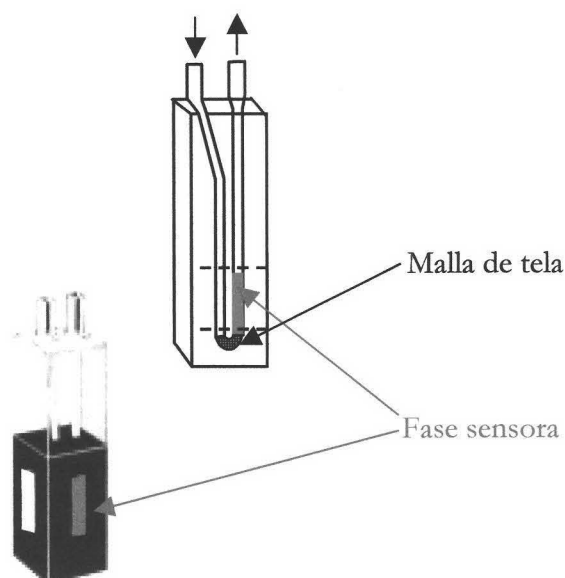


Figura R-7. Esquema de la cubeta de flujo empleada.

3.4 Selección de la disolución regenerante

Cuando la interacción entre el analito y la fase sensora es irreversible en un tiempo adecuado para su uso analítico, es necesario la utilización de un sistema de regeneración que transforme al optosensor en reutilizable.

Para proceder con la selección de la disolución regenerante, se empaquetó la resina y se inyectó el analito en estudio. Cuando todo el analito estaba retenido en la fase sensora, se procedió a la inyección de las diferentes disoluciones regeneradoras, seleccionando aquella que de forma rápida, sucesiva y repetitiva reproducía con más exactitud la línea base y por tanto la respuesta del optosensor (véase Figura R-8).

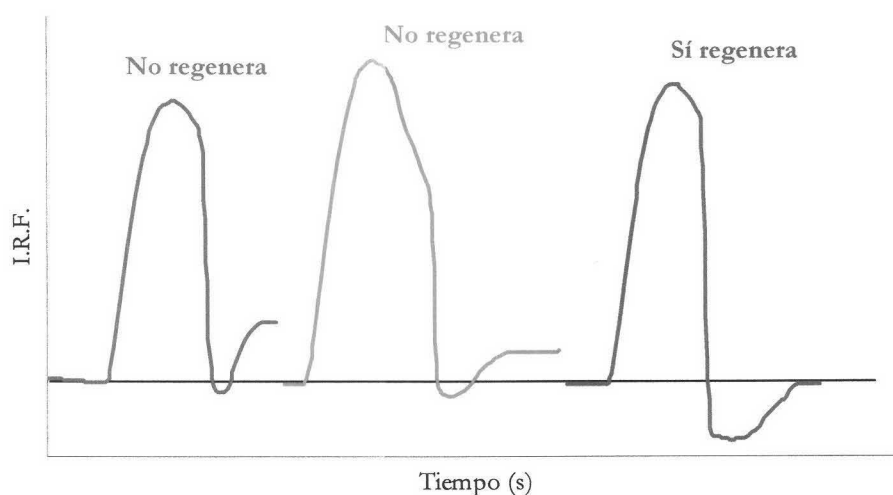


Figura R-8. Selección de la disolución regenerante.

3.5 Selección de parámetros instrumentales de medida

3.5.1 Optimización de la sensibilidad del detector

La sensibilidad se refiere a la capacidad del instrumento para medir una señal distinguiéndola del ruido de fondo. Se ajusta mediante el cambio del voltaje aplicado al fotomultiplicador. La sensibilidad del detector es una medida del grado de ampliación de las señales luminiscentes. Su valor puede oscilar entre 250 a 1275 V, si bien lo normal cuando se trabaja con la lámpara continua del espectrofluorímetro es de 500 a 750 V. Este parámetro afecta tanto al valor de la señal analítica como a su repetibilidad.

Para su optimización se realizaron sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba el voltaje aplicado al fotomultiplicador, seleccionando como óptimo aquel voltaje que producía la mayor respuesta del optosensor con un error adecuado al método pretendido. La curva típica que se obtiene en todos los casos es del tipo de la que se presenta en la Figura R-9.

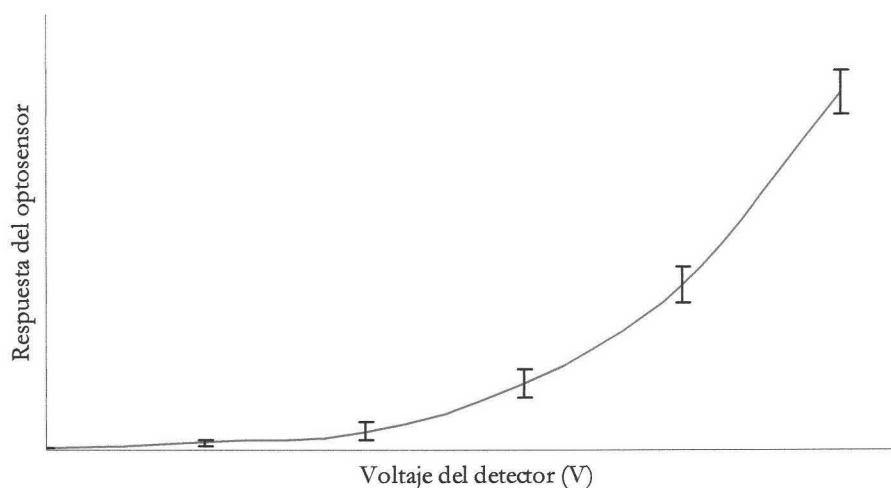


Figura R-9. Curva típica de dependencia de la respuesta del optosensor con el voltaje del fotomultiplicador.

3.5.2 Optimización de las rendijas

Las medidas de fluorescencia se pueden realizar, de forma general, a distintos anchos de rendija. El espectroluminómetro permite variar el ancho de rendija de 0.5 a 16 nm, tanto para la excitación como para la emisión. Este parámetro está íntimamente relacionado con la sensibilidad del optosensor y dependerá del voltaje aplicado al detector, ya que a mayor voltaje seleccionado las rendijas tendrán que ser menores y viceversa.

Para su optimización se realizaron sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba la anchura de las rendijas de excitación y emisión simultáneamente en todos los posibles valores de anchura, seleccionado como aperturas de rendija óptimas aquellas que producían la mayor diferencia señal-ruido.

3.5.3 Resolución del instrumento

La resolución es el tiempo que transcurre entre dos puntos consecutivos adquiridos por el instrumento. Este parámetro incide directamente en el error del optosensor, ya que afecta directamente a la definición de los fiagramas registrados, y no tanto a la respuesta del optosensor. Además, la resolución influye sobre la dimensión de los ficheros informáticos generador por el instrumento en la digitalización de los fiagramas.

Para su optimización, se realizaron sucesivas inyecciones de una muestra en el sistema de flujo mientras se variaba la resolución del instrumento, seleccionado como óptima el mayor valor de resolución que definía eficientemente los fiagramas. De esta forma los fiagramas contenían toda la información posible y los archivos informáticos eran más fáciles de manejar.

3.6 Optimización de variables experimentales

En este apartado se va a indicar cómo se lleva a cabo, a lo largo de la presente Memoria, la selección del pH de trabajo, el tipo y concentración de disolución reguladora usada y tipo y porcentaje de disolvente orgánico, tanto para la disolución portadora como para la muestra.

3.6.1 *pH, tipo y concentración de disolución reguladora*

El pH afecta a la disociación de los grupos ionizables de los diferentes compuestos en función de su pK_a y también a la capacidad de retención de estos analitos en la resina. Por tanto, es necesario establecer el pH óptimo de medida fluorescente de los analitos en las fases sensoras y seleccionar el tipo y concentración de la disolución reguladora más adecuada a ese pH.

Para establecer el pH de trabajo se prepararon una serie de portadores y muestras a diferentes pHs (fijados con HCl y/o NaOH) y se seleccionó el pH con el que se obtenía una mayor respuesta del optosensor. Una vez establecido, se prepararon diferentes portadores y muestras en las que se adicionó la cantidad adecuada de las disoluciones reguladoras, al pH elegido, a una concentración final de 5 mM, seleccionando aquella que producía la mayor diferencia señal-ruido. Por último, se ensayaron diferentes concentraciones de la disolución reguladora al pH de trabajo óptimo, tanto en las muestras como en el portador, eligiendo como óptima aquella concentración en la que se obtenía una buena señal del optosensor con un error adecuado.

3.6.2 *Tipo y porcentaje de disolvente orgánico*

El disolvente orgánico se utiliza en el desarrollo de optosensores de analitos altamente insolubles en agua. La presencia del disolvente orgánico ayuda a la solubilización

de los analitos en mezclas hidro-orgánicas e impide que éstos queden retenidos en los tubos de teflón del sistema FIA.

Para su selección, se adicionaron porcentajes crecientes de disolventes orgánicos miscibles con agua a las muestras, manteniendo la ausencia de disolvente orgánico en el portador, y se seleccionó aquel que producía una respuesta del optosensor adecuada al menor porcentaje posible. Una vez seleccionado el tipo y porcentaje de disolvente orgánico en las muestras se procedió a la selección del porcentaje de disolvente orgánico óptimo en el portador. Para ello, manteniendo la muestras en sus condiciones experimentales óptimas, se varió el porcentaje de ese disolvente orgánico en el portador, seleccionando el porcentaje adecuado para obtener la mayor diferencia señal-ruido.

Hay que tener en cuenta, que tanto las válvulas de inyección como las tuberías de teflón y conectores soportan la presencia de disolvente orgánico, sin embargo, las tuberías de las bombas peristálticas se deterioran rápidamente con su presencia, por lo que, en todos los casos en la que la presencia de disolvente orgánico en el portador no mejore sustancialmente la respuesta del mismo se optará por no adicionarlo en la disolución portadora.

3.7 Optimización de variables de flujo

Las variables FIA que afectan principalmente al tiempo de respuesta y a la sensibilidad del optosensor son la velocidad de flujo y el volumen de muestra inyectado.

3.7.1 Velocidad de flujo

La bomba peristáltica usada permite establecer diferentes flujos en función de la velocidad de rotación de la bomba y del calibre de los tubos utilizados. Para ello, previamente se eligió un tubo de calibre adecuado y se estableció la relación entre velocidad de la bomba y flujo en mL/min.

Para seleccionar el flujo adecuado se procedió a registrar la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta mientras se variaba la velocidad de flujo, seleccionándose como óptima aquella en la que se obtenía la mayor diferencia señal-ruido y el menor tiempo de respuesta posible.

3.7.2 Volumen de muestra inyectado

En la válvula de inyección de muestra se pueden acoplar bucles de diferentes volúmenes entre 0.5 y 4.0 mL (experimentalmente se ha demostrado que volúmenes superiores a 4 mL dificultan mucho la introducción de muestra debido a la gran presión originada en la válvula).

Para su optimización, se procedió a registrar la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta mientras se variaba el volumen del bucle de la válvula de inyección de muestra, seleccionándose como solución de compromiso aquel en el que se obtenía la mayor diferencia señal-ruido y el menor tiempo de respuesta posible.

3.8 Establecimiento del método analítico

3.8.1 Procedimiento operatorio

Optimizados todos los parámetros instrumentales y variables experimentales se procede al establecimiento del procedimiento operatorio a seguir en el desarrollo del método propuesto, indicando de una forma precisa las condiciones a las cuales se han de llevar a cabo las medidas.

3.8.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado del método establecido, variando la concentración del analito dentro del intervalo lineal y registrando la respuesta del optosensor a las condiciones expuestas en su procedimiento operatorio. Se midieron tres réplicas para cada nivel de concentración.

3.8.3 Parámetros de fiabilidad

El tratamiento estadístico de los datos se llevó por dos procedimientos distintos. En primer lugar, se aplicó el tratamiento propuesto por la IUPAC⁴ y en segundo lugar, y de

4. IUPAC. "Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis-II. Data interpretation", 33B (1978) 242.

forma comparativa, se realizó el propuesto por Cuadros Rodríguez y col.⁵ basado en la experiencia del calibrado.

Ambos procedimientos proponen estimar los parámetros de calidad del método a partir de una serie de réplicas de distintos patrones; para ello es necesario obtener la recta de calibrado, se recomiendan 3 réplicas para 5 valores de concentración. La ecuación de la recta sería:

$$R = a + b \cdot c \quad \text{(Ecuación 1)}$$

donde R indica la señal del instrumento, c la concentración, a la ordenada en el origen y b la pendiente; el cálculo de la ecuación de la recta de calibrado se hace aplicando el modelo estadístico de la regresión lineal, que permite, no sólo encontrar dicha ecuación con el menor error a partir de las medidas experimentales, sino que también suministra una medida de la imprecisión de este cálculo.

Con los datos obtenidos, se calculan los valores de la pendiente y de la ordenada en el origen, a partir de las ecuaciones correspondientes. Hay que destacar que deben tomarse todas las parejas de valores de forma individual y no calcular la media de las señales para cada patrón de concentración.

a) Tratamiento propuesto por la IUPAC

El tratamiento estadístico se ha llevado a cabo mediante los cálculos descritos por la IUPAC que indican que es posible establecer unos límites alrededor del valor medio estimado, dentro de los cuales se puede esperar hallar la media de la población con cierto grado de probabilidad. Estos límites se denominan límites de confianza o probabilidad de que sea cierto que la media de la población está comprendida entre ellos. El intervalo definido por los límites alrededor de la media estimada se denomina intervalo de confianza. Se usará, durante todos los cálculos, un nivel de confianza del 95%.

El intervalo dentro del cual se puede afirmar que se encuentra la media de la probabilidad o nivel de confianza, se puede escribir:

$$\bar{c} \pm \frac{t \cdot s}{\sqrt{n}} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

5. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campana, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics analysis of an analytical method using the data set of the calibration experiment", Anal. Lett., 26 (1993) 1243.

donde \bar{c} es la concentración media obtenida a partir de las muestras analizadas, t es el valor estadístico de la t de Student y s es la desviación estándar de estos valores.

Además de estos intervalos, se obtiene el valor del error relativo medio (E_r), que evalúa conjuntamente la precisión y exactitud, y el valor de la desviación estándar relativa (DER), que evalúa la precisión de la determinación, y cuyas expresiones son:

$$E_r = \frac{100 \cdot t \cdot s}{\bar{c} \cdot \sqrt{n}} \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$D.E.R. = \frac{100 \cdot s}{\bar{c} \cdot \sqrt{n}}$$

donde s es la desviación estándar obtenida en los ensayos de repetibilidad, expresados en unidades de “señal analítica”.

Según la IUPAC, el límite de detección ($L.D.$) se define como la mínima cantidad de analito, expresada en unidades de concentración, distinguible de la correspondiente señal del blanco con un cierto nivel de confianza, y viene expresado por:

$$L.D. = \frac{k \cdot s_{señal}}{b} \quad \text{(Ecuación 4)}$$

donde b es la pendiente de la curva de calibrado y k es un valor numérico elegido según el nivel de confianza que se desee. Se ha utilizado un valor de $k=3$ correspondiente a un nivel de confianza del 99.86%.

El límite de cuantificación ($L.C.$) se establece como el límite inferior de concentraciones por debajo del cual las medidas no ofrecen un determinado nivel de confianza. Viene dado por la expresión:

$$L.C. = \frac{k \cdot s_{señal}}{b} \quad \text{(Ecuación 5)}$$

utilizándose un valor de $k=10$.

El término precisión se refiere a la repetibilidad o reproducibilidad de un conjunto de medidas repetidas, o el grado de dispersión de las medidas individuales, en torno a su media. El parámetro más útil para establecer la precisión del método de análisis es la desviación estándar. Por otra parte, el término exactitud se refiere a la diferencia o error

entre la media del conjunto de resultados y un valor que se acepta como verdadero o correcto.

El intervalo dinámico lineal se define como el intervalo de concentraciones en el que la curva de la señal analítica es lineal, o la zona donde la pendiente de dicha curva de calibración permanece constante.

b) Tratamiento según el método de regresión lineal

Además del método propuesto por la IUPAC se ha llevado a cabo la estimación de los parámetros de calidad de los métodos analíticos instrumentales propuestos, a partir de los datos de la experiencia del calibrado.

Este procedimiento propone estimar los parámetros de calidad del método a partir de una serie de réplicas de distintos patrones; para ello, es necesario obtener la recta de calibrado (ver ecuación 1).

Asimismo, se calcula la desviación estándar de regresión de R sobre c, $s_{R,c}$, mediante la siguiente ecuación:

$$s_{R,c}^2 = \frac{1}{n-2} \left[(RR) - \frac{(Rc)^2}{(cc)} \right] \quad \text{(Ecuación 6)}$$

donde:

$$\begin{aligned} (RR) &= \sum (R_i - \bar{R})^2 \\ (Rc) &= \sum (c_i - \bar{c}) \cdot (R_i - \bar{R}) \\ (cc) &= \sum (c_i - \bar{c})^2 \end{aligned}$$

R_i es cada valor de señal analítica del conjunto de medidas utilizadas para cada uno de los calibrados tomada de forma individual, \bar{R} la señal analítica media, c_i cada concentración del conjunto de patrones utilizados en el calibrado, \bar{c} la concentración media del conjunto de patrones utilizados en el calibrado y n el número total de parejas de puntos utilizados para calcular la recta de regresión.

A partir de la desviación estándar de regresión $s_{R,c}$ se calculan las desviaciones estándar de la pendiente, s_b , y de la ordenada en el origen, s_a , a través de las ecuaciones:

$$s_a = s_{R,c} \sqrt{\frac{\sum c_i^2}{n \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad \text{(Ecuación 7)}$$

$$s_b = s_{R,c} \sqrt{\frac{1}{n \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad \text{(Ecuación 8)}$$

La determinación de las concentraciones de analito de una disolución problema se puede obtener aplicando la ecuación de la recta de regresión. Sin embargo, la estimación de la imprecisión asociada a dicha determinación es más compleja, ya que depende tanto del error en la medida de la señal, como de los errores que implica el uso de la pendiente y de la ordenada en el origen.

La expresión general que calcula la desviación estándar de la concentración sobre los valores obtenidos en una serie de análisis repetitivos⁶ es:

$$s_c = \frac{s_{R,c}}{b} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(R_i - \bar{R})^2}{b^2 \sum (c_i - \bar{c})^2}} \quad \text{(Ecuación 9)}$$

donde b es la pendiente de la recta de regresión, m es el número de repeticiones del análisis.

El valor de s_c dependerá del número de puntos de calibración y del número de determinaciones realizadas, pudiéndose minimizar la desviación estándar de la concentración haciendo que m sea igual a n .

Operando de esta forma se pueden establecer los distintos parámetros de calidad del método basándose en los distintos valores obtenidos:

- **Linealidad:** En este método se propone a la desviación estándar de la pendiente, $D.E.R.(b)$ como media matemática de la linealidad, que se calcula por el cociente del valor de s_b entre b . De esta forma la linealidad vendrá determinada por la diferencia $1-D.E.R.(b)$ (expresada en forma de porcentaje).
- **Sensibilidad:** En este método se propone una expresión del análisis de regresión, cuyo valor es característico del calibrado del método instrumental e

6. A. Martín Andrés y J.D. Luna del Castillo. "Bioestadística para las ciencias de la salud", ED. Norma, Madrid (1990).

independiente del instrumento y de las transformaciones matemáticas llevadas a cabo para la lectura de la señal, siendo así éste un buen criterio de comparación:

$$\text{sensibilidad} = \frac{s_{R,c}}{b} \quad \text{(Ecuación 10)}$$

- **Precisión:** Matemáticamente, la precisión se puede expresar por la desviación estándar relativa (o coeficiente de variación). Ésta se calcula dividiendo la desviación estándar, s_c , entre el valor medio de concentración determinada, c , (generalmente se expresa en forma de porcentaje). De esta forma la desviación estándar relativa de la concentración, $D.E.R.(c)$, quedaría como se indica a continuación:

$$D.E.R.(c) = \frac{s_c}{c} \cdot 100 \quad \text{(Ecuación 11)}$$

Este cálculo sólo se puede realizar para las concentraciones utilizadas en la recta de calibrado. Sin embargo, el modelo utilizado permite representar los datos obtenidos para cada valor de concentración y, por interpolación, estimar la precisión para cualquier valor del intervalo de concentraciones del calibrado.

- **Límites de detección y cuantificación:** Según el tratamiento propuesto por la IUPAC se está calculando la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco y no se toma la imprecisión del valor de la pendiente. En este método se propone la utilización de s_0 , utilizando los valores de la señal del “blanco” medidos para establecer la recta de calibrado. De esta forma, el límite de detección se calcularía, utilizando la aproximación de la IUPAC, como indica la ecuación:

$$L.D. = 3 \cdot s_{c_0} \quad \text{(Ecuación 12)}$$

El límite de cuantificación⁷ vendría dado únicamente sustituyendo en la misma ecuación el valor 3 por el de 10.

$$L.C. = 10 \cdot s_{c_0} \quad \text{(Ecuación 13)}$$

7. Analytical Methods Committee, (1987).

3.8.4 Método de adición de patrón

El establecimiento de la veracidad de un método analítico conlleva la comprobación de que los resultados obtenidos por su aplicación no son significativamente diferentes del verdadero valor convencional. Para ello, y en ausencia de materiales y métodos de referencia, se recurre al uso de la metodología de adición de patrón.

El uso de esta metodología requiere la ausencia de errores sistemáticos que no puedan ser corregidos, bien atribuibles al sistema de medida o cometidos en el proceso de calibrado, o bien debidos a una interferencia directa a partir de la matriz de la muestra (definida por Cardone como cualquier sustancia de la matriz de la muestra, que es mayor o menor que la debida sólo al analito, produciendo así un error sistemático de magnitud no aceptable).

Si la técnica de adición de patrón se utiliza para comprobar la validez de un procedimiento analítico, es necesario asegurar que no existe el efecto interactivo matriz-analito, es decir, que no existe un error sistemático proporcional que provocaría una modificación de la pendiente del calibrado con adición. Para comprobarlo hay que comparar la pendiente de la recta obtenida en el calibrado con adición de patrón con la pendiente de la recta de calibrado. El paralelismo de tales rectas implica la ausencia de tal efecto interactivo.

Para ensayar la igualdad de pendientes, se usa un test de la t de Student. El estadístico, con $(n_S + n_A - 4)$ grados de libertad, a utilizar se calcula por la siguiente expresión:

$$t_{cal}(b) = \frac{|b_S - b_A|}{s_p \sqrt{\frac{1}{\sum (c_{i,S} - \bar{c}_S)^2} + \frac{1}{\sum (c_{i,A} - \bar{c}_A)^2}}} \quad \text{(Ecuación 14)}$$

donde b_S es la pendiente de la recta del calibrado, b_A es la pendiente de la recta de adición de patrón, s_p es la desviación estándar promedio entre el calibrado y la recta de adición de patrón, $c_{i,S}$ son los valores de cada concentración usados en el calibrado con patrones tomados de forma individual, $c_{i,A}$ son los valores de cada concentración usados en la adición de patrón tomados de forma individual, \bar{c}_S es la concentración media del conjunto

de patrones utilizados en la recta de calibrado y \bar{c}_A es la concentración media del conjunto de patrones añadidos en la recta de adición de patrón.

La desviación estándar promedio (s_p) se calcularía:

$$s_p = \sqrt{\frac{(n_S - 2) \cdot s_S^2 + (n_A - 2) \cdot s_A^2}{n_S + n_A - 4}} \quad \text{(Ecuación 15)}$$

donde n_S es el número de datos utilizados para establecer el calibrado con patrones, n_A es el número de datos utilizados para establecer la recta de adición de patrón, s_S es la desviación estándar de regresión de la recta de calibrado y s_A la desviación estándar de regresión de la recta de adición de patrón.

Para el cálculo de las desviaciones estándar de regresión, tanto de la recta de calibrado como de la de adición de patrón, se utiliza la ecuación 6:

$$s_{R,c}^2 = \frac{1}{n - 2} \left[(RR) - \frac{(Rc)^2}{(cc)} \right] \quad \text{(Ecuación 6)}$$

Las pendientes no difieren significativamente para un nivel de significación del 99%, si el valor de la $t(b)$ calculada es menor que la $t(b)$ tabulada.

3.9 Aplicaciones

Optimizadas todas y cada una de las variables experimentales e instrumentales y establecidas las rectas de calibrado y sus parámetros de fiabilidad, así como los niveles de interferentes que toleran los optosensores propuestos se procedió a la aplicación del método propuesto a muestras reales.

Las aplicaciones llevadas a cabo en la presente Memoria se pueden dividir en dos, las determinaciones de principios activos y de hidrocarburos aromáticos policíclicos, respectivamente.

3.9.1 *Determinación de principios activos*

El extensivo uso de medicamentos en la vida actual y la importancia de la industria farmacéutica hace necesario el desarrollo de nuevos métodos sensibles y selectivos, precisos, simples, rápidos y de bajo costo que puedan usarse en el análisis de rutina, tanto para el control de procesos industriales como en el control de la concentración de éstos en fluidos biológicos. Por esto, son cada vez más los métodos en flujo continuo que aparecen en la bibliografía para la determinación de fármacos.

Sin embargo, estos métodos en flujo no siempre se pueden utilizar de forma selectiva, pues son muchos los interferentes que están presentes en los fármacos y más en los fluidos biológicos. Los sensores ópticos y, más concretamente, los optosensores son una buena herramienta para el análisis de rutina de estos principios activos, pues además de incorporar las ventajas de rapidez, sencillez y bajo costo de los sistemas en flujo continuo incorporan las ventajas de sensibilidad, reproducibilidad y bajos límites de detección de la utilización de superficies activas.

En esta Memoria, la determinación de principios activos farmacológicos utilizando optosensores convencionales se ha llevado a cabo en dos matrices diferentes:

- a) ***Determinación de principios activos en productos farmacéuticos.*** Para ello, se pesaron cinco cápsulas o comprimidos (dependiendo de la presentación de cada fármaco) obteniéndose el peso medio de cada unidad. Posteriormente, se tomó la cantidad adecuada para preparar una disolución acuosa del fármaco de concentración 25 µg/mL en el principio activo, tomándose alícuotas de esta disolución y añadiendo los reactivos necesarios (disolución reguladora) para obtener las condiciones experimentales óptimas de medida. Una vez preparada la muestra de medida, se inyectó en el sistema de flujo del optosensor realizando siete réplicas en todos los casos para evaluar su contenido y el error cometido en la determinación.
- b) ***Determinación de principios activos en orina.*** Para ello, un voluntario ingirió el medicamento que contenía el principio activo que se quería determinar y posteriormente se recolectó la orina, bien de 24 horas, cuando se requería la determinación de la cantidad de principio activo excretado vía urinaria al cabo de

24 horas, o bien, 24 horas después de la ingesta, si lo que se pretendía era evaluar la capacidad del optosensor para detectar la ingesta de un agente dopante. Una vez recolectada la muestra de orina, se tomó una cantidad adecuada de ésta para que la concentración del principio activo se encontrase dentro del intervalo dinámico lineal del método propuesto; se le adicionó la disolución reguladora para obtener las condiciones experimentales óptimas y se inyectó en el optosensor. Para obtener la cantidad de principio activo que había en una muestra se realizaron siete réplicas y en el caso de determinar la presencia o no del principio activo (“test de screening”) se comparó la respuesta obtenida con la que se obtenía con otras muestras que estaban libres del principio activo.

3.9.2 Determinación de hidrocarburos aromáticos policíclicos

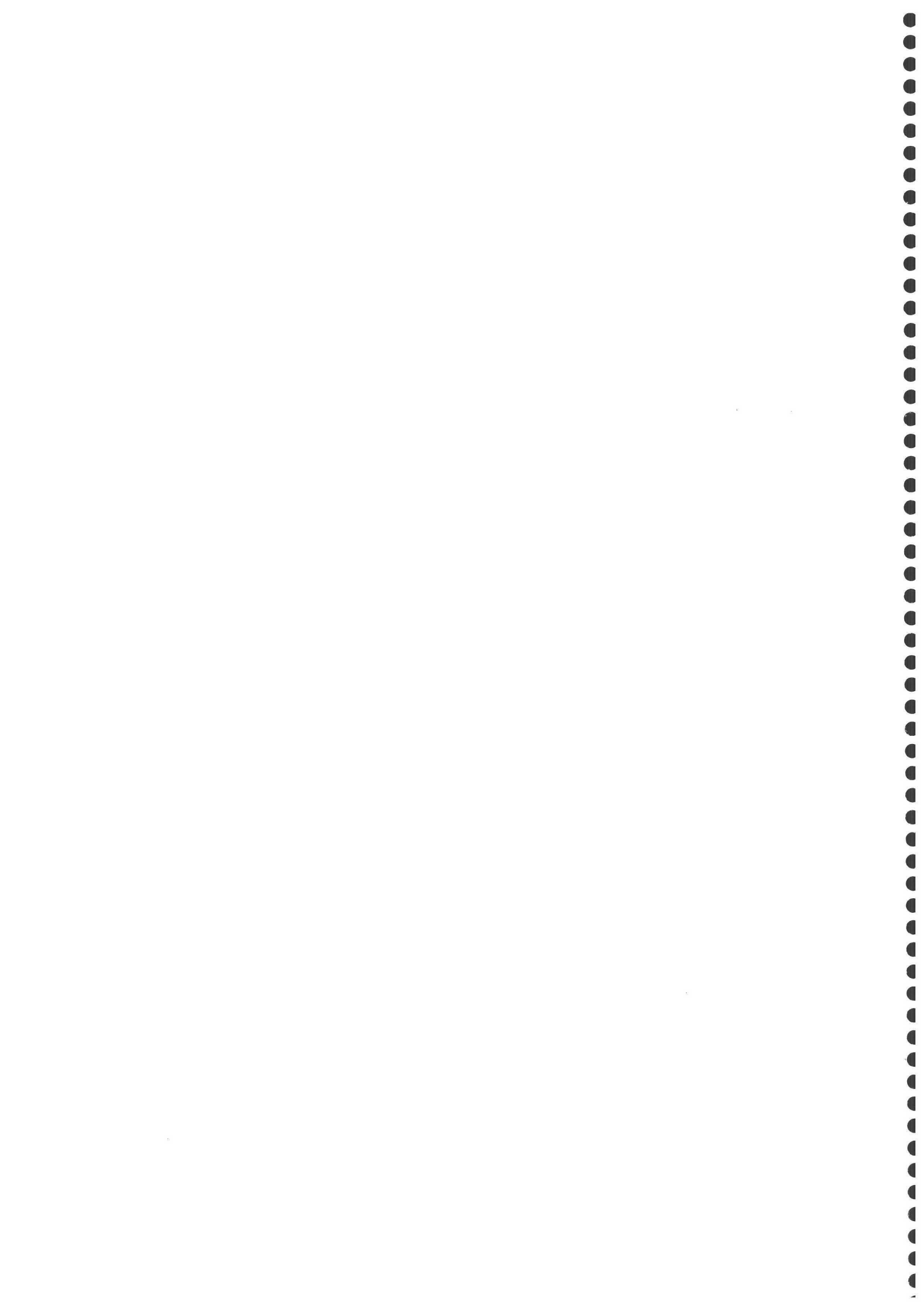
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son compuestos altamente cancerígenos presentes en muchas formas en el medio ambiente y la vida urbana. Debido a que se generan por la combustión incompleta de los carburantes fósiles, aparecen en el aire y rápidamente son adsorbidos por las partículas en suspensión, que bien se depositan en el suelo, permanecen en el aire o son arrastrados por la lluvia contaminando las aguas superficiales y subterráneas.


Es de gran importancia destacar la presencia de estos compuestos cancerígenos en aguas de consumo humano y son la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea las instituciones que han decretado las cantidades máximas de HAPs que debe tener un agua para que sea apta para el consumo humano.

En esta Memoria, la determinación de HAPs se ha llevado a cabo en aguas de la red de abastecimiento de diferentes localidades granadinas y en aguas de manantial embotelladas (aguas minerales).

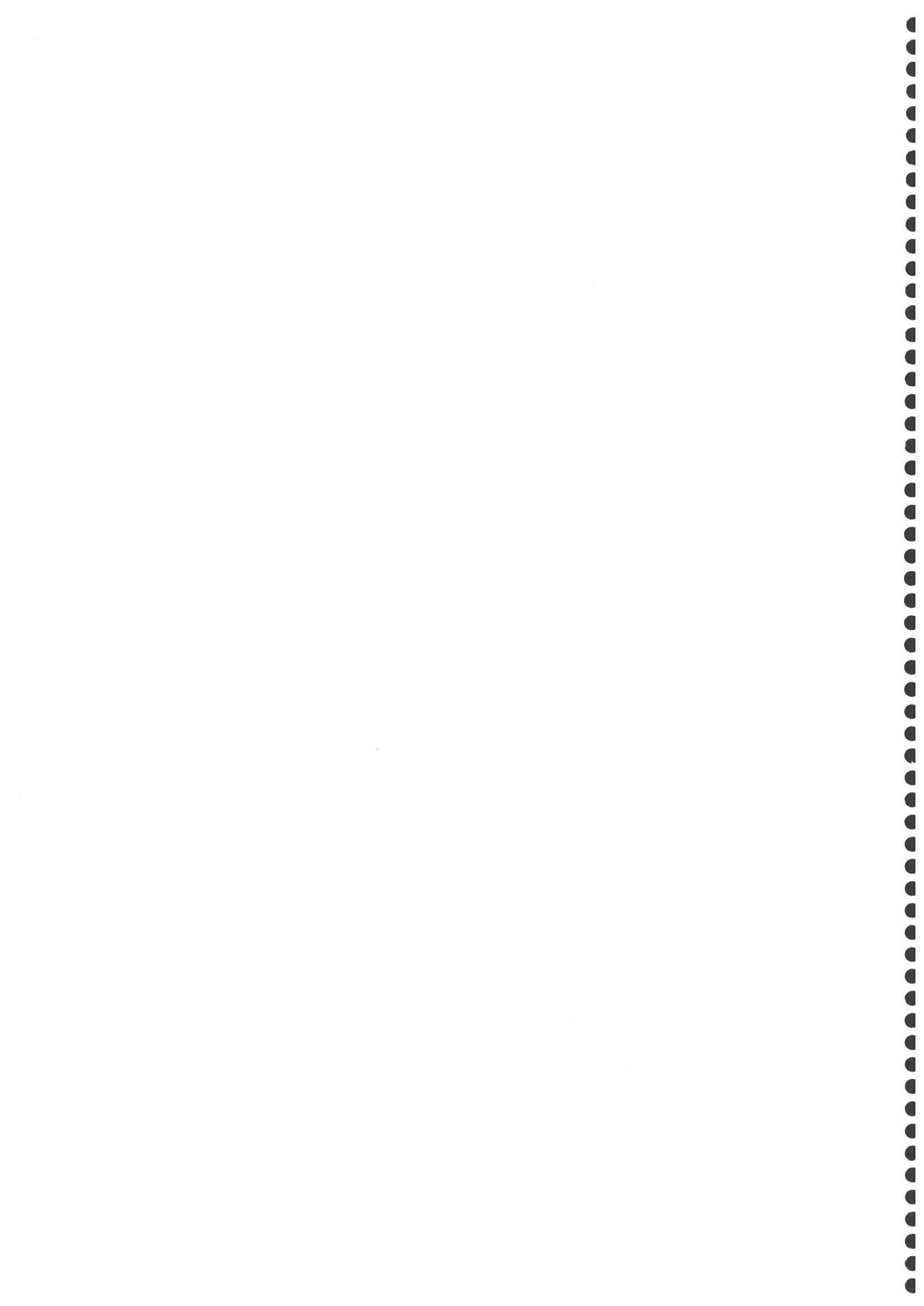
Las muestras de agua de abastecimiento se recolectaron en material inerte de vidrio tras dejar fluir durante 15 minutos el agua para así evitar que su composición estuviese alterada por el estancamiento en las tuberías. Las muestras de agua mineral no se sometieron a ningún tratamiento previo sino que se analizaron directamente tal como eran suministradas por la empresa embotelladora.

Para llevar a cabo la aplicación, y una vez comprobado que no se encontraban presentes los HAPs en estudio, las muestras de agua fueron fortificadas y a una porción de ésta se le adicionaron los reactivos necesarios (disolución reguladora y disolvente orgánico) para obtener las condiciones experimentales óptimas. Una vez preparadas las muestras se inyectaron en el sistema de flujo evaluando su cantidad media y el error cometido en la determinación.





CAPÍTULO I
**Desarrollo de un optosensor
fluorimétrico para la determinación de
nafronil en preparados farmacéuticos**



CAPÍTULO I. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FLUORIMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DE NAFRONIL EN PREPARADOS FARMACÉUTICOS

1 Generalidades del nafronil	157
1.1 Estructura molecular	157
1.2 Nomenclatura e historia	157
1.3 Propiedades	157
1.4 Usos	158
1.5 Toxicología	158
1.6 Propiedades farmacológicas	158
1.6.1 Propiedades farmacodinámicas	158
1.6.2 Propiedades farmacocinéticas	158
1.7 Formulaciones comerciales	159
1.8 Métodos analíticos	159
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	160
2.1 Espectros del nafronil en disolución	160
2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina.....	160
2.3 Espectros en fase sólida.....	163
2.4 Diseño del sistema de flujo	165
2.5 Elección de la disolución regenerante	166
2.6 Optimización de los parámetros instrumentales.....	167
2.6.1 Voltaje del detector.....	167
2.6.2 Ancho de rendija.....	168
2.6.3 Resolución	169

2.7 Optimización de las variables experimentales	170
2.7.1 Influencia del pH.....	170
2.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora	171
2.8 Optimización de las variables de flujo.....	173
2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo	173
2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra	174
2.9 Efecto de la temperatura	175
3 Características analíticas del método	176
3.1 Procedimiento operatorio.....	177
3.2 Recta de calibrado.....	177
3.3 Parámetros de fiabilidad	178
4 Aplicaciones del método propuesto.....	180
4.1 Determinación de nafronil en preparados farmacéuticos.....	180
4.1.1 Estudios de recuperación	181

1 Generalidades del nafronil

1.1 Estructura molecular

El nafronil, cuya fórmula molecular es $C_{23}H_{31}NO_3$ tal y como se observa en la Figura I-1, posee un peso molecular de 383,53 g/mol.

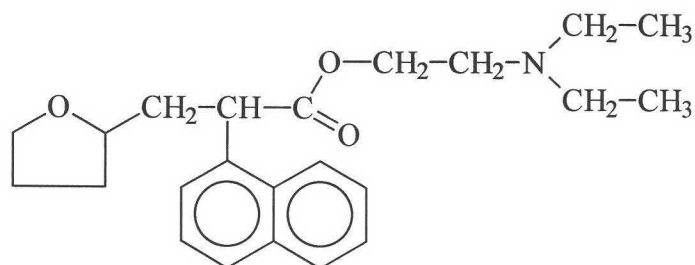


Figura I-1. Estructura molecular del nafronil

1.2 Nomenclatura e historia

El nombre químico dado por la IUPAC es 2-dietilaminoetil 3-(1-naftil)-2-tetrahidro furfuralpropionato. El nombre común más aceptado es el de nafronil o naftidrofuril y su abreviatura es NFL. Es un vasodilatador que se utiliza en medicina para el tratamiento de alteraciones en la irrigación cerebral y de órganos periféricos. Actúa como activador del metabolismo y del flujo sanguíneo, ya que puede penetrar en la circulación arterial. El producto fue sintetizado por Szarvasi *y col.*¹. Los primeros estudios de su actividad médica fueron realizados por Fontaine *y col.*² y se le empezó a dar aplicación médica a principios de los años ochenta³.

1.3 Propiedades

El nafronil es una sustancia ligeramente higroscópica, soluble en agua y en ciertos disolventes orgánicos polares como la acetona, dimetilformamida, diclorometano, dimetilsulfóxido y ciclohexanona. Cristaliza en acetato de etilo con un punto de fusión de 110-111°C.

-
1. Szarvasi. Compt. Rend., 260 (1965) 3095.
 2. Fontaine. Compt. Rend. Ser. D., 262 (1966) 719.
 3. C.A. Clyne. Brit. J. Surg., 67 (1980) 347.

1.4 Usos

El nafronil se emplea para combatir insuficiencias circulatorias cerebrales, accidentes vasculares cerebrales e insuficiencia circulatoria periférica.

Este compuesto ha sido usado por ciertos deportistas para prevenir fallos circulatorios cerebrales y artereopatías, tales como tirones y espasmos. Su uso descontrolado puede causar efectos secundarios irremediables como daños en el corazón, por lo que es considerado como sustancia prohibida por el Comité Olímpico Internacional⁴.

1.5 Toxicología

Los efectos toxicológicos de este compuesto son moderadamente importantes. Su efecto es similar a los demás vasodilatadores periféricos afectando principalmente, cuando es consumido en grandes cantidades, al sistema cardiovascular, produciendo erupciones exantemáticas, convulsiones, bradicardia y alteraciones de la conducción cardíaca. Estas son las razones por las cuales se debe tener un estricto control de su consumo en deportistas, ya que afecta directamente al corazón.

1.6 Propiedades farmacológicas

1.6.1 *Propiedades farmacodinámicas*

El nafronil es un vasodilatador periférico y cerebral. Su acción parece estar relacionada con una mejor utilización cerebral de substratos lipídicos e hidrocarbonados, aumentando la entrada y consumo de glucosa en el cerebro. Por tanto, puede producir una acción dinámica sobre los vasos sanguíneos centrales y periféricos regulando directamente la circulación cerebral sin la influencia de los conductos cardíacos y sin producir hipotensión.

1.6.2 *Propiedades farmacocinéticas*

El nafronil es absorbido rápidamente (tiempo máximo una hora). El grado de unión a proteínas plasmáticas es del 80%. Es metabolizado principalmente por las colinesterasas

4. C. Rodríguez Bueno. "Dopaje". Ed. Interamericana-McGraw-Hill. Madrid (1992).

plasmáticas, siendo eliminado mayoritariamente conjugado con el ácido glucorónico. Su semivida de eliminación es de una hora.

1.7 Formulaciones comerciales

El nafronil se comercializa en España únicamente como principio activo de un medicamento denominado Praxilene, el cual viene encapsulado junto con talco, sílice microcristalina, estearato de magnesio y excipientes. Este medicamento se presenta bajo dos envases; uno de 50 cápsulas y 100 mg de principio activo por cápsula y otro de 10 ampollas con 200 mg de principio activo por ampolla.

1.8 Métodos analíticos

Son pocos los métodos analíticos establecidos para la determinación del nafronil. La primera determinación del nafronil fue llevada a cabo por Walmsley *y col.*⁵ mediante cromatografía líquida, y fue más tarde, mejorada y simplificada por Stehlik y Houbova⁶ y Yang y Thyron⁷. Al tratarse de cromatografía líquida, los tratamientos preliminares de la muestra suelen ser tediosos, necesitando preconcentraciones del analito en disolventes orgánicos, etc..

Existe un único método basado en técnicas electroforéticas y fue propuesto en 1999 por Wang y Khaledi⁸ los cuales utilizaron la electroforesis capilar para separar y determinar seis productos farmacéuticos, entre los que se encontraba el nafronil.

Muñoz de la Peña *y col.*⁹ proponen la determinación de nafronil mediante fosforescencia a temperatura ambiente estabilizada por medios micelares en flujo parado (stopped-flow) siendo las longitudes de onda de trabajo de 288 nm y 491 nm, para la

-
5. L.M. Walmsley, P.A. Wilkinson, R.R. Brodie y L.F. Chasseaud. "Determination of naftidrofuril in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection". *J. Chromatogr.*, 338 (1985) 433.
 6. P. Stehlik y H. Houbova. *Cesk. Farm.*, 39 (1990) 394.
 7. H. Yang y F.C. Thyron. "Determination of 6 pharmaceuticals and their products in reversed-phase high-performance liquid-chromatography by using amine additives". *J. Liq. Chromatogr. R. T.*, 21 (1998) 1347.
 8. F. Wang y M.G. Khaledi. "Capillary-electrophoresis chiral separation of basic pharmaceutical enantiomers with different charges using sulfated β -cyclodextrin". *J. Microcolumn Sep.*, 11 (1999) 11.
 9. A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina y P. Fernández López. "Determination of nafronil in pharmaceutical preparations by means of stopped-flow micellar stabilized room temperature phosphorescence". *Analyst*, 123 (1998) 2285.

excitación y emisión, respectivamente. Murillo *y col.*¹⁰ proponen la determinación de nafronil en preparados farmacéuticos mediante fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares, empleando las mismas longitudes de onda y obteniendo un porcentaje de recuperación alrededor del 100 %.

En el año 2000, Cruces Blanco *y col.*¹¹ proponen la determinación de nafronil en formulaciones comerciales mediante fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados, simplificando las metodologías existentes hasta ese tiempo, pues no hacen uso de ningún medio organizado para obtener señal fosforescente, llevando a cabo la determinación de dicho principio activo excitando a 292 nm y midiendo la emisión fosforescente a 524 nm, obteniendo un límite de detección de 11.2 ng/mL y porcentajes de recuperación del 105%.

De esta revisión bibliográfica se deduce que es necesario establecer un método selectivo, sencillo, fácil de usar, de bajo costo y automatizable para el control de nafronil en los procesos industriales de fabricación.

2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

2.1 Espectros del nafronil en disolución

Para conocer los espectros de excitación y emisión fluorescente del nafronil se preparó una disolución de 500 ng/mL de nafronil en agua bidestilada. Los espectros obtenidos se pueden ver en la Figura I-2, en la que se observa que el nafronil posee fluorescencia intrínseca, con dos máximos de excitación a 284 y 294 nm y dos máximos de emisión a 326 y 336 nm.

2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina

La fase sensora es un elemento imprescindible en el diseño de un sensor de flujo ya que afecta a la selectividad, reproducibilidad y precisión del método analítico que se

-
10. J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina y P. Fernández López. "Phosphorimetric determination of nafronyl in pharmaceutical preparations", *Anal. Chim. Acta*, 382 (1999) 77.
 11. C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero, J.F. Fernández Sánchez y A. Fernández Gutiérrez. "Facile and selective determination of the cerebral vasodilator in a commercial formulation by heavy atom induced room temperature phosphorescence". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2000) 845.

establezca. Por ello, se llevó a cabo un estudio pormenorizado y detallado sobre la selección de dicha fase sensora. Para ello se probaron once tipos de resinas:

- a) No iónicas: Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4, Amberlita XAD 7, Gel de Sílica Davisil y Gel de Sílica Merck.
- b) Aniónicas: Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8.
- c) Catiónicas: Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8.

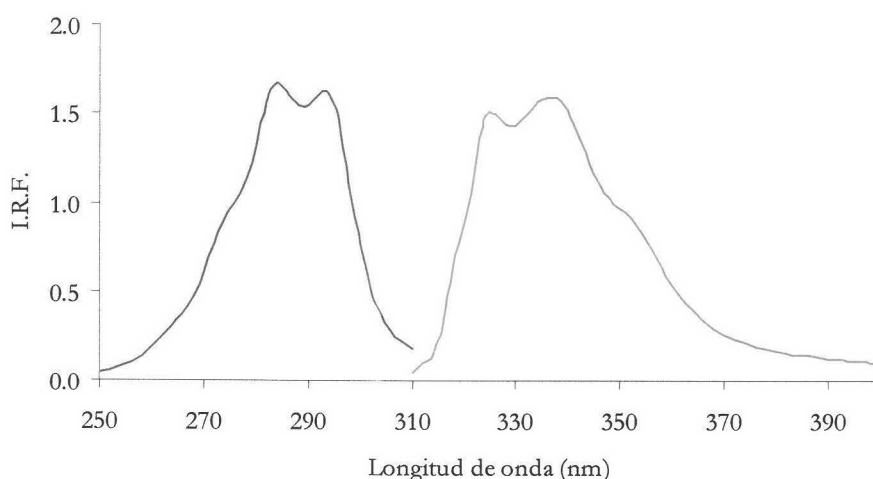


Figura I-2. Espectros de fluorescencia del nafronil en disolución.

Debido a que el pK_a del nafronil es del orden de 10, la elección de la fase sensora se llevó a cabo a dos valores de pH por debajo y por encima de dicho pK_a (5 y 12 respectivamente). Para ello, a las disoluciones portadoras y disoluciones de 300 ng/mL de nafronil se les ajustó el pH a los valores mencionados anteriormente con HCl o NaOH y se registró la diferencia entre la señal analítica y el ruido de fondo a una longitud de onda de excitación y emisión de 294/336 nm respectivamente, rendijas de 4 nm, tanto para la excitación como para la emisión, voltaje a 650 V y a una resolución de 5 s (véase Figura I-3). Como se puede ver en la figura, la mejor diferencia señal-ruido aparece cuando se usa Gel de Sílica Davisil como fase sensora.

Tras la selección del tipo de resina, se llevó a cabo el estudio del tamaño de partícula más apropiado de la resina para obtener unas buenas características analíticas. Para ello, la resina seleccionada se trituró en un mortero de ágata y se tamizó, obteniendo tres tamaños: entre 80 y 120, 120 y 160 μm y 160 y 200 μm . Tamaños inferiores a 80 μm no

se probaron ya que favorecen la aparición de sobrepresiones en el sistema de flujo. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura I-4.

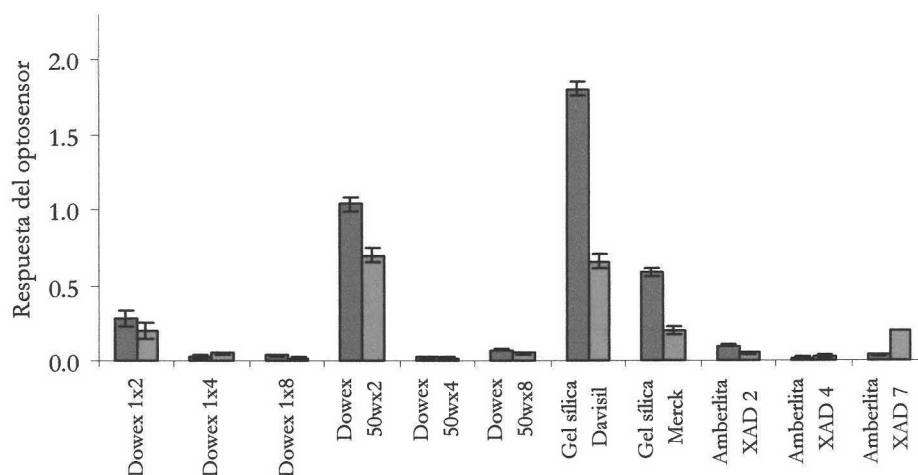


Figura I-3. Respuesta del optosensor con las diferentes fases sensoras estudiadas a ■ pH 5 y a ■ pH 12. [NFL]=300 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm.

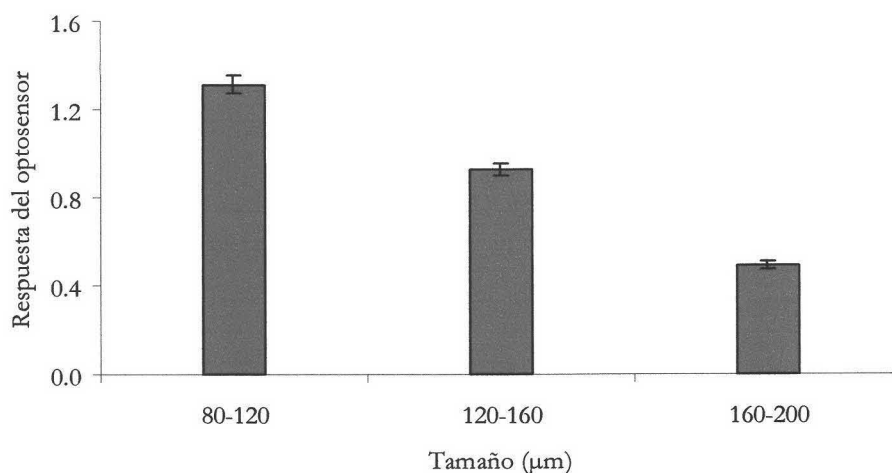


Figura I-4. Efecto del tamaño de partícula de la Gel de Sílica Davisil sobre la respuesta del optosensor. [NFL]=300 ng/mL y pH=5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm.

Como se observa en la figura anterior, la mayor diferencia entre la señal y el ruido se obtiene con un tamaño de partícula entre 80 y 120 µm, observándose diferencias significativas con respecto a los otros tamaños de partícula ensayados.

Por lo tanto, la fase sensora seleccionada para la obtención del optosensor de nafronil ha sido Gel de Sílica Davisil con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm .

Fase sensora: Gel de Sílica Davisil particulada a 80-120 μm

2.3 Espectros en fase sólida

En el desarrollo de optosensores selectivos es necesario conocer las características espectroscópicas del analito soportado sobre la fase sensora seleccionada.

Para ello, una suspensión de la resina seleccionada en una disolución de 300 ng/mL de NFL a pH 5 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas del NFL soportado en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada a pH 5 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda del NFL, obteniendo las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión del analito en estudio (véase Figura I-5 a y b).

En la Figura I-5a, se observa que el NFL se retiene sobre la resina ya que hay un aumento de la emisión fluorescente de la fase sensora. Para determinar cuales son las longitudes de onda más apropiadas para la medida de fluorescencia se procedió a la eliminación de la contribución de la fase sensora, mediante una substracción, de los espectros obtenidos cuando en NFL estaba fijado. El resultado obtenido se muestra en la Figura I-6.

Se puede observar que las longitudes de onda de excitación y emisión para el NFL soportado en la fase sensora seleccionada son 294 y 336 nm respectivamente, coincidiendo con las longitudes de onda de éste en disolución.

Para el resto del trabajo experimental las longitudes de onda elegidas han sido:

$$\lambda_{\text{exc/em}} = 294/336 \text{ nm}$$

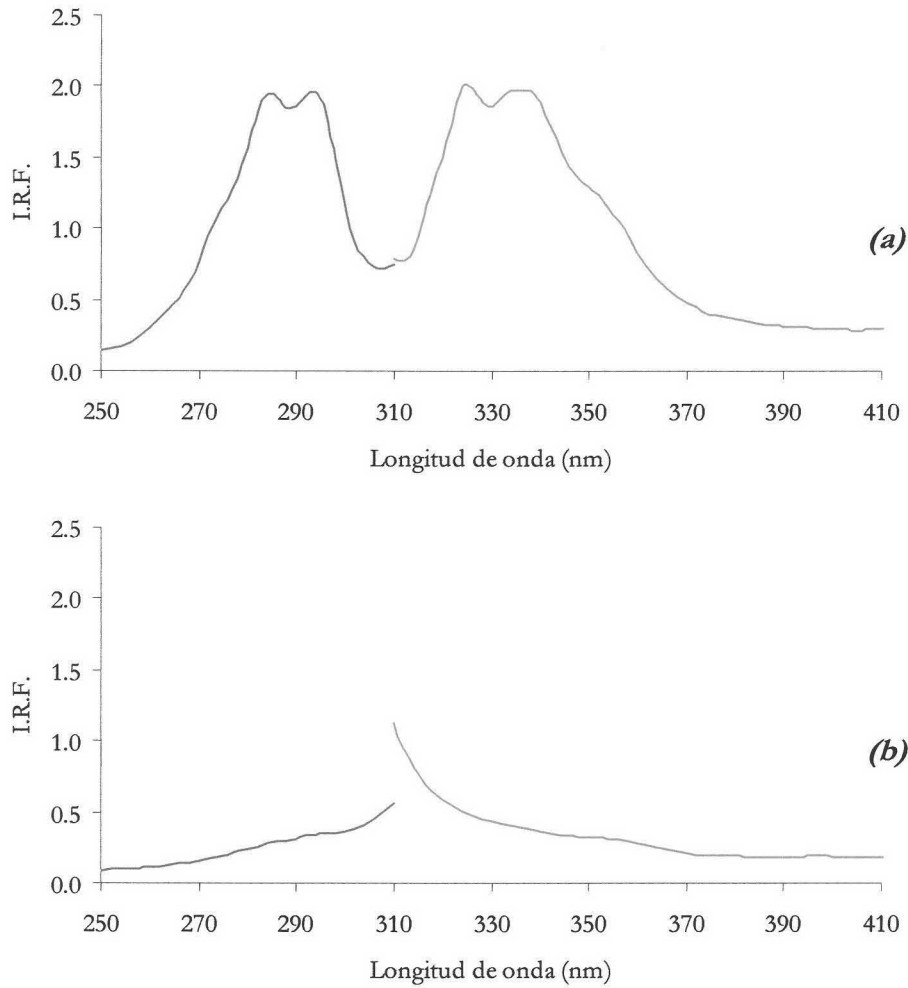


Figura I-5. Espectros de excitación y emisión de a) NFL soportado en Gel de Sílica Davisil y b) Gel de Sílica Davisil a $\lambda_{exc/em}$ del NFL. [NFL]=300 ng/mL, pH=5 (fijado con HCl). Voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm.

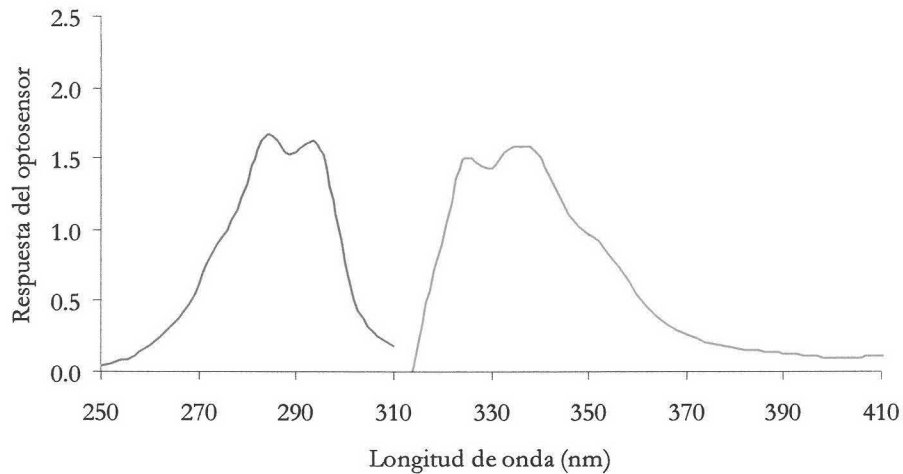


Figura I-6. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del NFL soportado sobre Gel de sílica Davisil y los espectros de la fase sensora a las longitudes de onda máximas del analito.

2.4 Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). El sistema FIA propuesto, si bien ha sido descrito en la introducción y en la parte experimental, presenta una serie de particularidades propias del sistema en estudio. Concretamente consta de (véase Figura I-7):

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen definido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta la fase sensora seleccionada (Gel de Sílica Davisil) y colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro.

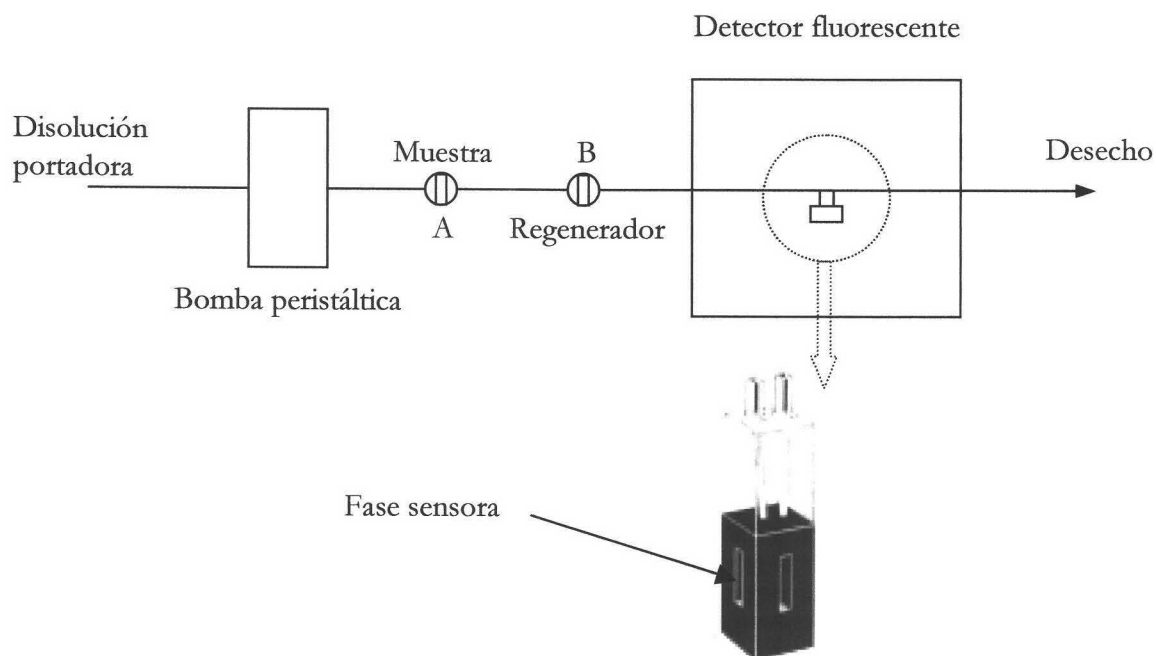


Figura I-7. Sistema de flujo utilizado.

2.5 Elección de la disolución regenerante

La interacción entre el NFL y la fase sensora es irreversible en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas y, por tanto, es necesario el uso de una disolución regenerante que permita reutilizar el sensor.

Como se ha demostrado anteriormente en la elección de la fase sensora, cuanto mayor es el pH del medio menor es la interacción entre el NFL y la Gel de Sílica Davisil, por lo que cabría esperar buenos resultados en el uso de bases fuertes como disolución regenerante. Por ello, se ensayó NaOH a diferentes concentraciones (0.05, 0.1 y 0.5 M).

En la Figura I-8 se puede observar que en todos los casos se producía una disminución en la emisión fluorescente cuando el bolo de disolución regenerante (NaOH) atravesaba la fase sensora, pero únicamente se producía una total eliminación del NFL retenido cuando se usaba NaOH 0.5 M, eligiendo por tanto ésta como concentración de disolución regenerante óptima, ya que, además, cómo se observa en la Figura I-8 se obtiene una buena repetibilidad de las medidas.

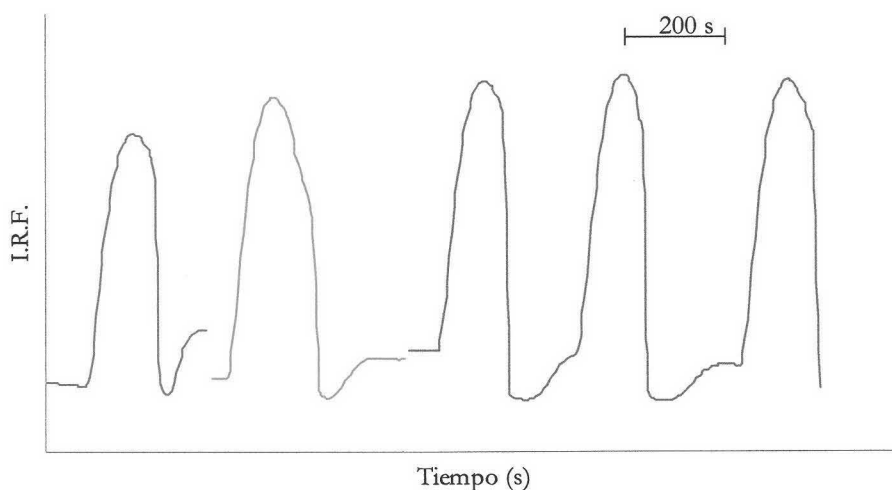


Figura I-8. Regeneración de la fase sensora con NaOH (0.05 M, 0.1 M, 0.5 M). [NFL]=300 ng/mL. pH 5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

En todos los casos se usó un volumen de disolución regenerante de 250 μ L.

Regenerador: NaOH 0.5 M

2.6 Optimización de los parámetros instrumentales

Seleccionada la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y la disolución regenerante, se procedió, a continuación, a estudiar los parámetros instrumentales del equipo de medida con objeto de mejorar la diferencia señal-ruido y por tanto, las características analíticas del optosensor propuesto. Los parámetros instrumentales optimizados fueron: voltaje aplicado al detector, rendijas de los monocromadores de excitación y emisión y la resolución de las medidas del instrumento.

2.6.1 Voltaje del detector

El primer parámetro instrumental estudiado fue el voltaje que se le aplica al fotomultiplicador. Este parámetro afecta tanto al valor de la señal analítica como a la repetibilidad de la misma.

Para llevar a cabo esta optimización se inyectó una muestra de 300 ng/mL de NFL a pH 5 (fijado con HCl), obteniéndose el fiagrama conforme se variaba el voltaje del detector, realizando, en todos los casos, 3 réplicas a las condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm; rendijas de excitación y emisión de 4 nm; resolución 5 s; velocidad de flujo 1.5 mL/min y volumen de muestra inyectado 2 mL. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura I-9.

Como se observa en esta figura, un aumento del voltaje del detector provoca un aumento de la respuesta del optosensor. Además, provoca un aumento del error de la medida, aunque este error no es, en ningún caso, lo suficientemente elevado como para tenerlo en cuenta a la hora de seleccionar el voltaje óptimo. Por tanto, y buscando la mayor diferencia entre la señal analítica y el ruido, se seleccionó un voltaje de 650 V para el resto de trabajo experimental. No se pueden usar voltajes superiores ya que el detector se satura.

Voltaje del detector: 650 V

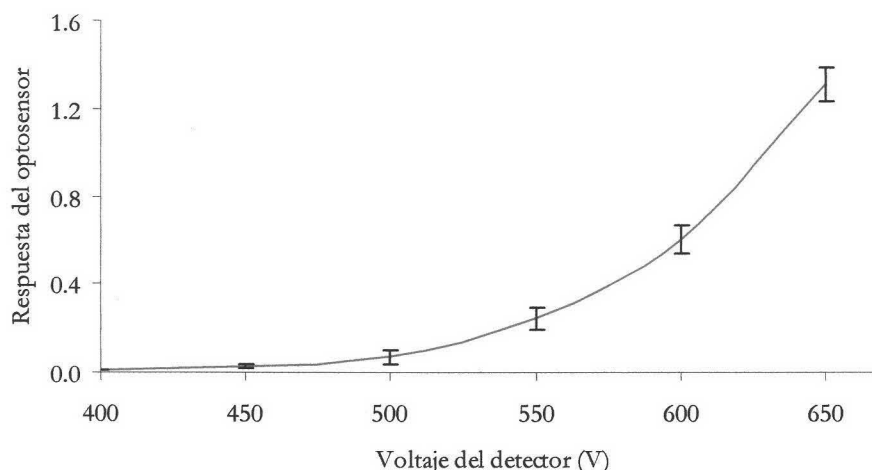


Figura I-9. Influencia del voltaje del detector en la respuesta del optosensor. [NFL]=300 ng/mL.

2.6.2 Ancho de rendija

La apertura de las rendijas de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre el analito soportado sobre la fase sensora y por tanto, sobre la intensidad de emisión de éste. La apertura de la rendija de emisión influye sobre la cantidad de luz que llega al detector. Los valores de ambas rendijas en el equipo instrumental utilizado pueden adquirir valores que pueden oscilar entre 0.5 y 16 nm.

Para estudiar el efecto de la anchura de las rendijas sobre la señal analítica se inyectó en el sistema una muestra de 300 ng/mL de NFL a pH 5 y se fijaron el resto de los parámetros instrumentales a los valores óptimos ya establecidos variando la anchura de las rendijas y barriendo todas las posibilidades. Se realizaron tres réplicas para cada una de las anchuras de rendijas ensayadas y el estudio se encuentra reflejado en la Figura I-10.

Como se observa en la figura, un aumento de la anchura de las rendijas provoca un aumento de la señal analítica, obteniéndose la mayor respuesta del optosensor, con un error adecuado para el método propuesto, cuando la anchura de las rendijas es de 4 nm, tanto para la excitación como para la emisión. No se pueden estudiar aperturas de rendija mayores a las seleccionadas ya que saturan el detector.

Ancho de rendijas_{exc/em}: 4/4 nm

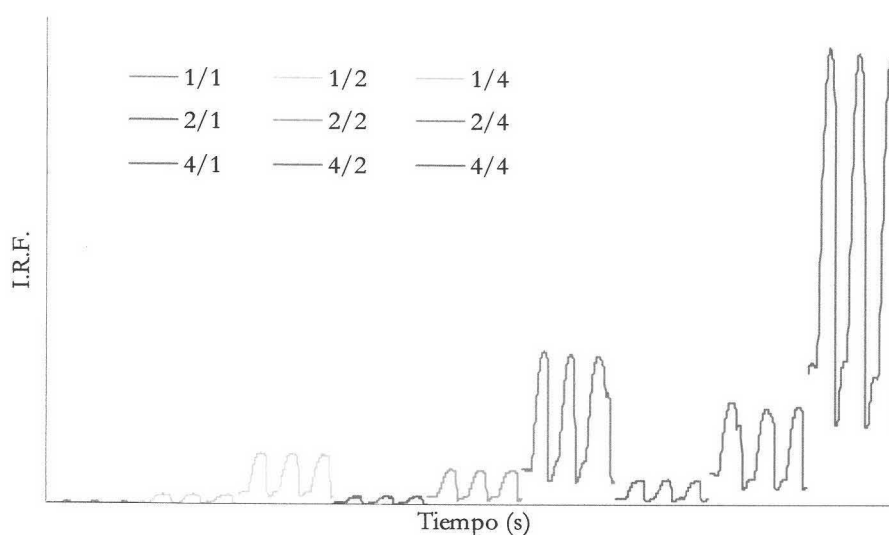


Figura I-10. Diagrama del efecto del ancho de rendija. $[NFL]=300$ ng/mL. pH=5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

2.6.3 Resolución

La resolución es el tiempo que transcurre entre las medidas realizadas por el instrumento y afecta a la forma y definición de los diagramas y a la repetibilidad de la respuesta del optosensor. Para ver la influencia de la resolución sobre estos parámetros se inyectó en el sistema una muestra de 300 ng/mL de NFL a pH 5 y se fijaron los parámetros instrumentales a las condiciones óptimas establecidas variando la resolución del equipo. El estudio se encuentra reflejado en la Figura I-11.

Como se observa en la figura, la resolución afecta muy levemente a la respuesta del optosensor, por lo que para tener un número significativo de puntos en la medida de cada muestra analizada y definir adecuadamente los picos de los diagramas se fijó una resolución de 5 s.

Resolución: 5 s

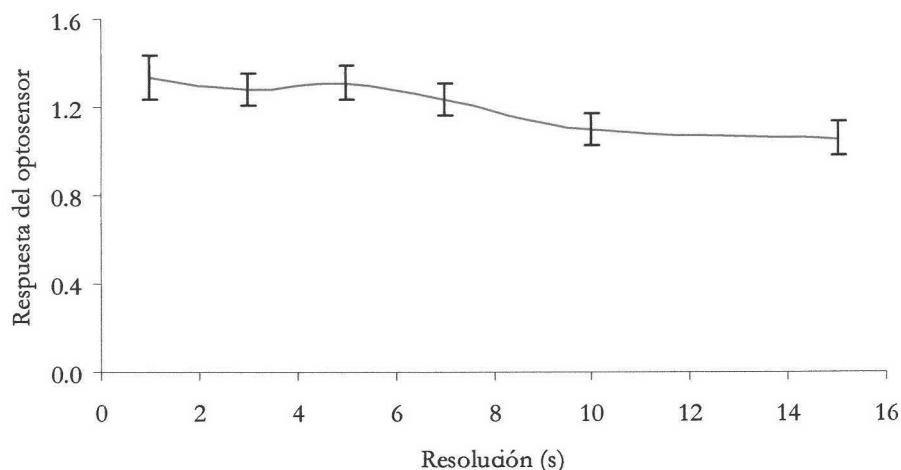


Figura I-11. Influencia de la resolución del equipo en la respuesta del optosensor y la repetibilidad de las medidas. $[NFL]=300\text{ ng/mL}$. $pH=5$ fijado con HCl . $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

2.7 Optimización de las variables experimentales

Establecidos los parámetros instrumentales, se procedió a estudiar la influencia de las variables experimentales para establecer los valores óptimos de las variables químicas que afectan al optosensor propuesto. Las variables estudiadas han sido: pH y tipo y concentración de disolución reguladora.

2.7.1 Influencia del pH

El pH afecta tanto a la fluorescencia intrínseca del NFL, ya que tiene grupos ionizables, como a la interacción de éste con la fase sensora.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones portadoras y de muestras de 300 ng/mL de NFL, con pHs comprendidos entre 3.0 y 10.5 ajustados con HCl o NaOH. Se realizaron 3 réplicas para cada muestra medida y los resultados obtenidos se muestran en la Figura I-12.

Se observa en dicha figura que la mejor diferencia señal-ruido se obtiene en el intervalo de pHs comprendido entre 4.5 y 5.5, seleccionando 5 como pH de trabajo.

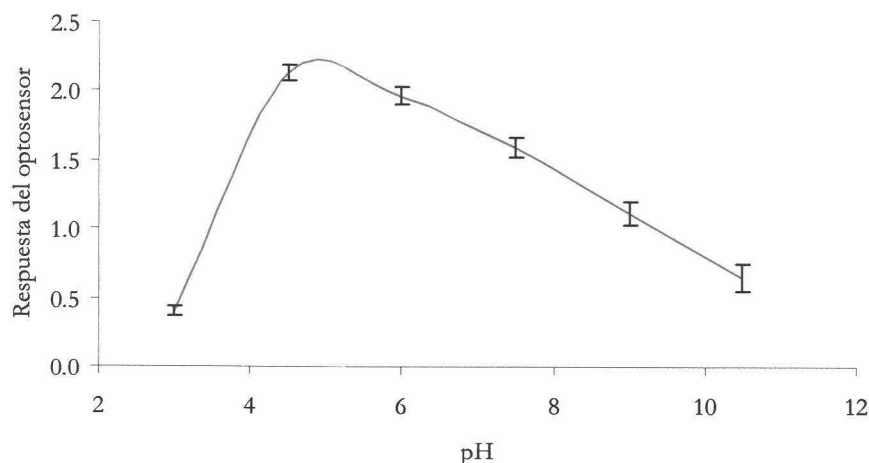


Figura I-12. Influencia del pH en la respuesta del optosensor. [NFL]=300 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

pH: 5.0

2.7.2 Tipo y concentración de la disolución reguladora

Es necesario elegir una disolución reguladora que fije el pH y la fuerza iónica del medio. Por ello, se estudió el efecto que producían sobre la diferencia señal-ruido el uso de diferentes disoluciones reguladoras disponibles al pH de trabajo. Las disoluciones ensayadas fueron: HAc/NaAc, citrato sódico/HCl y ftalato ácido de potasio/HCl.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones portadoras y muestras de 300 ng/mL de NFL a pH 5 a una concentración de 5 mM de cada una de las disoluciones reguladoras estudiadas, y se registró la variación de la respuesta del optosensor y del error de la medida a las condiciones instrumentales óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura I-13.

En esta figura se observa que el error de las medidas no depende de la disolución reguladora usada, sin embargo, la respuesta del optosensor es mayor cuando se usa como disolución reguladora HAc/NaAc, por lo que se seleccionó ésta como disolución reguladora de trabajo.

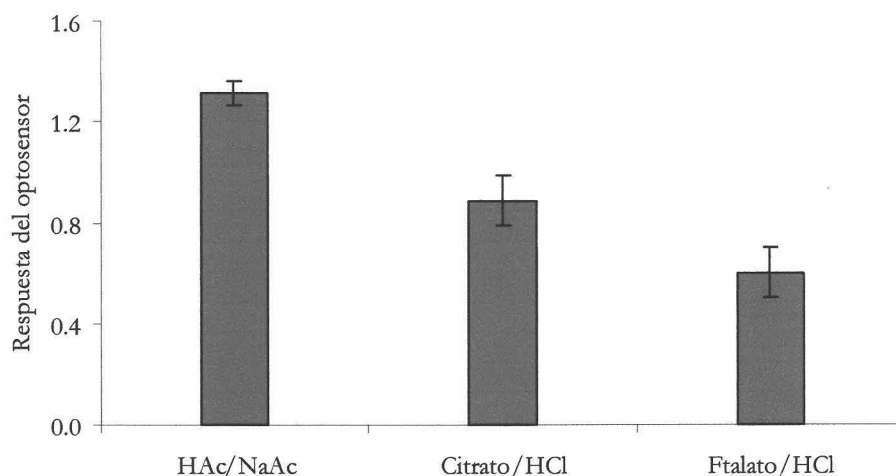


Figura I-13. Efecto del tipo de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. [NFL]=300 ng/mL. pH=5. HCl. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Disolución reguladora: HAc/NaAc

Una vez seleccionado el tipo de disolución reguladora, es necesario fijar la concentración óptima para que la fuerza iónica de la disolución portadora y las muestras sea la misma.

Se ensayaron diferentes concentraciones de disolución reguladora HAc/NaAc de pH 5.0 adicionadas al portador y las muestras, simultáneamente, registrando tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura I-14.

Como se puede observar en esta figura, la concentración de la disolución reguladora afecta a la respuesta del optosensor y a la repetibilidad de las medidas, de modo que un aumento de la fuerza iónica del portador y las muestras disminuye la diferencia señal-ruido pero también disminuye el error en las medidas del optosensor. Se seleccionó una concentración de disolución reguladora de 5 mM pues tenemos una elevada diferencia señal-ruido y un error adecuado.

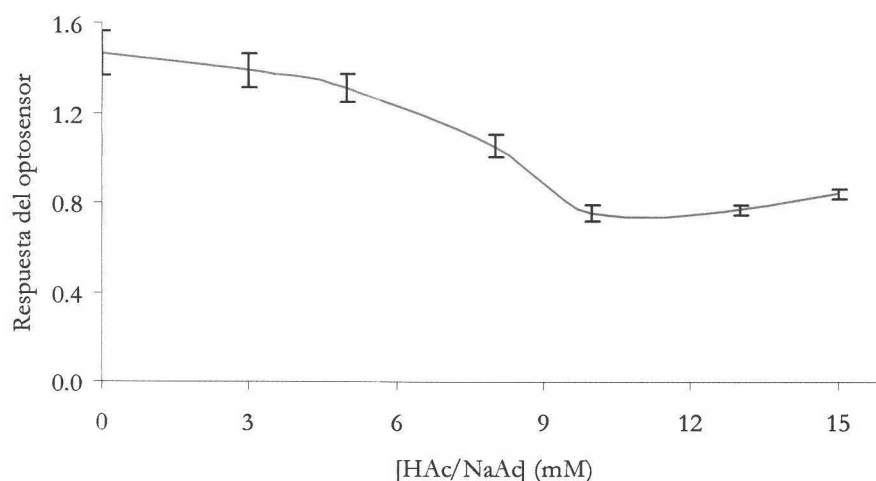


Figura I-14. Influencia de la concentración de disolución reguladora sobre la respuesta del optosensor. [NFL]=300 ng/mL, disolución reguladora empleada HAc/NaAc a pH 5. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, 3 inyecciones de muestra de volumen 2 mL.

[HAc/NaAc]: 5 mM

2.8 Optimización de las variables de flujo

Seleccionados los parámetros instrumentales y variables experimentales, se procedió al estudio de las variables que afectan al sistema de flujo. Concretamente, las variables más importantes son: velocidad de flujo y volumen de inyección de muestra.

2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo

Para que tenga lugar la emisión fluorescente del NFL en fase sólida, es necesario que el analito que pasa a través de la resina quede retenido durante un tiempo. Este proceso, al ser de naturaleza cinética, está determinado por la velocidad a la que pasa el portador arrastrando al analito, afectando a la respuesta final del optosensor. Además, lógicamente, también influye sobre el tiempo de respuesta del mismo.

Para evaluar dicha influencia se varió la velocidad de flujo del portador en las condiciones óptimas anteriormente fijadas, realizando sucesivas inyecciones de una

disolución de 300 ng/mL de NFL registrándose la intensidad de fluorescencia y el tiempo de respuesta para cada flujo. Los resultados obtenidos se pueden ver en la Figura I-15.

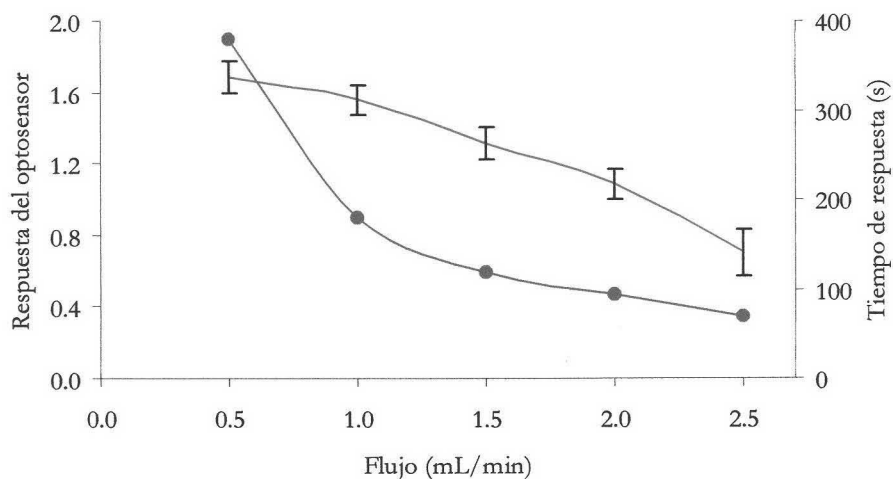


Figura I-15. Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta (● tiempo de respuesta). [NFL]=300 ng/mL. [HAc/NaAc a pH=5] 5 mM. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Volumen de muestra inyectado 2 mL.

Como se observa en la figura anterior a velocidades de flujo pequeñas, se consigue una mayor señal analítica a costa de mayores tiempos de respuesta y viceversa. Por tanto, se adoptó una solución de compromiso entre una señal analítica útil y un tiempo de respuesta favorable, eligiendo como velocidad de flujo óptima la de 1.5 mL/min.

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min

2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra

El volumen de inyección de muestra afecta principalmente al tiempo de respuesta del optosensor. Para investigar dicha influencia, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección de analito (válvula A) y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 300 ng/mL de NFL, registrándose la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta para cada volumen inyectado (véase Figura I-16).

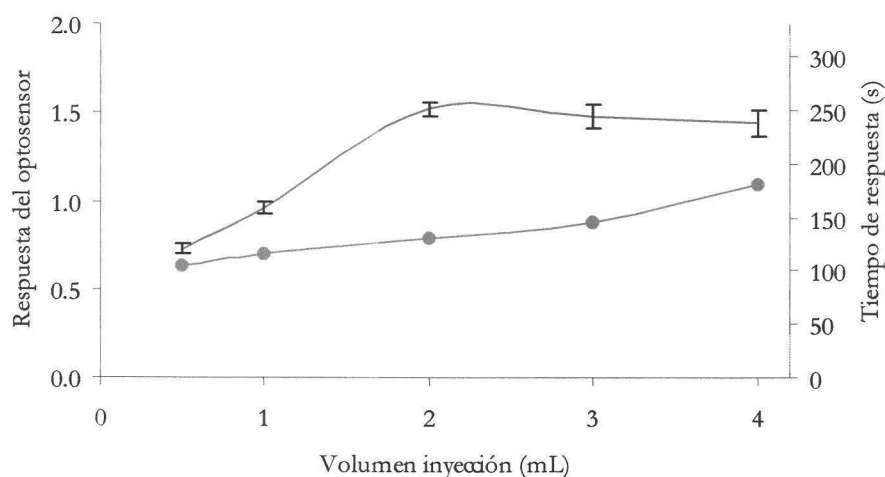


Figura I-16. Efecto del volumen de inyección de muestra en la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta (● tiempo de respuesta). [NFL]=300 ng/mL. [HAc/NaAc a pH=5] 5 mM. λ_{exc}/em 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min.

Como se puede observar, un aumento del volumen de inyección de muestra provoca un aumento considerable de la respuesta del optosensor hasta que se inyectan 2 mL de muestra y un aumento del tiempo de respuesta. Un aumento del volumen de muestra provoca una saturación del sistema por lo que aunque se aumente el volumen de inyección de muestra no aumenta la señal del optosensor. Por tanto, se seleccionó un volumen de inyección de muestra óptimo de 2 mL, pues se obtiene la mejor diferencia señal-ruido con un tiempo de respuesta del optosensor adecuado.

Volumen de inyección de muestra: 2 mL

2.9 Efecto de la temperatura

La emisión fluorescente, como todos los fenómenos luminiscentes, se ve afectada por cambios en la temperatura. Además, la temperatura también puede influir a la interacción entre el analito y la fase sensora. Por ello, se realizó un estudio de la influencia de la misma sobre la respuesta del optosensor de nafronil propuesto.

Para ello, se preparó una disolución portadora y una muestra de 300 ng/mL de NFL en las condiciones experimentales óptimas anteriormente comentadas ([HAc/NaAc a

pH 5]=5 mM) y se registró la señal fluorescente en las condiciones instrumentales óptimas ($\lambda_{exc/em}=294/336$ nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s) mientras el sistema circulaba con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min inyectando 3 réplicas de 2 mL de muestra para cada una de las temperaturas estudiadas.

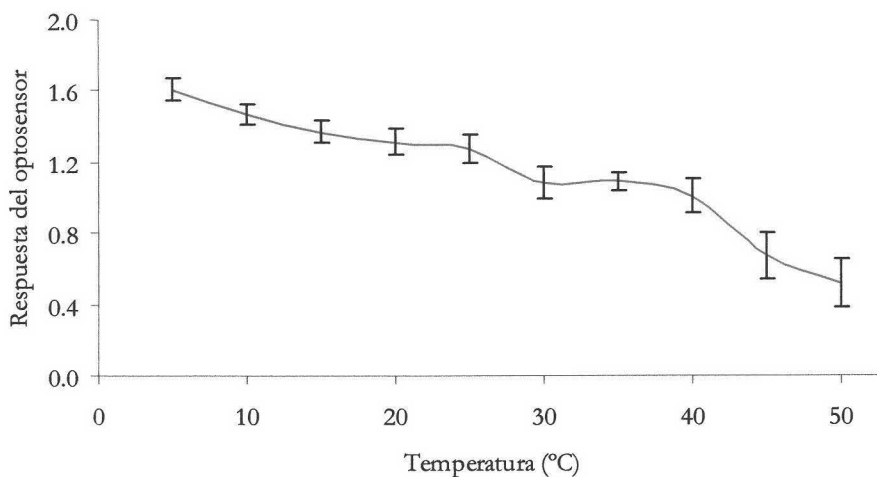


Figura I-17. Influencia de la temperatura sobre el optosensor de NFL. [NFL]=300 ng/mL. [HAc/NaAc a pH=5] 5 mM. $\lambda_{exc/em}$ 294/336 nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Como se observa en la Figura I-17, el optosensor de nafronil propuesto se ve influenciado por la temperatura, disminuyendo su respuesta al aumentar ésta. Por ello se termostató el compartimento de muestra del espectroluminómetro a 20°C, una temperatura cercana a la temperatura ambiente.

3 Características analíticas del método

Una vez seleccionada la fase sensora y la disolución regeneradora, optimizados los parámetros instrumentales y variables experimentales y FIA, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, la recta

de calibrado y los parámetros de fiabilidad, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*¹².

3.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Gel de Sílica Davisil particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de HAc/NaAc a pH 5 con agua bidestilada hasta una concentración de 5 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de nafronil en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de HAc/NaAc a pH 5 en una concentración de 5 mM). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 1.5 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: $\lambda_{\text{exc/em}}=294/336$ nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de nafronil preparadas, regenerando la fase sensora con 250 μL de NaOH 0.5 M después de cada inyección de muestra.

3.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de NFL, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla I-1 se muestran los datos obtenidos de la recta de calibrado y en la Figura I-18 se muestra la influencia de la concentración de NFL sobre la respuesta del optosensor.

Tabla I-1. Réplicas obtenidas del calibrado

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
100	0.416	0.404	0.395
200	0.756	0.813	0.808
300	1.229	1.297	1.237
400	1.656	1.651	1.574
500	2.030	2.024	1.952
600	2.472	2.438	2.470
700	2.864	2.770	2.768

12. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.

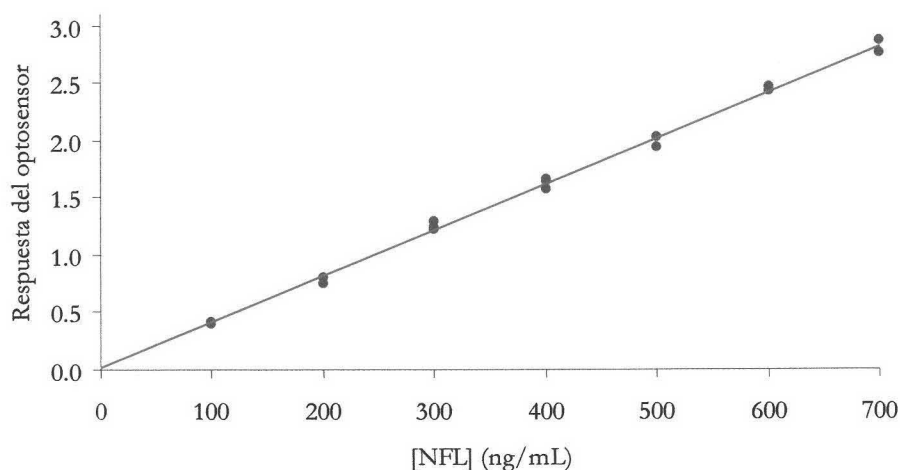


Figura I-18. Curva de calibrado del optosensor de nafronil.

3.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ La Tabla I-2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla I-2. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0052
Límite de detección (ng/mL)	3.9
Límite de cuantificación (ng/mL)	13.0
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	3.9-700.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en la Tabla I-3.

Tabla I-3. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0102
Desviación estándar (s_a)	0.0203
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	198.8
Pendiente (b)	0.0040
Desviación estándar (s_b)	0.0000
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	1.13
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0415
Coefficiente de correlación (r)	0.9988
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.76

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) tanto de los blancos como de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado, respectivamente. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla I-4, y la estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla I-5.

Tabla I-4. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
100	7.2
200	6.8
300	6.4
400	6.4
500	6.5
600	6.8
700	7.2

Tabla I-5. Parámetros de fiabilidad según el método de Cuadros y col.

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	98.9	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	10.3	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	30.2	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	100.5	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	30.2-700.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	100 ng/mL	7.4
	200 ng/mL	3.5
	300 ng/mL	2.1
	400 ng/mL	1.6
	500 ng/mL	1.3
	600 ng/mL	1.1
	700 ng/mL	1.0

4 Aplicaciones del método propuesto

El nafronil es un principio activo presente en medicamentos con propiedades vasodilatadoras, aunque, en España, sólo se comercializa un medicamento que lo contiene como principio activo y cuyo nombre es Praxilene 100 mg, habiendo sido el utilizado para la determinación de nafronil.

4.1 Determinación de nafronil en preparados farmacéuticos

El Praxilene 100 mg es un fármaco que pertenece a los laboratorios FAES y que lo comercializa en España bajo licencia de LIPHA, que se presenta en un envase de 50 cápsulas y se emplea como activador metabólico y circulatorio capaz de aumentar la circulación arterial, estando dotado además de un potente efecto antiálgico. La composición especificada por el fabricante por cápsula es: Naftidrofuril oxalato (D.C.I.) 100 mg y excipientes como: talco, sílice microcristalina y estearato magnésico.

4.1.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para una concentración de nafronil de 500 ng/mL, valor que está dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 5 cápsulas, se separó el envoltorio de la cápsula y el contenido se pesó (siendo el peso medio de dicho contenido por cápsula de 168 mg), se trituró y homogeneizó y se tomaron 4.2 mg del polvo resultante y se diluyeron a 100 mL con agua bidestilada. Se tomó la cantidad adecuada de cada disolución de muestra para tener una concentración de NFL de 500 ng/mL y se añadió la cantidad adecuada de disolución reguladora de HAc/NaAc a pH 5 para obtener una concentración final de 5 mM y se enrasó con agua bidestilada.

Se realizaron 7 réplicas llevando a cabo el registro de la intensidad de fluorescencia a las condiciones instrumentales óptimas: $\lambda_{exc/em}=294/336$ nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min e inyectando 2 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla I-6.

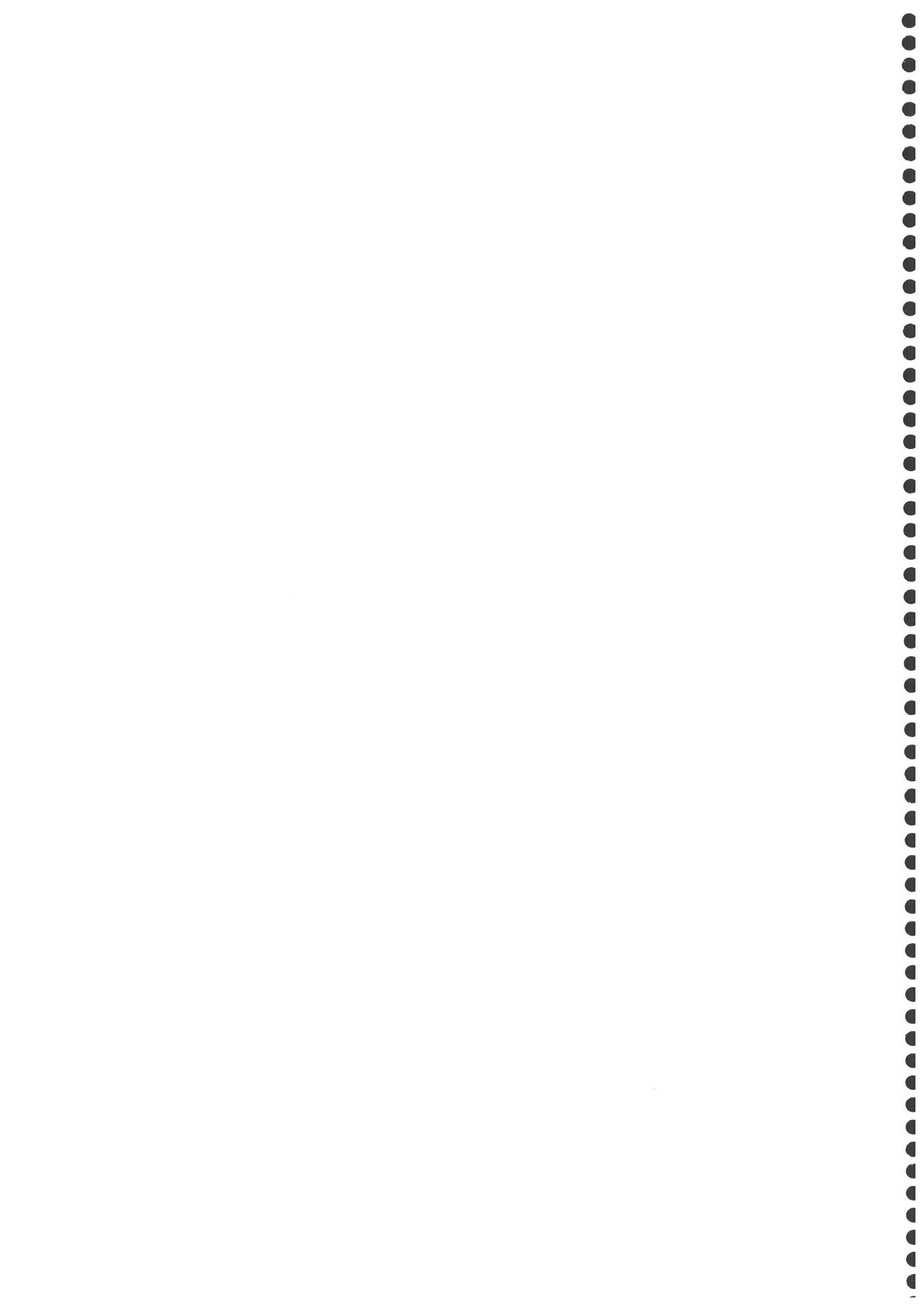
Tabla I-6. Análisis del contenido de nafronil en Praxilene 100 mg

Muestra	Valor nominal declarado (mg/cápsula)	Valor encontrado (mg/cápsula)	% Recuperación
1	100	99.7	99.7
2	100	106.6	106.6
7	100	103.4	103.4
4	100	105.4	105.4
5	100	102.0	102.0
6	100	101.4	101.4
7	100	101.1	101.1
Media	100	102.7	102.7
D.E.R. (%)	-	-	2.3

De estos resultados se podría concluir que el optosensor propuesto ofrece excelentes parámetros analíticos tales como sensibilidad, selectividad, versatilidad y facilidad de uso, demostrándose que las posibles interferencias no afectan a la determinación de NFL en productos farmacéuticos.

Por ello, el optosensor propuesto presenta una buena alternativa a técnicas más sofisticadas para el control de la concentración de NFL en fármacos, abaratando el análisis y disminuyendo el tiempo necesario en los laboratorios de control de las empresas farmacéuticas.

CAPÍTULO II
**Desarrollo de un optosensor
fluorimétrico para la determinación de
naproxeno en preparados
farmacéuticos y fluidos biológicos**



**CAPÍTULO II. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FLUORIMÉTRICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPROXENO EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS**

1 Generalidades del naproxeno.....	187
1.1 Estructura molecular.....	187
1.2 Nomenclatura e historia.....	187
1.3 Propiedades.....	187
1.4 Usos.....	187
1.5 Toxicología.....	188
1.6 Propiedades farmacológicas.....	188
1.6.1 Propiedades farmacodinámicas.....	188
1.6.2 Propiedades farmacocinéticas.....	188
1.7 Formulaciones comerciales.....	189
1.8 Métodos analíticos.....	189
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	197
2.1 Espectros del naproxeno en disolución.....	197
2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina.....	198
2.3 Espectros del naproxeno en fase sólida.....	200
2.4 Diseño del sistema de flujo.....	202
2.5 Elección de la disolución regenerante.....	203
2.6 Optimización de los parámetros instrumentales.....	205
2.6.1 Voltaje del detector.....	205
2.6.2 Ancho de rendija.....	206
2.6.3 Resolución.....	207

2.7 Optimización de las variables experimentales	208
2.7.1 Influencia del pH.....	208
2.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora	209
2.8 Optimización de las variables de flujo.....	211
2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo	211
2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra.....	213
2.9 Efecto de la temperatura	214
3 Características analíticas del método	215
3.1 Procedimiento operatorio.....	215
3.2 Recta de calibrado.....	215
3.3 Parámetros de fiabilidad	216
4 Aplicaciones del método propuesto.....	219
4.1 Determinación de naproxeno en preparados farmacéuticos.....	219
4.1.1 Estudios de recuperación	219
4.2 Determinación de naproxeno en muestras de orina.....	221
4.2.1 Procedimiento operatorio.....	221
4.2.2. Estudio del efecto matriz y determinación directa del naproxeno en orina.....	222
4.2.3 Validación del método. Método de adición de patrón.....	223

1 Generalidades del naproxeno

1.1 Estructura molecular

El naproxeno, cuya fórmula molecular es $C_{14}H_{14}O_3$ tal y como se observa en la Figura II-1, posee un peso molecular de 230.3 g/mol.

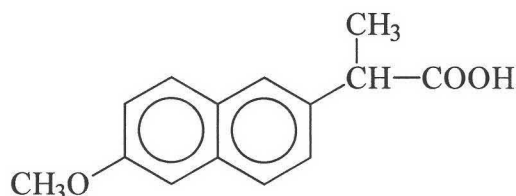


Figura II-1. Estructura molecular del naproxeno.

1.2 Nomenclatura e historia

El nombre químico dado por la IUPAC es ácido (S)-(6-metoxi- α -metil-2-naftalenacético pero también recibe el nombre de ácido (+)-2-(6-metoxi-2-naftil) propiónico. El nombre de naproxeno es su nombre común, siendo su abreviatura NAP.

1.3 Propiedades

Forma cristales en acetona y hexano. Su punto de ebullición es 153-154°C. Presenta isomería óptica con $[\alpha]_D = +66^\circ$ en cloroformo.

1.4 Usos

Según Lorenzo Velázquez¹ es un derivado del ácido fenilpropiónico que ha sido introducido en terapéutica como fármaco con acciones analgésicas, antitérmicas o antiinflamatorias semejantes a la aspirina y que comparte su mecanismo de acción aún siendo de estructura química diferente.

1. B. Lorenzo Velázquez. "Farmacología y su Proyección a la Química", 15ª edición. Ed. Otel. Madrid (1987).

Los estudios de relación entre estructura química y acción no han permitido identificar características comunes de las que dependan las acciones farmacológicas de estas sustancias.

La absorción oral de analgésicos-antiinflamatorios es rápida y completa. La vía oral es la preferente de administración y aunque la absorción es fácil en el estómago, cuantitativamente juega más la absorción en el intestino delgado proximal.

El consumo regular de analgésicos-antiinflamatorios en la gestante debe evitarse por el riesgo de acumulación y potencial teratogenia en el feto. Sufre recirculación enterohepática que contribuye a la persistencia de los niveles sanguíneos terapéuticos y a la vida media plasmática siendo ésta de 14 horas.

La dosis analgésica del naproxeno es de 250/375 mg cada 12 horas, la dosis se ajusta según la respuesta clínica, que suele requerir concentraciones plasmáticas superiores a 50 µg/mL. Para obtener efecto analgésico en cuadros agudos se puede requerir una dosis inicial de 500 mg seguida de 250 mg cada 6 u 8 horas.

1.5 Toxicología

La DL₅₀ en ratones por vía intravenosa es 435 mg/Kg y 1234 mg/Kg por vía oral, en ratas es 575 mg/Kg por vía intraperitoneal y 534 mg/Kg por vía oral.

1.6 Propiedades farmacológicas

1.6.1 *Propiedades farmacodinámicas*

El naproxeno es un antiinflamatorio no esteroideo, relacionado químicamente con el grupo de los ácidos arilacéticos, presentando además de su elevada actividad antiinflamatoria, propiedades analgésicas y antipiréticas notables.

1.6.2 *Propiedades farmacocinéticas*

El naproxeno se solubiliza fácilmente en agua y se absorbe rápida y completamente en el tracto gastrointestinal tras su administración oral alcanzándose niveles plasmáticos máximos al cabo de 1 a 2 horas, dependiendo del estado prandial. El naproxeno tiene una

vida media de 13 horas y a niveles terapéuticos se une a la albúmina sérica en más de un 99%.

Aproximadamente un 95% de la dosis de naproxeno se excreta en la orina inalterado o como 6-O-desmetil naproxeno y sus conjugados. La velocidad de desaparición del naproxeno corresponde a la velocidad de desaparición del fármaco en el plasma.

1.7 Formulaciones comerciales

En España existen diferentes especialidades farmacéuticas de naproxeno: Aliviomas, Naprokes y Naproxeno Belmac en supositorios de 500 mg y cápsulas de 250 mg; Denaxpren y Lundiran en cápsulas de 250 mg; Naprosyn en comprimidos de liberación controlada de 1 g, comprimidos ranurados de 500 mg, supositorios de 500 mg y sobres granulados de 500 mg; Naprosyn Gel 1%; Naproxeno Rathipharm en cápsulas de 250 mg, comprimidos recubiertos de 500 mg y supositorios de 500 mg; Tacron comprimidos recubiertos de 250 y 500 mg.

De naproxeno sódico existen, comerciales en España, las siguientes especialidades: Aleve en comprimidos recubiertos de 275 mg; Anaprox en comprimidos de 220 mg; Antalgin en comprimidos recubiertos de 550 mg.

1.8 Métodos analíticos

Existen una gran variedad de métodos analíticos para la determinación del naproxeno y para la resolución de los enantiómeros del naproxeno. La mayoría de los métodos de resolución de enantiómeros utilizan cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)²⁻⁶.

-
2. J. Goto, N. Goto y T. Nambara. "Separation and determination of naproxen enantiomers in serum by high-performance liquid-chromatography". *J. Chromatogr.* 239 (1982) 559.
 3. I.W. Wainer y T.D. Doyle. "Applications of high performance liquid-chromatographic chiral stationary to pharmaceutical analysis: structural and conformational effects in the direct enantiomeric resolution of α -methylarylacetic acid anti-inflammatory agents". *J. Chromatogr.*, 284 (1984) 117.
 4. Y. Fujimoto, K. Ishi, H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto y R. Shimizu. "New derivatization reagents for the resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography". *J. Chromatogr.*, 402 (1987) 344.
 5. K. Shimada, E. Anuda, T. Oe y T. Nambara. "Ferrocene derivatization reagents for optical resolution of carboxylic acids by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection". *J. Liq. Chromatogr.*, 10 (1987) 3161.

Otras posibilidades propuestas han sido las de Petterson y Gioneli⁷ que utilizan de forma simultánea una fase estacionaria quiral y un aditivo quiral en la fase móvil; Andersen y Hansen⁸ que usan una columna quiral-AGP; Toyo'oka y col.⁹ que utilizaron derivación con reactivos fluorescentes; Castellani y col.¹⁰ que emplearon columnas microbore; y Mortensen y col.¹¹ que usan la cromatografía líquida acoplada con resonancia magnética nuclear para la determinación del orden de elución del naproxeno y sus enantiómeros.

Svennson y Karlsson¹² estudiaron la influencia del tamaño de poro para la separación enantiomérica en cromatografía líquida con microcolumnas. Kern¹³ y Pirkle y Welch¹⁴ realizaron una separación cromatográfica de los isómeros ópticos del naproxeno; posteriormente Pirkle y Welch¹⁵ mejoraron la fase estacionaria quiral y Welch y col.¹⁶ estudiaron los tiempos de retención en la separación enantiomérica.

Guttman y Cooke¹⁷ utilizan la electroforesis capilar para la separación cuantitativa de los enantiómeros del naproxeno y Fillet y col.¹⁸ desarrollan un método electroforético

-
6. M. Sinibaldi, M. Flieger, L. Cvak, A. Messina y A. Pichini. "Direct resolution of optically-active isomers on chiral packings containing ergoline skeletons. II. Enantioseparation of carboxylic acids". *J. Chromatogr.*, 666 (1994) 471.
 7. C. Petterson y C. Gioneli. "Improved resolution of enantiomers of naproxen by the simultaneous use of a chiral stationary phase and a chiral additive in the mobile phase". *J. Chromatogr.*, 435 (1988) 225.
 8. J.V. Andersen y S.H. Hansen. "Simultaneous determination of (R)-naproxen and (S)-naproxen and (R)-6-O-desmethylnaproxen and (S)-6-O-desmethylnaproxen by high-performance liquid chromatography on a chiral-AGP column". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 577 (1992) 362.
 9. T. Toyo'oka, M. Ishibashi y O. Terao. "Resolution of carboxylic acid enantiomers by high-performance liquid chromatography with highly sensitive laser-induced fluorescence detection". *J. Chromatogr.*, 625 (1992) 357.
 10. L. Castellani, M. Flieger y M. Sinibaldi. "Enantiomer separation of 2-arylpropionic acids on an ergot alkaloid-based stationary phase microbore column application". *J. Liq. Chromatogr.*, 17 (1994) 3695.
 11. R.W. Mortesen, O. Corcoran, C. Cornett, U.G. Sidelman, J. Troke, J.C. Lindon, J.K. Nicholson y S.H. Hansen. "LC-H-1 NMR used for determination of the elution order of S-naproxen glucuronide isomers in two isocratic reversed-phase LC-system". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2001) 477.
 12. L.A. Svennson y K.L. Karlsson. "Pore size influence in chiral packed column micro-LC". *J. Microcolumn Sep.*, 7 (1995) 231.
 13. J.R. Kern. "Chromatographic separation of the optical isomers of naproxen". *J. Chromatogr.*, 543 (1991) 355.
 14. W.H. Pirkle y C.J. Welch. "Chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers". *J. Liq. Chromatogr.*, 14 (1991) 3387.
 15. W.H. Pirkle y C.J. Welch. "An improved chiral stationary phase for the chromatographic separation of underivatized naproxen enantiomers". *J. Liq. Chromatogr.*, 15 (1992) 1947.
 16. C.J. Welch, T. Szczerba y S.R. Perrin. "Retention tuning in the enantioseparation of naproxen esters and free acid". *J. High Resolut. Chromatogr.*, 20 (1997) 179.
 17. A. Guttman y N. Cooke. "Practical aspects in chiral separation of pharmaceuticals by capillary electrophoresis. II. Quantitative separation of naproxen enantiomers". *J. Chromatogr.*, 685 (1994) 155.
 18. M. Fillet, L. Fotsing, J. Bonnard y J. Crommen. "Stereoselective determination of S-naproxen in tablets by capillary electrophoresis". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 18 (1998) 799.

estereoselectivo usando una mezcla de ciclodextrinas neutras y cargadas para la determinación del S-naproxeno.

Hanna y Laucam¹⁹ desarrollaron el único método espectroscópico que existe en la actualidad, para la determinación de la composición enantiomérica del naproxeno.

A la vista de estos datos se puede concluir que la mayoría son métodos cromatográficos, sin embargo, también existen métodos clásicos y los basados en técnicas electroquímicas, espectroscópicas, incluyendo la luminiscencia, y electroforéticas.

Dentro de las técnicas electroquímicas, existen valoraciones coulombimétricas²⁰, valoraciones oscilométricas²¹, métodos polarimétricos²² y cabe destacar la construcción de un electrodo selectivo para la determinación de naproxeno²³.

Dentro de los métodos cromatográficos, la cromatografía en capa fina y la cromatografía líquida de alta resolución son las más utilizadas, aunque también existen métodos por cromatografía de gases. Los métodos basados en cromatografía en capa fina se encuentran aplicados a muestras biológicas²⁴ y la cromatografía en capa fina de alta resolución a preparaciones farmacéuticas²⁵, además de con detección fluorimétrica²⁶.

Dentro de la cromatografía líquida de alta resolución existen gran variedad de métodos aplicados a muestras biológicas²⁷⁻⁴², en preparaciones farmacéuticas⁴³⁻⁴⁶.

-
19. G.M. Hanna y C.A. Laucam. "H-1-NMR spectroscopic method with chiral Eu(III) shift-reagent for the determination of the enantiomeric composition of naproxen". *J. AOAC Int.*, 75 (1992) 417.
 20. G. Kanoute, E. Nivaud, B. Paulet y P. Boucly. "Determination of derivatives of phenylpropionic acid having pharmacological activity by coulometry titration". *Talanta*, 31 (1984) 144.
 21. T. Pomazanska-Kolodziejska. "Application of oscillometry in pharmaceutical analysis. II. Oscillometric titration of naproxen and tolmetin". *Acta Pol. Pharm.*, 40 (1993) 357.
 22. G. Ceccarini y A.M. Maione. "Variations of optical-rotation of naproxen-polarimetric determination in the presence of nonchiral basic compounds". *J. Pharm. Sci.*, 78 (1989) 1053.
 23. G.N. Valsami, P.E. Macheras y M.A. Koupparis. "Construction of a naproxen ion-selective electrode and its application to pharmaceutical analysis". *Analyst*, 114 (1989) 387.
 24. E.M. Abdel-Moety, A.M. Al-Obaid, A.I. Jado y E.A. Lotfi. "Coupling of TLC and UV measurement for quantification of naproxen and its main metabolite in urine". *Eur. J. Drug Metab. Pharmacol.*, 13 (1988) 267.
 25. M.B. Lippstone y J. Sherma. "Analysis of tablets containing naproxen and ibuprofen by HPTLC with ultraviolet absorption densitometry". *J. Planar Chromatogr.-Mod. TLC*, 8 (1995) 427.
 26. U. Knie. "Fluorimetric determination of naproxen in the serum through direct quantitative high-performance thin-layer chromatography". *J. Chromatogr.*, 275 (1983) 463.
 27. M. Broquaire, V. Rovei y R. Braithwaite. "Quantitative-determination of naproxen in human plasma by a simple high-performance liquid-chromatographic method". *J. Chromatogr.*, 224 (1981) 43.

Morgan *y col.*⁴⁷ utilizaron cromatografía de fluidos supercríticos y Singh *y col.*⁴⁸ utilizaron cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gases con

28. J.W.A. Van Loenhout, A.A.M. Van Ginneken, H.C.J. Ketelaars, P.M. Kimenai, Y. Tan y F.W.J. Gribnau. "High-performance liquid-chromatography methods for quantitative determination of naproxen and [6-O-]-desmethylnaproxen in biological samples". *J. Liq. Chromatogr.*, 5 (1982) 549.
29. J.L. Shimek, N.G.S. Rao y S.K.W. Khalil. "An isocratic high-pressure liquid-chromatographic determination of naproxen and desmethylnaproxen in human-plasma". *J. Pharm. Sci.*, 71 (1982) 436.
30. A. Hoeylandskjaer y J. Aarbakke. "Improved microscale HPLC assay for naproxen plasma levels". *Acta Pharmacol. Toxicol.* 52 (1983) 78.
31. B. Levine y Y.H. Caplan. "Simultaneous liquid-chromatographic determination of five nonsteroidal anti-inflammatory drugs in plasma or blood". *Clin. Chem.*, 31 (1985) 346.
32. C.M. Moore y I.R. Tebbett. "Rapid extraction of anti-inflammatory drugs in whole blood for HPLC analysis". *Forensic Sci. Int.*, 34 (1987) 155.
33. J.H. Satterwhite y T.D. Boudinot. "High-performance liquid-chromatographic determination of ketaprofen and naproxen in rat plasma". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 431 (1988) 444.
34. P.J. Streete. "Rapid high-performance liquid-chromatographic methods for the determination of overdose concentrations of some non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma or serum". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 87 (1989) 179.
35. A.G. Kazemifard y D.E. Moore. "Liquid chromatography with amperometric detection for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in plasma". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 98 (1990) 125.
36. S. Wanwimolruk. "A simple isocratic high-performance liquid-chromatographic (HPLC) determination of naproxen in human plasma using microbore column technique". *J. Liquid Chromatogr.*, 13 (1990) 1611.
37. J.V. Andersen y S.H. Hansen. "Simultaneous quantitative-determination of naproxen, its metabolite 6-O-desmethylnaproxen and their 5 conjugates in plasma and urine samples by high-performance liquid-chromatography on dynamically modified silica". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 577 (1992) 325.
38. T.B. Vree, M. Vandenbergelaarmarte y C.P.W.G.M. Verweyvanwissen. "Determination of naproxen and its metabolite O-desmethylnaproxen with their acyl glucuronides in human plasma and urine by means of direct gradient high-performance liquid-chromatography". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 578 (1992) 239.
39. T. Karidas, A. Avgerinos y S. Malamataris. "Extractionless HPLC method for the determination of naproxen in human plasma and urine". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 2341.
40. J. Hermansson y A. Grahn. "Determination of drugs by direct injection of plasma into biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase". *J. Chromatogr.*, 660 (1994) 119.
41. R. Herráez Hernández, N.C. Van de Merbel y V.A.T. Brinkman. "Determination of the total concentration of highly protein-bound drugs in plasma by online dialysis and column liquid chromatography: application to non-steroidal anti-inflammatory drugs". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 666 (1995) 127.
42. L.L. Wang, S.J. Lu, P. Gao, H.X. Fu y S.B. Li. "HPLC analysis of naproxen and its ethylester on a β -cyclodextrin chiral column". *Fexi Ceshi Xuebao*, 16 (1997) 6.
43. B.M. Lampert y J.T. Stewart. "Determination of non-steroidal anti-inflammatory analgesics in solid dosages form by high-performance liquid chromatography on underivatized silica with aqueous mobile phase". *J. Chromatogr.*, 504 (1990) 381.
44. P. Mishra, S. Arif y A.K. Shakya. "Determination of naproxen in tablets by HPLC". *J. Inst. Chem.*, 51 (1993) 27.
45. L. Escuder Gilabert, Y. Martín Biosca, S. Sagrado, R.M. Villanueva Camanas y M.J. Medina Hernández. "Quality control of pharmaceuticals containing non-steroidal anti-inflammatory drugs by micellar liquid chromatography". *Chromatographia* 55 (2002) 283.
46. D.B. Moir, N. Beaulieu, N.M. Curran y E.G. Lovering. "Liquid-chromatographic determination of naproxen and related-compounds in raw-materials". *J. AOAC Int.*, 73 (1990) 902.
47. E.D. Morgan, H. Huang y I.D. Wilson. "Supercritical-fluid chromatography of polar compounds". *Anal. Proc.*, 28 (1991) 186.
48. A.K. Singh, Y. Jang, U. Mishra y K. Granley. "Simultaneous analysis of flunixin, naproxen, ethacrynic acid, indomethacin, phenylbutazone, mefenamic acid and thiosalicylic acid in plasma and urine by high-

espectrometría de masas. Amos *y col.*⁴⁹ aplican la cromatografía de gases con espectrometría de masas y de ionización de llama para la determinación de naproxeno. Mikani *y col.*⁵⁰ utilizaron la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación simultánea de varios principios activos en preparados farmacéuticos con detección UV (270 nm) y fluidos biológicos con detección fluorimétrica (excitación a 280 nm y emisión a 350 nm). Recientemente, Ahrer *y col.*⁵¹ han desarrollado un método para la determinación de residuos de fármacos en aguas de consumo combinando la cromatografía líquida de alta resolución con detección de masas con ionización por electrospray. La Farre *y col.*⁵² usan la cromatografía líquida con detección de masas e ionización por electrospray para la determinación de naproxeno, entre otros principios activos, en aguas superficiales y residuales y Ollers *y col.*⁵³ han desarrollado un método para la determinación simultánea de diferentes principios activos farmacológicos y pesticidas mediante cromatografía de gases con detección de masas obteniendo límites de detección entre 1 y 10 ng/L en aguas de consumo.

Dentro de las técnicas espectroscópicas existen una serie de métodos espectrofotométricos ya sean directos⁵⁴⁻⁵⁹, con primera y segunda derivada⁶⁰ o sólo con segunda derivada⁶¹.

-
- performance liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 568 (1991) 351.
49. B. Amos, L. Marple, J. Smithers y S.B. Matin. "Quantitative-determination of naproxen in formulated rat feed by gas chromatography-mass spectrometry and gas chromatography-flame-ionization detection". *J. Chromatogr.*, 206 (1981) 151.
50. E. Mikami, T. Goto, T. Ohno, H. Matsumoto y M. Nishida. "Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 23 (2000) 917.
51. W. Ahrer, E. Scherwenk y W. Buchberger. "Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 910 (2001) 69.
52. M. La Farre, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova y D. Barceló. "Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid-chromatography-mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*". *J. Chromatogr. A*, 938 (2001) 187.
53. S. Ollers, H.P. Singer, P. Fassler y S.R. Muller. "Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water". *J. Chromatogr. A*, 911 (2001) 225.
54. C.S.P. Sastry, A.R.M. Rao y D. Vijaya. "Spectrophotometric estimation of naproxen and its dosage forms". *Indian Drugs*, 24 (1986) 11.
55. C.S.P. Sastry, A.S.R.P. Tipirneni y M.V. Suryanarayana. "Micro-determination of enfenamic acid [N-phenethyl-anthranilic acid], piroxicam and naproxen in pharmaceuticals preparations". *Indian J. Pharm. Sci.*, 50 (1988) 293.

La espectrometría fluorescente ha sido empleada en la determinación del contenido de naproxeno en tabletas⁶² obteniendo un porcentaje de recuperación del 99.5% y un coeficiente de variación del 0.8%. Navalón y col.⁶³ usan la espectrofluorimetría con una calibración multivariante PLS para la determinación simultánea de naproxeno, ácido salicílico y ácido acetilsalicílico en fármacos y suero humano. La espectrofluorimetría sincrónica se ha utilizado para la determinación del contenido de naproxeno y diflunisal en suero⁶⁴ usando dos barridos a $\Delta\lambda=20$ y 110 nm, respectivamente. La espectrometría fluorescente con primera derivada sincrónica y ángulo variable no lineal⁶⁵ se ha usado para determinar la cantidad de salicilamida, salsalato y naproxeno simultáneamente en muestras de suero y orina. Mediante espectrometría fluorescente con segunda derivada sincrónica; Konstantianos y col.⁶⁶ determinaron simultáneamente naproxeno y su metabolito en suero humano con un porcentaje de recuperación del 99.6% y Konstantianos e Ioannou⁶⁷ determinaron simultáneamente naproxeno y ácido salicílico en suero humano, en primer lugar fueron determinados con $\Delta\lambda=130$ nm obteniéndose un porcentaje de recuperación entre 97-112% y con una desviación estándar relativa 2.9-5.5% y 3.8-5% y en segundo lugar

-
56. C.S.P. Sastry y A.R.M. Rao. "Spectrophotometric determination of some analgesic and anti-inflammatory agents with 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone hydrochloride". *Mikrochim. Acta*, I (1989) 237.
 57. C.S.P. Sastry, A.S.R. Prasad Tipirneni, M.V. Suryanarayana y M. Aruna. "Microdetermination of naproxen and its dosage forms". *Indian Drugs*, 26 (1989) 643.
 58. S. Tosunoglu. "Spectrophotometric determination of (S)-(+)-naproxen in tablets". *Acta Pharm. Turc.*, 31 (1989) 119.
 59. I.U. Khan, T. Amat, A. Ashraf y A.A. Kazi. "Spectrophotometric determination of naproxen in pure and pharmaceutical preparations". *Anal. Lett.*, 32 (1999) 2035.
 60. M.S. Mahrous, M.M. Abdel-Khalek y M.E. Abdel-Hamid. "Quantification of indomethacin, naproxen and ibuprofen in pharmaceutical dosage forms by first and second-derivative ultraviolet spectrometry". *J. Assoc. Off Anal. Chem.*, 68 (1985) 535.
 61. I. Panderi y M. Parissi-Poulou. "Second-derivative spectrophotometric determination of naproxen in the presence of its metabolite in human plasma". *Analyst*, 119 (1994) 697.
 62. H. Tang y K. Wang. "Determination of the content of naproxen sugar-coated tablets by fluorescence spectrometry". *Yaowu Fenxi Zazhi*, 10 (1990) 358.
 63. A. Navalón, R. Blanc, M. del Olmo y J.L. Vílchez. "Simultaneous determination of naproxen, salicylic acid and acetylsalicylic acid by spectrofluorimetry using partial least-squares (PLS) multivariate calibration". *Talanta*, 48 (1999) 469.
 64. T. Pérez-Ruiz, C.M. Lozano, V. Tomás y J. Carpena. "Sensitive synchronous spectrofluorimetric methods for the determination of naproxen and diflunisal in serum". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 361 (1998) 492.
 65. J.A. Murillo Pulgarín y L.F. Bermejo. "First-derivative non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of salicylamide, salsalate and naproxen in serum and urine". *Anal. Chim. Acta*, 373 (1998) 119.
 66. D.G. Konstantianos, P.C. Ioannou y E. Stratikos. "Simultaneous determination of naproxen and its desmethyl metabolite in human serum by second-derivative synchronous fluorescence spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 290 (1994) 34.
 67. D.G. Konstantianos y P.C. Ioannou. "Second-derivative synchronous fluorescence spectroscopy for the simultaneous determination of naproxen and salicylic acid in human serum". *Analyst*, 121 (1996) 909.

con $\Delta\lambda=60$ nm obteniéndose un porcentaje de recuperación del 97-105% con una desviación estándar de 1.2-6.7% y 2.1-2.3%.

Cline Love *y col.*⁶⁸ utilizaron la fosforescencia a temperatura ambiente en medio micelar (MS-RTP) y con ciclodextrinas (CD-RTP) para la determinación de naproxeno, trabajando en MS-RTP con unas longitudes de onda de 330 y 510-530 nm para la excitación y la emisión fosforescente, respectivamente. Rapado Martínez *y col.*⁶⁹ utilizaron la MS-RTP para la determinación de naproxeno y propranolol en preparados farmacéuticos, siendo las longitudes de onda de trabajo de 487 nm y 333 nm, para emisión y excitación, respectivamente. Panadero *y col.*⁷⁰ adoptaron este método a la metodología de flujo retenido trabajando a 510 y 330 nm.

Pérez-Ruiz *y col.*⁷¹ llevan a cabo la determinación de naproxeno, mediante fosforescencia a temperatura ambiente usando SDS como agente micelar y sulfito sódico como desoxigenante, en presencia de otros antiinflamatorios no esteroideos en suero y en orina, obteniendo un límite de detección de 0.03 $\mu\text{g/mL}$.

Arancibia y Escandar⁷² llevan a cabo la determinación de naproxeno mediante MS-RTP y CD-RTP usando y comparando diferentes medios organizados (β y γ - ciclodextrinas, Triton X-100 y SDS).

Segura Carretero *y col.*⁷³ desarrollaron una nueva metodología fosforescente denominada, fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados (HAI-RTP) pudiendo determinar el naproxeno fosforimétricamente a temperatura ambiente y en

-
68. L.J. Cline Love, M. Lynn Grayeski y J. Noroski. "Room-temperature phosphorescence, sensitized phosphorescence and fluorescence of licit and illicit drugs with organized media". *Anal.Chim. Acta*, 170 (1985) 3.
 69. I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camanas y M.C. García-Álvarez-Coque. "Micelle stabilized room-temperature phosphorimetric procedure for the determination of naproxen and propranolol in pharmaceutical preparations". *Analyst*, 119 (1994) 1093.
 70. S. Panadero, A. Gómez-Hens y D. Pérez-Bendito. "Fast determination of naproxen in serum by stopped-flow/room temperature liquid phosphorimetry". *Anal. Lett.*, 28 (1995) 1405.
 71. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás y J. Carpena. "Selective determination of naproxen in the presence of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in serum and urine samples using room temperature liquid phosphorimetry". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 17 (1998) 719.
 72. J.A. Arancibia y G.M. Escandar. "Determination of naproxen in pharmaceutical preparations by room-temperature phosphorescence. A comparative study of several organized media". *Analyst* 126 (2001) 917.
 73. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, B. Cañabate Díaz, J.F. Fernández Sánchez y A. Fernández Gutiérrez. "Heavy-atom induced room-temperature phosphorescence: A straightforward methodology for the determination of organic compounds in solution". *Anal. Chim. Acta*, 417 (2000) 19.

disolución, sin necesidad de usar ningún medio organizado, llegando a alcanzar con esta nueva metodología un límite de detección de 17 ng/mL. Esta nueva metodología fosforescente para la determinación de naproxeno se aplicó al análisis del mismo en la preparados farmacéuticos obteniendo un porcentaje de recuperación del 97% con una desviación estándar del 2%⁷⁴.

Se ha propuesto también un método quimiluminiscente para la determinación de naproxeno en preparados farmacéuticos⁷⁵, obteniendo un límite de detección de 15 ng/mL con una desviación estándar de 0.9%.

Dentro de los métodos electroforéticos hay que destacar el trabajo publicado por Soini y col.⁷⁶ en 1992 donde determinan naproxeno en suero mediante electroforesis capilar con detección ultravioleta (254 nm) y fluorescencia inducida por láser (LIF), excitando con un láser de He-Cd a 325 nm y midiendo la fluorescencia nativa del naproxeno a 375 nm, obteniendo límites de cuantificación de 0.1 pmol (UV) y 3fmol (LIF). En 1998, Albrecht y Thormann⁷⁷ proponen el primer método de cromatografía electrocinética micelar con detección por fluorescencia inducida por láser para la determinación de naproxeno en diferentes tejidos de seres vivos. En el año 2000, Sun y col.⁷⁸ publican la separación y el análisis cuantitativo del naproxeno mediante electroforesis capilar en fase reversa usando ciclodextrinas como medio organizado y Pedersen y Rasmussen⁷⁹ desarrollan un método electroforético previa extracción en fase sólida para la determinación diferentes principios activos de carácter ácido, entre ellos el naproxeno. A partir del año 2001, son bastantes los métodos electroforéticos desarrollados para la determinación de naproxeno en diferentes

-
74. A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M.I. Ramírez García, B. Cañabate Díaz y A. Fernández Gutiérrez. "Simple and rapid determination of the drug naproxen in pharmaceutical preparations by heavy atom-induced room temperature phosphorescence". *Talanta*, 50 (1999) 401.
 75. A. Campiglio. "Determination of naproxen with chemiluminescence detection". *Analyst*, 123 (1998) 1571.
 76. H. Soini, M.V. Novotny y M.L. Riekkola. "Determination of naproxen in serum by capillary electrophoresis with ultraviolet absorbance and laser-induced fluorescence detection". *J. Microcolumn Separations*, 4 (1992) 313.
 77. C. Albrecht y W. Thormann. "Determination of naproxen in liver and kidney tissues by electrokinetic capillary chromatography with laser-induced fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*, 802 (1998) 115.
 78. C.R. Sun, X.Y. Fu, J.D. Lu y Y.Z. Chen. "Chiral separation and quantitative analysis of naproxen by capillary electrophoresis". *Chinese J. Anal. Chem.*, 28 (2000) 1281.
 79. S. Pedersen Bjergaard y K.E. Rasmussen. "Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of acidic drugs". *Electrophoresis* 21 (2000) 579.

tipos de muestras usando detección de masas⁵¹, el modo de cromatografía capilar electrocinética micelar⁸⁰ o la isotacoforesis⁸¹⁻⁸³.

Como se puede observar de esta revisión bibliográfica, son muchos los artículos publicados para la determinación de naproxeno tanto en productos farmacéuticos como en fluidos biológicos. Esto demuestra la importancia de este analito en el control de procesos industriales y en el análisis médico y por ello, se procedió a establecer un optosensor fluorescente robusto, sencillo, fácil de usar, barato y, principalmente, automatizable que mejorara las características de los métodos propuestos anteriormente.

2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

2.1 Espectros del naproxeno en disolución

Para conocer los espectros de excitación y emisión fluorescente del naproxeno se preparó una disolución de 500 ng/mL de naproxeno en agua bidestilada. Los espectros obtenidos se pueden ver en la Figura II-2, en la que se observa que el naproxeno posee fluorescencia intrínseca, con tres máximos de excitación a 275, 318 y 332 nm y un máximo de emisión a 356 nm.

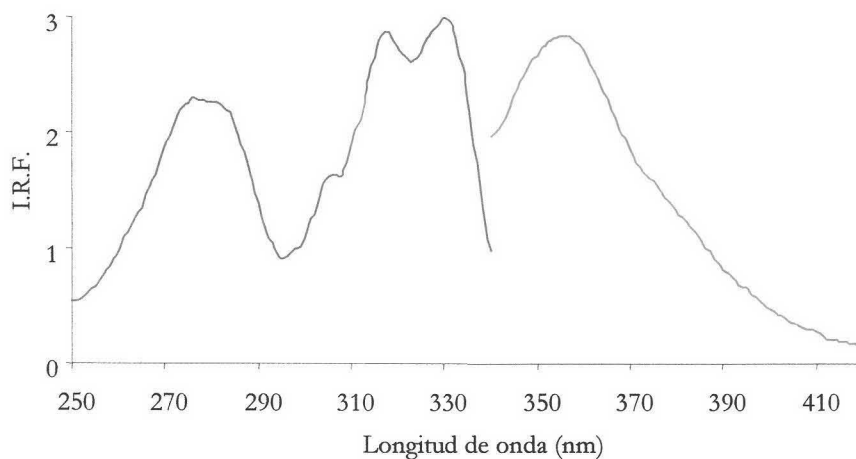


Figura II-2. Espectros de fluorescencia del naproxeno en disolución acuosa.

80. P.E. Mahuzier, B.J. Clark, A.J. Crumpton y K.D. Altria. "Quantitative microemulsion electrokinetic capillary chromatography analysis of formulated drug products". *J. Separation Sci.*, 24 (2001) 784.
81. A. Hercegova, J. Sadecka y J. Polonsky. "Determination of some antirheumatics by capillary isotachopheresis". *Electrophoresis* 21 (2000) 2842.
82. M. Cakrt, A. Hercegova, J. Lesko, J. Polonsky, J. Sadecka e I. Skacani. "Isotachopheresis determination of naproxen in the presence of its metabolite in human serum". *J. Chromatogr. A*, 916 (2001) 207.
83. J. Sadecka, M. Cakrt, A. Hercegova, J. Polonsky e I. Skacani. "Determination of ibuprofen and naproxen in tablets". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 25 (2001) 881.

2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina

La fase sensora es un elemento imprescindible en el diseño de un sensor de flujo ya que afecta a la selectividad, reproducibilidad y precisión del método analítico que se establezca. Por ello, se llevó a cabo un estudio pormenorizado y detallado sobre la elección de dicha fase sensora. Para ello se probaron once tipos de resinas:

- a) No iónicas: Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4, Amberlita XAD 7, Gel de Sílica Davisil y Gel de Sílica Merck.
- b) Aniónicas: Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8.
- c) Catiónicas: Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8.

Debido a que el pK_a del naproxeno es del orden de 4.7, la elección de la fase sensora se llevó a cabo dos valores de pH por debajo y por encima de dicho pK_a (2.5 y 10, respectivamente). Para ello a diferentes disoluciones portadoras y disoluciones de 100 ng/mL de naproxeno, se les ajustó el pH a los valores mencionados anteriormente con HCl o NaOH y se registró la diferencia entre la señal analítica y el ruido de fondo a una longitud de onda de excitación y emisión de 332/356 nm respectivamente, rendijas de 4 nm tanto para la excitación como para la emisión, voltaje a 600 V y a una resolución de 5 s (véase Figura II-3).

Como se observa en dicha figura y era lógico esperar, observando su estructura química, el NAP interacciona con las resinas aniónicas (por tener un grupo carbonilo) y con las resinas no iónicas (por trabajar a un pH inferior a su pK_a), aunque con la que aparece una mayor diferencia entre la señal y el ruido es con la resina no iónica Amberlita XAD 7 a pH inferior al pK_a del naproxeno.

Tras la selección del tipo de resina, se llevó a cabo el estudio del tamaño de partícula más apropiado de la misma para obtener buenas características analíticas. Para ello, la resina seleccionada se trituró en un mortero de ágata y se tamizó, obteniendo tres tamaños: entre 80 y 120, 120 y 160 μm y 160 y 200 μm . Tamaños inferiores a 80 μm no se probaron ya que favorecen la aparición de sobrepresiones en el sistema de flujo. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura II-4.

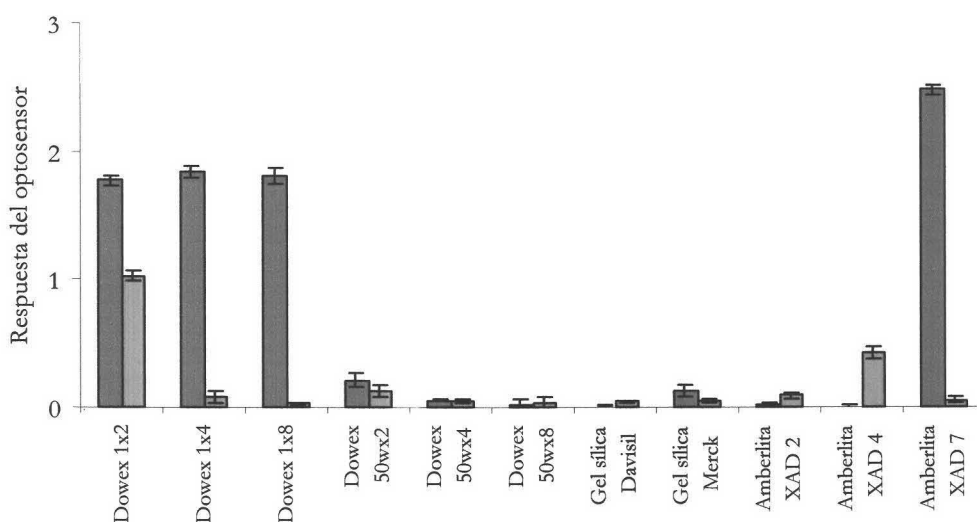


Figura II-3. Respuesta del optosensor con las diferentes fases sensoras estudiadas a ■ pH 2.5 y a ■ pH 10. [NAP]=100 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

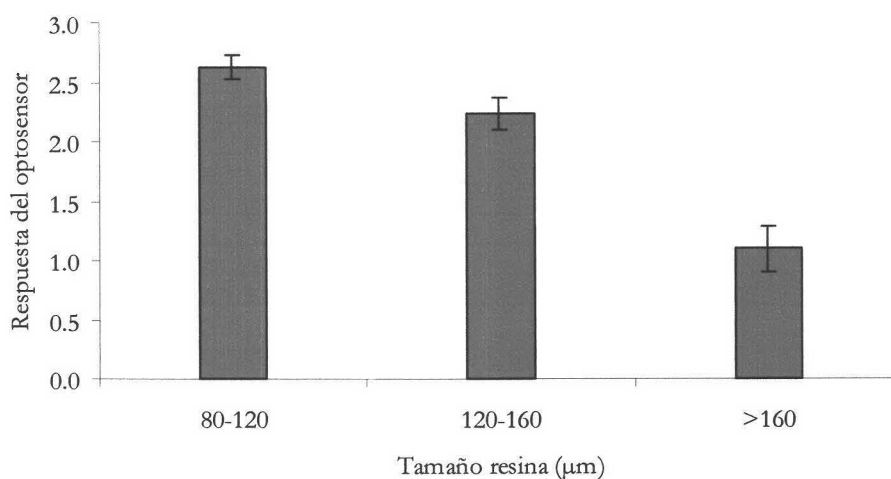


Figura II-4. Efecto del tamaño de partícula de la Amberlita XAD 7 en la respuesta del optosensor. [NAP]=100 ng/mL y pH=2.5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

Como se observa en la Figura II-4, la mayor diferencia entre la señal y el ruido se obtiene con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm , observándose diferencias significativas con respecto a los otros tamaños de partícula ensayados.

Por lo tanto, la fase sensora seleccionada para la obtención del optosensor de naproxeno ha sido Amberlita XAD 7 con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm .

Fase sensora: Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm .

2.3 Espectros del naproxeno en fase sólida

En el desarrollo de optosensores selectivos es necesario conocer las características espectroscópicas del analito soportado sobre la fase sensora seleccionada.

Para ello, una suspensión de la resina elegida en una disolución de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características fluorescentes del NAP soportado en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada a pH 2.5 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda del NAP, obteniendo las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión del analito en estudio (véase Figura II-5 a y b).

En la Figura II-5a se observa que el NAP se retiene ya que hay un aumento de la emisión fluorescente de la fase sensora, pero no se pueden determinar cuales son las longitudes de onda mas apropiadas para la medida de fluorescencia, por lo que se procedió a la eliminación mediante una substracción de la contribución de la fase sensora en los espectros obtenidos cuando en NAP estaba fijado. El resultado obtenido se muestra en la Figura II-6.

Se puede observar que las longitudes de onda de excitación y emisión para el naproxeno soportado en la fase sensora son 334 y 354 nm respectivamente, valores que no difieren significativamente con las longitudes de onda del NAP en disolución.

Para el resto del trabajo experimental las longitudes de onda elegidas han sido:

$$\lambda_{\text{exc/em}} = 334/354 \text{ nm}$$

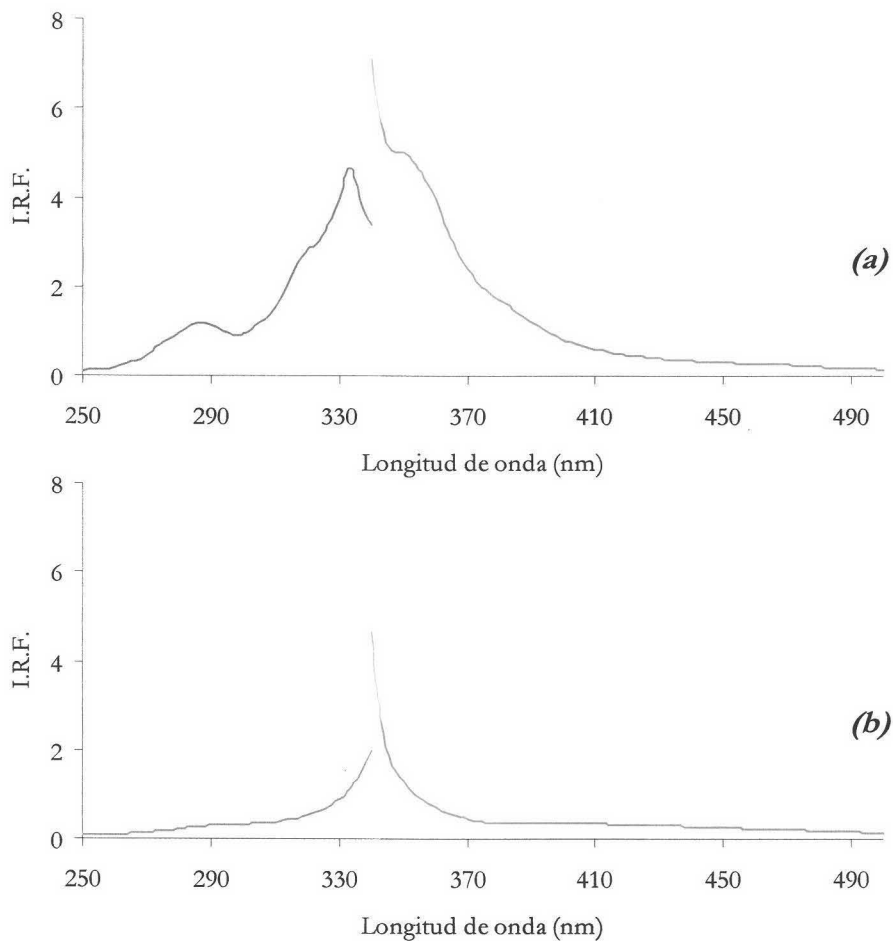


Figura II-5. Espectros de excitación y emisión de a) NAP soportado en Amberlita XAD 7 y b) Amberlita XAD 7 a $\lambda_{exc/em}$ del NAP. [NAP]=100 ng/mL, pH=2.5 (fijado con HCl). Voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

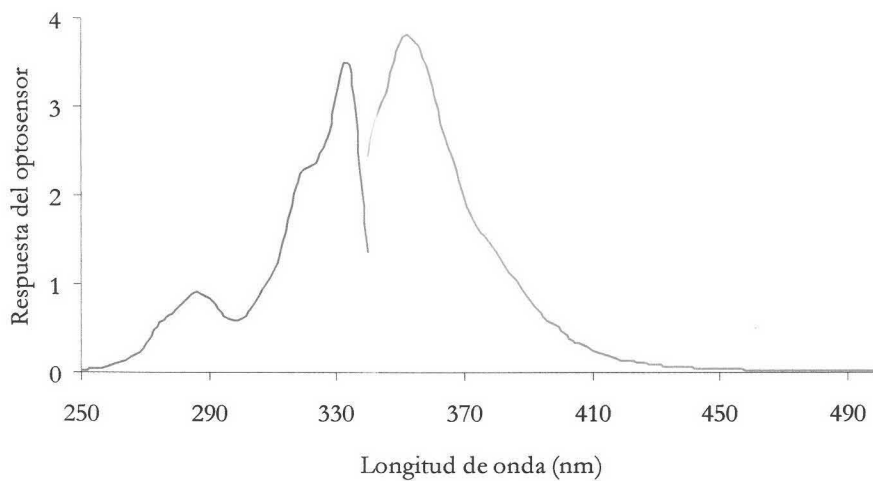


Figura II-6. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del NAP soportado en Amberlita XAD 7 y esta fase sensora a los máximos del analito.

2.4 Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

El sistema FIA propuesto, si bien ha sido descrito en la introducción y en la parte experimental, presenta una serie de particularidades propias del sistema en estudio. Concretamente consta de (véase Figura II-7):

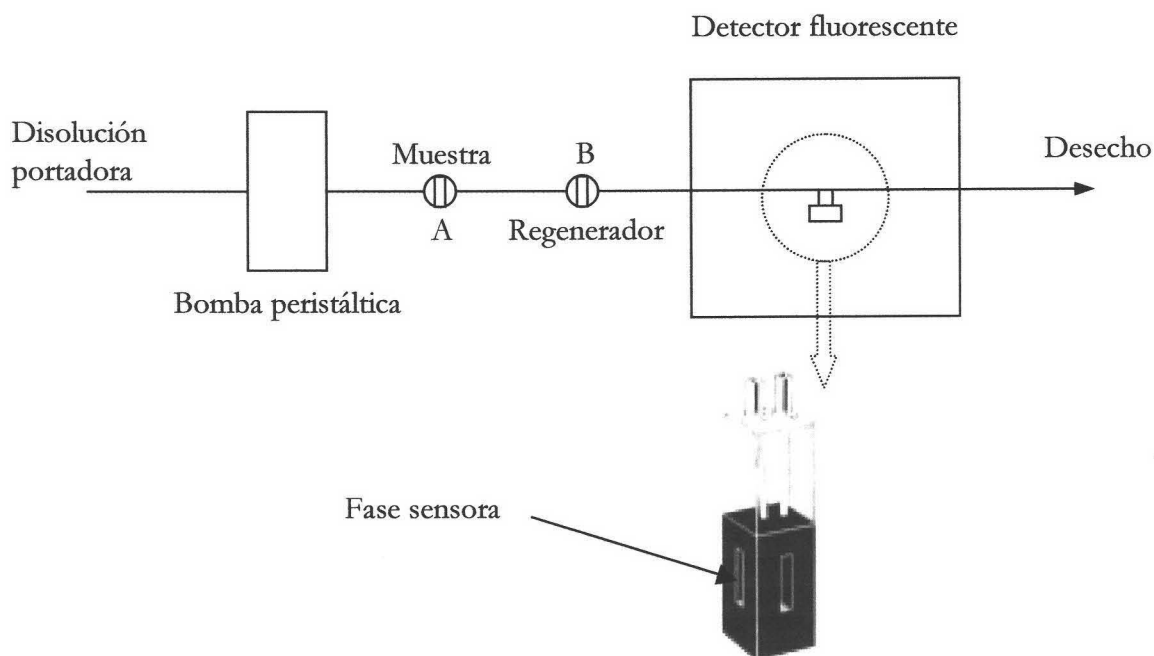


Figura II-7. Sistema de flujo utilizado.

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen conocido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta la fase sensora

seleccionada (Amberlita XAD 7) y colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro.

2.5 Elección de la disolución regenerante

La interacción entre el NAP y la fase sensora es irreversible en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas y, por tanto, es necesario el uso de una disolución regenerante que permita reutilizar el sensor.

A un pH de 2.5, inferior a su pK_a , el NAP se encuentra protonado y por tanto interacciona con una resina no iónica, por lo que cabría esperar que se pudiera utilizar como disolución regenerante una base fuerte. Por ello, se ensayó NaOH a diferentes concentraciones (1, 2, 4 y 8 M) observando una disminución en la emisión fluorescente mientras el bolo de NaOH atravesaba la fase sensora recuperándose después la misma señal, lo que significaba que la emisión fluorescente se veía influida por el pH pero el NAP no se eluía de la fase sensora.

Al no conseguir resultados positivos usando bases fuertes, se ensayaron ácidos concentrados (HCl 6M, HNO₃ 6M y H₂SO₄ 6M) observándose en todos los casos un aumento de la señal fluorescente del NAP retenido cuando el bolo de medio ácido atravesaba la fase sensora recuperándose de nuevo la señal original, lo que indicaba, al igual que el caso del uso de bases fuertes, que el NAP no se había eluido de la resina.

Por último, se estudió el efecto de diferentes disolventes orgánicos miscibles con agua (metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol y acetona) sobre el NAP retenido en la fase sensora. Observándose que, en todos los casos, un cambio brusco de la constante dieléctrica produce una buena regeneración de la fase sensora (véase Figura II-8).

Para elegir la disolución regenerante adecuada se tuvo en cuenta la repetibilidad del sistema. Para ello se llevaron a cabo 3 réplicas para cada uno de los regeneradores, inyectando 2 mL de una disolución de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5. Como se puede observar en la Figura II-8, el disolvente orgánico que proporciona una mayor repetibilidad de la señal fluorescente es el acetonitrilo y, por tanto, fue seleccionado como agente regenerante.

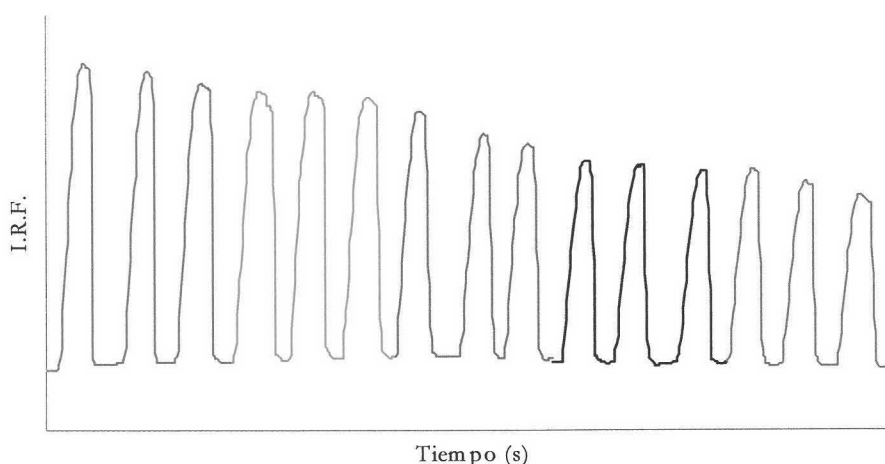


Figura II-8. Regeneración de la fase sensora con disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol y acetona). [NAP]=100 ng/mL. pH 2.5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Además, se llevó a cabo un estudio del porcentaje mínimo de acetonitrilo, que era necesario utilizar en la disolución regenerante, comprobando que, en porcentajes inferiores al 80% v/v de acetonitrilo-agua, el sistema dejaba de ser repetitivo (véase Figura II-9). Por ello, se usó una disolución de acetonitrilo en agua al 80% v/v en el resto del trabajo experimental como sistema de regeneración.

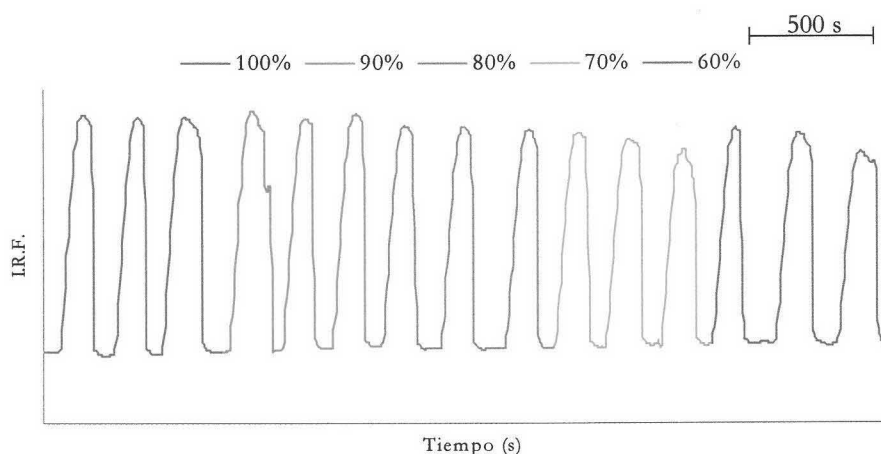


Figura II-9. Porcentaje de acetonitrilo en la disolución regeneradora. [NAP]=100 ng/mL. pH=2.5 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

En todos los casos se usó un volumen de disolución regenerante de 250 μ L.

Regenerador: Acetonitrilo/H₂O 80% v/v

2.6 Optimización de los parámetros instrumentales

Seleccionada la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y la disolución regenerante, se procedió, a continuación, a estudiar los parámetros instrumentales del equipo de medida con objeto de mejorar la diferencia señal-ruido y por tanto, las características analíticas del optosensor propuesto. Los parámetros instrumentales optimizados han sido: voltaje aplicado al detector, rendijas de los monocromadores de excitación y emisión y la resolución de las medidas del instrumento.

2.6.1 Voltaje del detector

El primer parámetro instrumental estudiado fue el voltaje que se le aplica al fotomultiplicador. Este parámetro afecta tanto a la sensibilidad de la señal analítica como a la repetibilidad de la misma.

Para optimizar este parámetro se inyectó una muestra de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5 fijado con HCl, obteniéndose el diagrama conforme se variaba el voltaje del detector, realizando en todos los casos 3 réplicas a las condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm; rendijas de excitación y emisión de 4 nm; resolución 5 s; velocidad de flujo 2 mL/min y volumen de muestra inyectado 2 mL. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II-10.

Como se observa en esta figura, un aumento del voltaje del detector provoca un aumento de la respuesta del optosensor. Además provoca un aumento del error de la medida, aunque este error no es en ningún caso lo suficientemente elevado como para tenerlo en cuenta a la hora de seleccionar el voltaje óptimo. Por tanto, y buscando la mayor diferencia entre la señal analítica y el ruido, se seleccionó un voltaje de 600 V para el resto de trabajo experimental. Voltajes superiores no se pueden usar ya que el detector se satura.

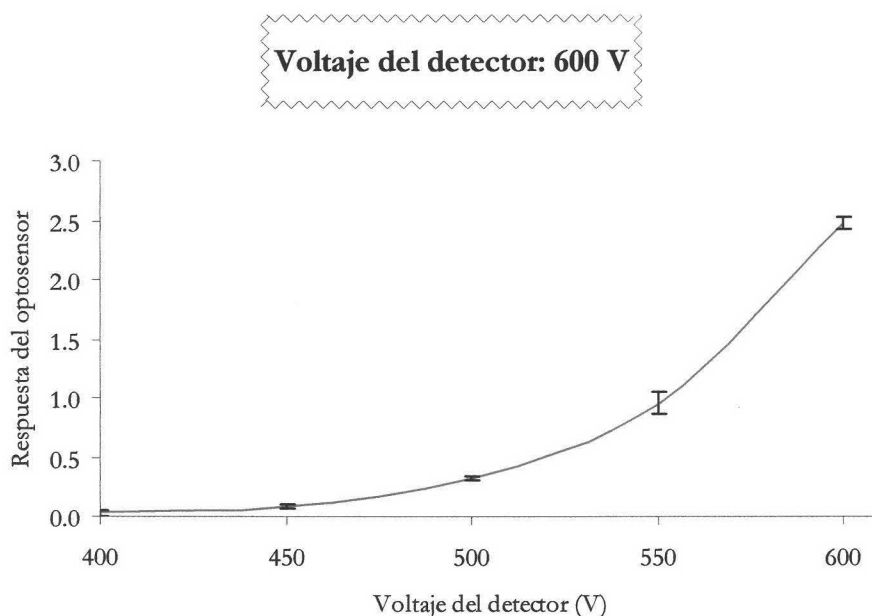


Figura II-10. Influencia del voltaje del detector en la respuesta del optosensor. [NAP]=100 ng/mL.

2.6.2 Ancho de rendija

La apertura de las rendijas de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre el analito soportado en la fase sensora y por tanto, sobre la intensidad de emisión de éste. La apertura de la rendija de emisión influye sobre la cantidad de luz que llega al detector. Los valores de ambas rendijas en el equipo instrumental utilizado pueden adquirir los valores que oscilan entre 0.5 y 16 nm, tanto para la rendija de excitación como la de emisión.

Para estudiar el efecto de la anchura de las rendijas sobre la respuesta del optosensor se inyectó en el sistema de flujo una muestra de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5 y se fijaron el resto de los parámetros instrumentales a los valores óptimos ya establecidos variando la anchura de las rendijas y barriendo todas las posibilidades. Se realizaron tres réplicas para cada una de las anchuras de rendijas ensayadas y el estudio se encuentra reflejado en la Figura II-11.

Como se observa en la figura, un aumento de la anchura de las rendijas provoca un aumento de la señal analítica, obteniéndose la mayor diferencia señal-ruido con un error adecuado para el método propuesto cuando la anchura de las rendijas es de 4 nm tanto

para la excitación como para la emisión. Aperturas mayores de rendija a las seleccionadas no se pueden estudiar ya que saturan el detector.

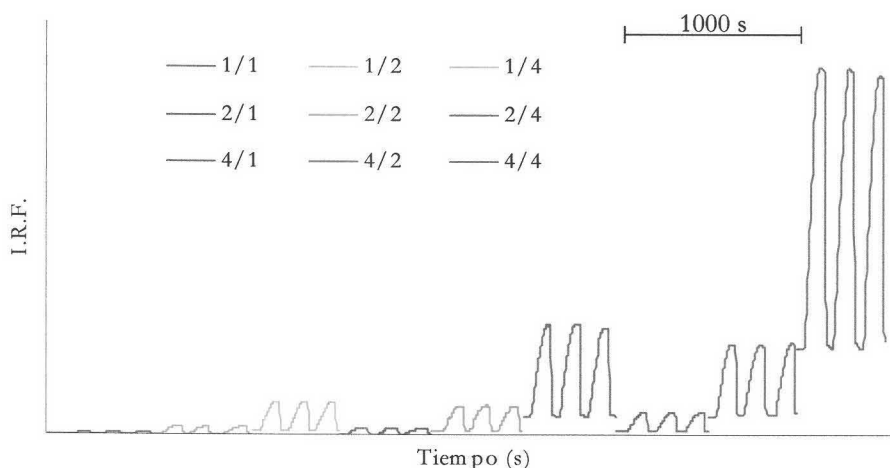


Figura II-11. Figrama del efecto del ancho de rendija. $[NAP]=100$ ng/mL. $pH=2.5$ fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Ancho de rendijas_{exc/em}: 4/4 nm

2.6.3 Resolución

La resolución es el tiempo que transcurre entre las medidas realizadas por el instrumento y afecta a la forma y definición de los figramas y a la repetibilidad de la respuesta del optosensor. Para ver la influencia de la resolución sobre estos parámetros se inyectó en el sistema una muestra de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5 y se fijaron los parámetros instrumentales a las condiciones óptimas establecidas variando la resolución del equipo. El estudio se encuentra reflejado en la Figura II-12.

Como se observa en la figura, la resolución no afecta a la respuesta del optosensor, por lo que para tener un número significativo de puntos en la medida de cada muestra analizada y definir adecuadamente los picos de los figramas, se fijó una resolución de 5 s.

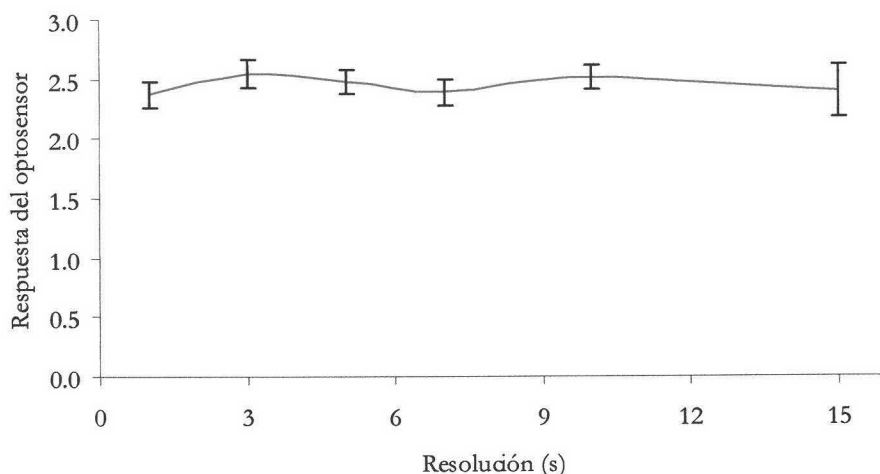


Figura II-12. Influencia de la resolución del equipo en la respuesta del optosensor. $[NAP]=100\text{ ng/mL}$. $pH=2.5$ fijado con HCl . $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Resolución: 5 s

2.7 Optimización de las variables experimentales

Establecidos los parámetros instrumentales, se procedió a estudiar la influencia de las variables experimentales para establecer los valores óptimos de las variables químicas que afectan al optosensor propuesto. Las variables estudiadas han sido: pH y tipo y concentración de disolución reguladora.

2.7.1 Influencia del pH

El pH afecta tanto a la fluorescencia intrínseca del NAP, ya que tiene grupos desprotonizables, como a la interacción del NAP con la fase sensora.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones portadoras y de muestras de 100 ng/mL de NAP, con pHs comprendidos entre 2.0 y 10.5 ajustados con HCl o NaOH. Se realizaron 3 réplicas para cada muestra medida y los resultados obtenidos se muestran en la Figura II-13.

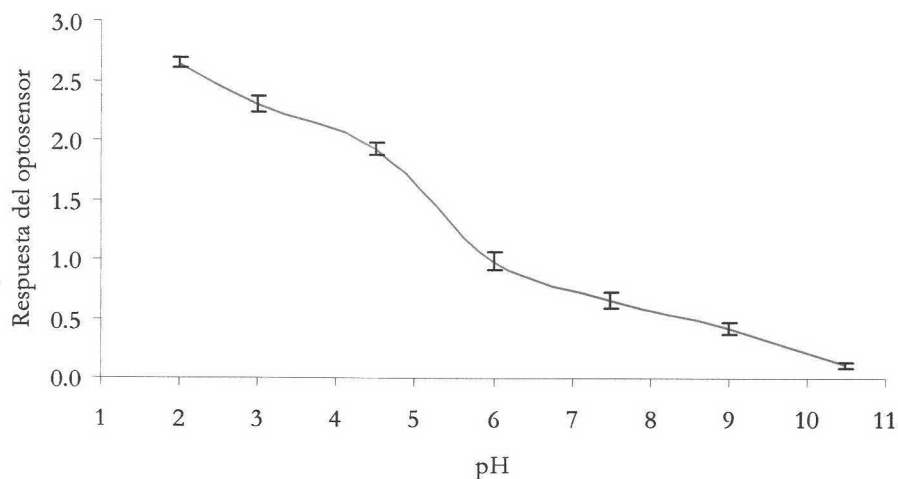


Figura II-13. Influencia del pH en la respuesta del optosensor. $[NAP]=100$ ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Se observa en dicha figura que la mayor diferencia señal-ruido se obtiene a pHs ácidos. Teniendo en cuenta que es necesario el uso de una disolución reguladora habitual que fije tanto el pH como la fuerza iónica del sistema, se fijó un pH de trabajo de 2.5, ya que a pHs inferiores no se dispone de disoluciones reguladoras habituales.

pH: 2.5

2.7.2 Tipo y concentración de la disolución reguladora

Es necesario elegir una disolución reguladora que fije el pH y la fuerza iónica del medio. Por ello, se estudió el efecto que producían sobre la diferencia señal-ruido el uso de diferentes disoluciones reguladoras habituales disponibles al pH de trabajo. Las disoluciones ensayadas fueron: glicina/HCl y fralato ácido de potasio/HCl.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones portadoras y muestras de 100 ng/mL de NAP a pH 2.5 a una concentración de 15 mM de cada una de las disoluciones reguladoras estudiadas, y se registró la variación de la respuesta del optosensor

y del error de las medidas a las condiciones instrumentales óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II-14.

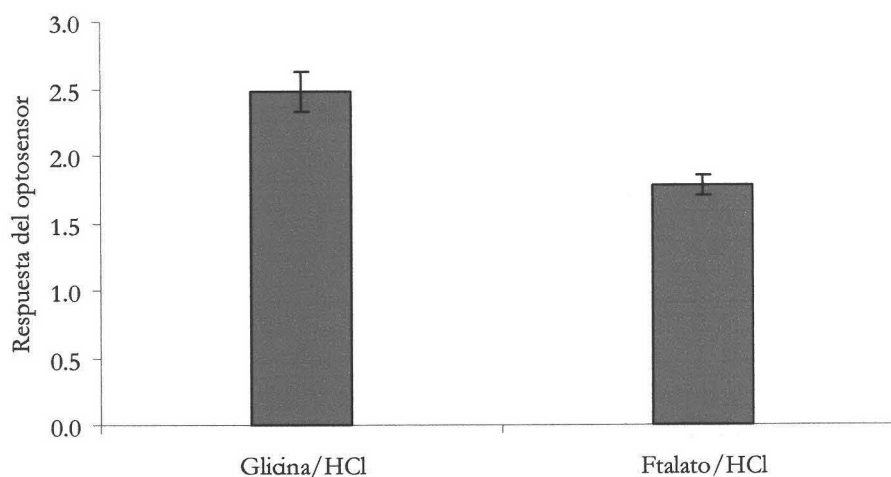


Figura II-14. Efecto del tipo de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. $[NAP]=100$ ng/mL. $pH=2.5$. HCl. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

En esta figura, se observa que la respuesta del optosensor es mayor cuando se usa como disolución reguladora glicina/HCl, por lo que se seleccionó ésta como disolución reguladora.

Disolución reguladora: Glicina/HCl

Una vez seleccionado el tipo de disolución reguladora, es necesario fijar la concentración óptima para que la fuerza iónica de la disolución portadora y las muestras sea la misma.

Diferentes concentraciones de disolución reguladora de glicina/HCl de pH 2.5 adicionadas al portador y las muestras, simultáneamente, fueron ensayadas, registrando tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura II-15.

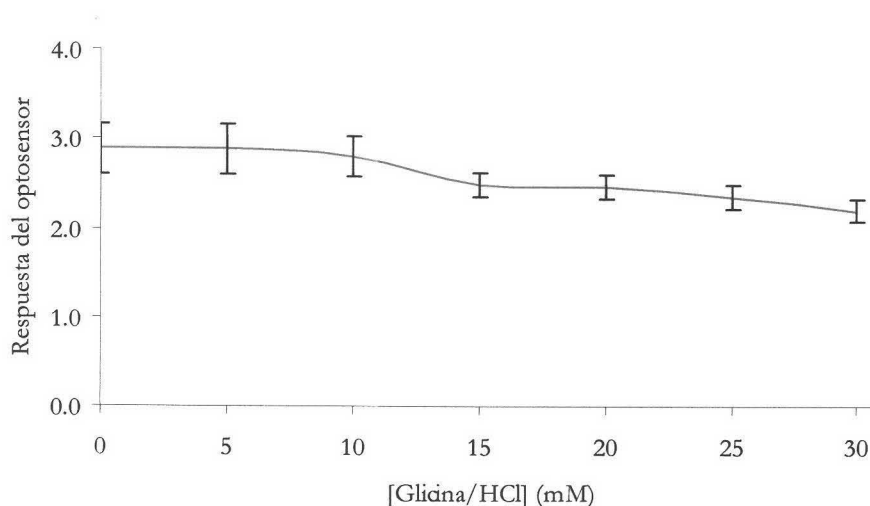


Figura II-15. Influencia de la concentración de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. $[NAP]=100$ ng/mL, disolución reguladora empleada glicina/HCl a pH 2.5. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, 3 inyecciones de muestra de volumen 2 mL.

Como se puede observar en esta figura, la concentración de la disolución reguladora afecta, sobre todo, a la repetibilidad de las medidas, de modo que un aumento de la fuerza iónica de la disolución portadora y de las muestras disminuye el error en las medidas del optosensor. Es por ello, por lo se ha seleccionado una concentración de disolución reguladora de 15 mM.

[Glicina/HCl]: 15 mM

2.8 Optimización de las variables de flujo

Estudiados los parámetros instrumentales y variables experimentales, se procedió al estudio de las variables que afectan al sistema de flujo. Concretamente las variables más importantes son: velocidad de flujo y volumen de inyección de muestra.

2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo

Para que tenga lugar la emisión fluorescente del NAP en la fase sólida es necesario que el analito que pasa a través de la resina quede retenido durante un tiempo. Este

proceso, al ser de naturaleza cinética, está determinado por la velocidad a la que pasa el portador arrastrando al analito, afectando a la respuesta final del optosensor. Además lógicamente también influye sobre el tiempo de respuesta del mismo.

Para evaluar dicha influencia se varió la velocidad de flujo del portador, en las condiciones óptimas anteriormente fijadas, realizando sucesivas inyecciones de una disolución de 100 ng/mL de NAP y registrándose la intensidad de fluorescencia y el tiempo de respuesta para cada flujo. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura II-16.

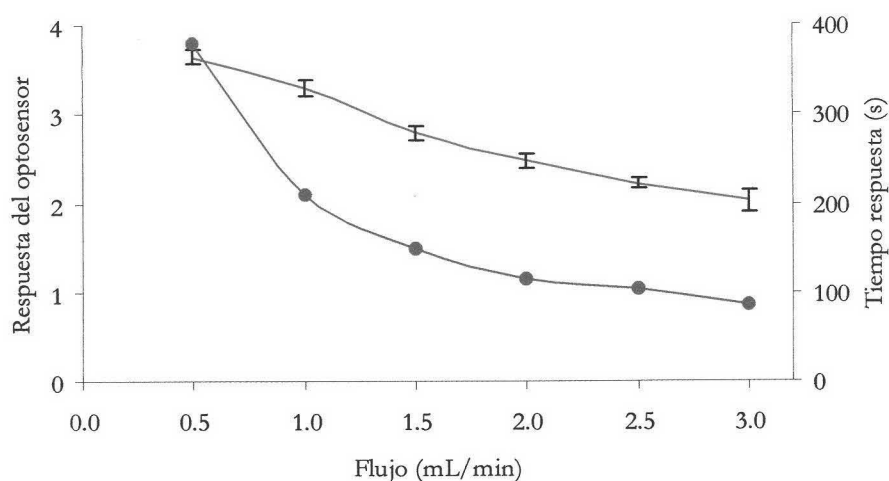


Figura II-16. Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta (● tiempo de respuesta). [NAP]=100 ng/mL. [glicina/HCl a pH=2.5] 15 mM. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Volumen de muestra inyectado 2 mL.

Como se observa en la figura a velocidades de flujo pequeñas, se consigue una mayor respuesta a costa de mayores tiempos y viceversa. Por tanto, se adoptó una solución de compromiso entre una respuesta útil y un tiempo favorable, eligiendo como velocidad de flujo óptima la de 2.0 mL/min.

Velocidad de flujo: 2.0 mL/min

2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra

El volumen de inyección de muestra afecta a la respuesta del optosensor y al tiempo de respuesta. Para investigar dicha influencia, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección del analito (válvula A) y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 100 ng/mL de NAP, registrándose la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta para cada volumen inyectado (véase Figura II-17).

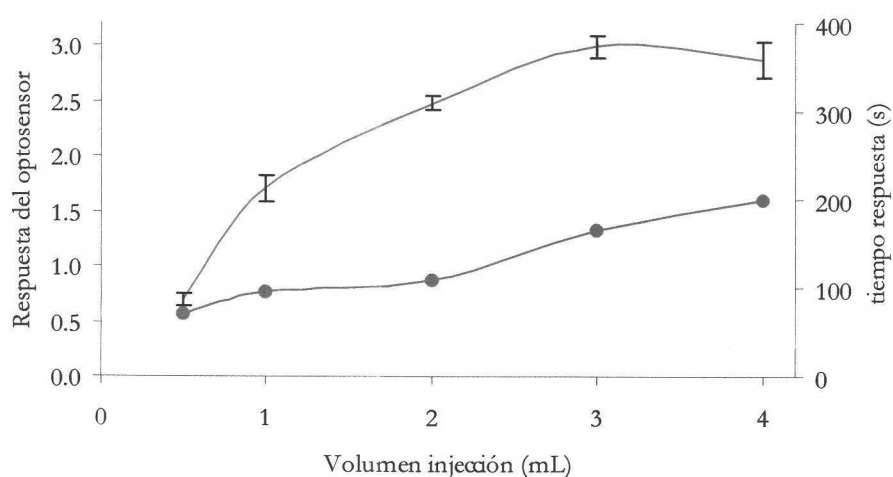


Figura II-17. Efecto del volumen de inyección de muestra en la respuesta del optosensor y el tiempo de respuesta (● tiempo de respuesta).
 [NAP]=100 ng/mL. [glicina/HCl a pH=2.5] 15 mM. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min.

Como se puede observar, un aumento del volumen de inyección de muestra provoca un aumento considerable de la respuesta del optosensor y del tiempo de respuesta. Se eligió un volumen de inyección de muestra óptimo de 2.0 mL.

Volumen de inyección de muestra: 2.0 mL

2.9 Efecto de la temperatura

La emisión fluorescente, como todos los fenómenos luminiscentes, se ve afectada por cambios en la temperatura. Además, la temperatura también puede afectar a la interacción entre el analito y la fase sensora. Por ello, se realizó un estudio de la influencia de la misma sobre la respuesta del optosensor de naproxeno propuesto.

Para ello, se preparó una disolución portadora y una muestra de 100 ng/mL de NAP en las condiciones experimentales óptimas anteriormente comentadas ([glicina/HCl a pH 2.5]=15 mM) y se registró la señal fluorescente en las condiciones instrumentales óptimas ($\lambda_{exc/em}$ =334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s) mientras el sistema circulaba con una velocidad de flujo de 2.0 mL/min inyectando 3 réplicas de 2 mL de muestra para cada una de las temperaturas estudiadas.

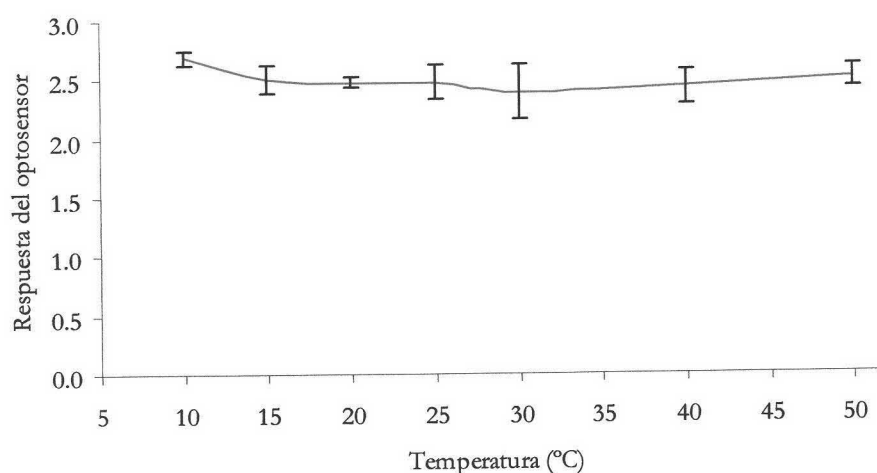


Figura II-18. Influencia de la temperatura en el optosensor de NAP. [NAP]=100 ng/mL. [glicina/HCl a pH=2.5] 15 mM. $\lambda_{exc/em}$ 334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Como se observa en la Figura II-18, el optosensor de naproxeno propuesto no se ve influenciado por la temperatura y responde de igual forma en, al menos, el rango de temperaturas estudiado. Por lo que no fue necesario termostatar el compartimento de muestra del espectroluminómetro.

3 Características analíticas del método

Una vez seleccionada la fase sensora y la disolución regeneradora, optimizados los parámetros instrumentales y variables experimentales y FIA, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, la recta de calibrado y los parámetros de fiabilidad, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*⁸⁴.

3.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de naproxeno en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 en una concentración de 15 mM). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: $\lambda_{\text{exc/em}}=334/354$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de naproxeno preparadas, regenerando la fase sensora con 250 μL de acetonitrilo/ H_2O al 80% v/v después de cada inyección de muestra.

3.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de NAP, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla II-1 se muestran los datos obtenidos de la recta de calibrado y en la Figura II-19 la influencia de la concentración de NAP sobre la respuesta del optosensor.

84. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.

Tabla II-1. Réplicas de la recta de calibrado

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	1.033	1.050	1.009
100	2.393	2.458	2.316
150	3.321	3.418	3.319
200	4.349	4.259	4.207

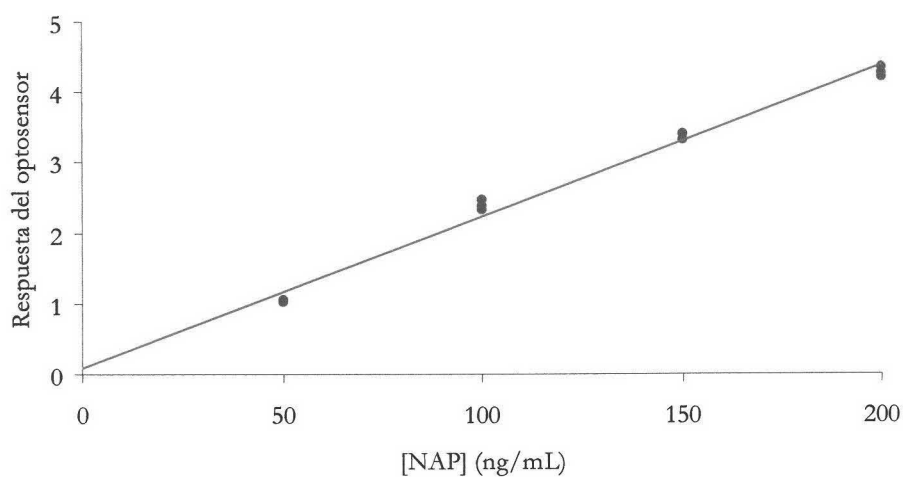


Figura II-19. Curva de calibrado del optosensor de naproxeno.

3.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$.

La Tabla II-2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla II-2. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0106
Límite de detección (ng/mL)	1.5
Límite de cuantificación (ng/mL)	5.0
Rango dinámico lineal (ng/mL)	1.5-200.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrado, reflejados en la Tabla II-3.

Tabla II-3. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0893
Desviación estándar (s_a)	0.0980
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	109.3
Pendiente (b)	0.0214
Desviación estándar (s_b)	0.0007
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	3.3
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.1381
Coefficiente de correlación (r)	0.9945
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	98.9

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) tanto de los blancos

como de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado, respectivamente. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla II-4.

Tabla II-4. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
50	5.0
100	4.2
150	4.3
200	4.8

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla II-5.

Tabla II-5. Parámetros de fiabilidad según el método de Cuadros y col.

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	96.7	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	6.5	
Límite de detección (ng/mL)	18.5	
Límite de cuantificación (ng/mL)	61.6	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	18.5-200.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	11.3
	100 ng/mL	3.9
	150 ng/mL	2.8
	200 ng/mL	2.5

4 Aplicaciones del método propuesto

El naproxeno es un principio activo presente en multitud de medicamentos con propiedades antiinflamatorias y analgésicas, entre otras, por lo que se ha aplicado el optosensor propuesto a la determinación de naproxeno en dos fármacos comerciales (Naprosyn 500 mg y Antalgin 550 mg; de los laboratorios Roche) y a la determinación de naproxeno libre excretado por vía urinaria tras la ingesta de Antalgin 550 mg.

4.1 Determinación de naproxeno en preparados farmacéuticos

El Naprosyn 500 mg es un fármaco comercializado en España por los laboratorios Roche S.A. que se presenta en un envase de 40 comprimidos ranurados y se emplea en el tratamiento de los procesos inflamatorios, dolorosos, de las articulaciones, músculos, tendones y ligamentos, tales como artritis reumatoide, artrosis y espondilitis anquilosante. También se usa en ataques agudos de gota y en el tratamiento del dolor menstrual. La composición especificada por el fabricante por comprimido es: Naproxeno (D.C.I.) 500 mg, polivinilpirrolidona K-90, croscarmelosa sódica, óxido de hierro (E-172) y estearato magnésico.

El Antalgin 550 mg es un fármaco comercializado en España por los laboratorios Roche S.A. que se presenta en envases de 10 y 40 comprimidos y se emplea en el tratamiento del dolor leve o moderado con componente inflamatorio, específicamente de origen osteomuscular, artrosis reumatoide, osteoartritis, episodios agudos de gota, espondilitis anquilosante, síndromes reumatoides, dolores muscoesqueléticos, dismenorrea, tratamiento sistemático de las crisis agudas de migraña y menorragia primaria y secundaria a un dispositivo intrauterino. La composición especificada por el fabricante por comprimido es: Naproxeno (D.C.I.) sódico 550 mg, celulosa microcristalina, polivinilpirrolidona, talco, estearato magnésico, hidroxipropil metilcelulosa, polietilenglicol, dióxido de titanio (E-171), laca de indigotina (E-132) y agua purificada.

4.1.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para una concentración de naproxeno de 100 ng/mL, valor que está dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 5 comprimidos, se pesaron (siendo el peso medio por comprimido de 540 mg para el Naprosyn 500 mg y 787.4 mg para el Antalgin 550 mg), se trituraron y homogeneizaron y se tomaron 2.7 mg del polvo del Naprosyn y 3.6 mg del polvo del Antalgin que se diluyeron a 100 mL con agua bidestilada. Se tomó la cantidad adecuada de cada disolución muestra para tener una concentración de NAP de 100 ng/mL y se le añadió la cantidad adecuada de disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 para que tuviese una concentración de 15 mM y se enrasó con agua bidestilada.

Se realizaron 7 réplicas para cada medicamento llevando a cabo el registro de la intensidad de fluorescencia a las condiciones instrumentales óptimas: $\lambda_{exc/em}$ =334/354 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; con una velocidad de flujo de 2.0 mL/min e inyectando 2 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas II-6 y II-7.

Tabla II-6. Datos de réplicas en el análisis de naproxeno en Naprosyn 500 mg

Muestra	Valor nominal declarado (mg/comprimido)	Valor encontrado (mg/comprimido)	% Recuperación
1	500	533.5	106.7
2	500	495.4	99.1
7	500	490.4	98.1
4	500	487.4	97.5
5	500	498.6	99.7
6	500	487.2	97.4
7	500	489.3	97.9
Media	500	497.4	99.5
D.E.R. (%)	-	-	3.3

Tabla II-7. Datos de réplicas en el análisis de naproxeno en Antalgin 550 mg

Muestra	Valor nominal declarado (mg/comprimido)	Valor encontrado (mg/comprimido)	% Recuperación
1	550	565.0	102.7
2	550	585.5	106.5
3	550	573.0	104.2
4	550	542.3	98.6
5	550	543.3	98.8
6	550	546.3	99.3
7	550	529.6	96.3
Media	550	555.0	100.9
D.E.R. (%)	-	-	3.6

4.2 Determinación de naproxeno en muestras de orina

Para aumentar la aplicabilidad del optosensor propuesto, se llevó a cabo la determinación de naproxeno libre excretado vía urinaria tras la ingesta de un medicamento que lo contenga como principio activo.

4.2.1 Procedimiento operatorio

La orina de 24 horas, de una voluntaria de 30 años que había ingerido un comprimido de Antalgin 550 mg fue recogida en botes de polietileno esterilizados cuyo contenido fue inmediatamente centrifugado a 3700 r.p.m. durante 15 min y decantados. Posteriormente fueron congelados y conservados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. En todo momento se siguieron las directrices recomendadas por la Comisión para la Investigación de los Riesgos para la Salud de los Compuestos Químicos en el Área de Trabajo⁸⁵.

Siguiendo las indicaciones de la bibliografía consultada y que indicaba que el naproxeno se excretaba en un 95% inalterado o como sus metabolitos⁸⁶, que el volumen

85. J. Angerer y K.H. Schaller. "Analyses of hazardous substances in biological materials". Vol. 1, VCH, Weinheim, 1992.

86. V-I Vademecum Internacional. (1999). Páginas 1324-1325.

total de orina recolectado en 24 h fue de 1.2 L y que la voluntaria había ingerido 550 mg de naproxeno, se tomó una alícuota de 23.7 μ L de orina, se le añadió la cantidad correspondiente de disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 para que la concentración final fuera de 15 mM y se enrasó con agua bidestilada en un matraz de 100 mL. Esta dilución de orina se realizó para que la muestra tuviese una concentración de NAP que estuviera dentro del intervalo lineal.

4.2.2 Estudio del efecto matriz y determinación directa del naproxeno en orina

En primer lugar se llevó a cabo un estudio del efecto matriz de la orina. Para ello, se tomó una muestra de orina antes de ingerir el fármaco, se centrifugó a 3700 r.p.m. durante 15 min, se decantó y se llevó a cabo el tratamiento descrito anteriormente. Se inyectó en el sistema de flujo y se observó que no producía ninguna variación de la línea base, incluso después de realizar 15 inyecciones. Por lo tanto, se puede asegurar que con la dilución necesaria de la orina para detectar el NAP y en las condiciones óptimas del optosensor propuesto, no había ningún componente de la orina que pudiera interferir en la medida del principio activo NAP. Por tanto, se puede llevar a cabo la determinación de NAP en orina de forma directa.

Para ello, la orina recolectada después de la ingestión del medicamento se sometió al procedimiento operatorio anteriormente indicado y se introdujo en el sistema de flujo llevando a cabo 7 réplicas. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla II-8.

Tabla II-8. Datos de réplicas en el análisis de naproxeno en muestras de orina

Muestra	Valor encontrado (mg)	% Excretado
1	234.0	42.6
2	236.0	42.9
3	235.8	42.9
4	238.0	43.3
5	234.4	42.6
6	230.0	41.8
7	225.2	40.9
Media	233.4	42.4
D.E.R. (%)	-	1.9

Como se deduce a partir de los datos obtenidos, el 42.4% del naproxeno ingerido se excreta vía urinaria inalterado al cabo de 24 horas.

4.2.3 Validación del método. Método de adición de patrón

Para corroborar que la cantidad de naproxeno excretada en la orina era la obtenida en el método directo de análisis se procedió a llevar a cabo el método de adición de patrón.

Para ello, en matraces de 100 mL se colocaron 23.7 μ L de orina y se le añadieron alícuotas de una disolución patrón de NAP de forma que la concentración variara entre 0 y 150 ng/mL; se le adicionó la cantidad adecuada de disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 para que la concentración final fuera de 15 mM y se enrasó con agua bidestilada. Estas disoluciones se inyectaron en el sistema de flujo por triplicado y se registró la respuesta del optosensor a las condiciones instrumentales y de flujo óptimas obteniendo así la recta de adición de patrón (véase Figura II-20).

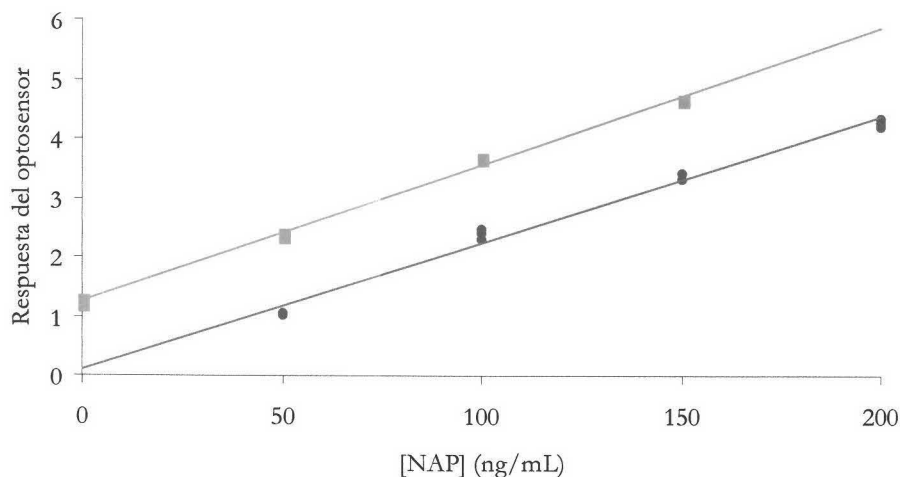


Figura II-20. Curva de calibrado (—) y adición de patrón (—) de las muestras de orina.

La recta de adición de patrón obtenida de esta forma tiene una pendiente de 0.0231, una ordenada en el origen de 1.2523 y un coeficiente de correlación de 0.9983.

Para comprobar que las pendientes del calibrado y de la recta de adición de patrón no son significativamente diferentes, se llevó a cabo el estudio de validación propuesto por

Cuadros y col.^{87,88}, según el cual, la t estadística de las pendientes debe ser menor que la t de Student tabulada para un α de 0.01 y n_S+n_A-4 grados de libertad.

Realizados los cálculos, los resultados obtenidos fueron:

$$s_p = 0.1139$$

$$t_{\text{tab}} = 2.845$$

$$t_{\text{cal}} = 2.044$$

por lo que se concluye que las pendientes no son significativamente distintas, ya que $t_{\text{tab}} > t_{\text{cal}}$.


Haciendo uso de la recta de adición de patrón, se calculó la concentración de naproxeno en la orina y por tanto, el porcentaje excretado de éste en la orina analizada. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla II-9.

Tabla II-9. Datos de excreción de NAP en la adición de patrón.

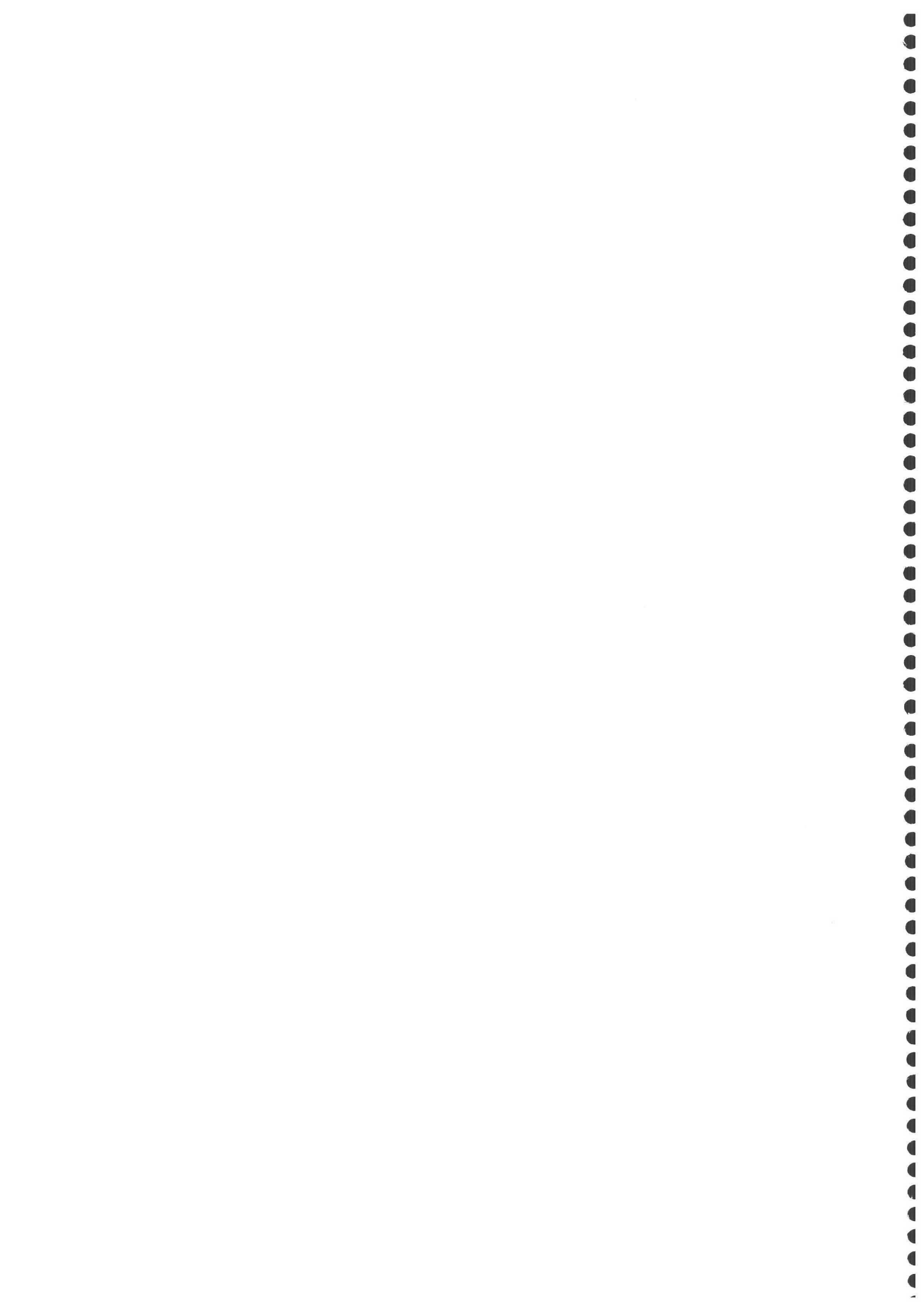
Valor encontrado (mg)	% Excretado
243.7	44.3

Se podría concluir de estos resultados que el método propuesto es exacto y por tanto, el optosensor propuesto puede usarse de forma rápida, simple, selectiva y sensible para la determinación de NAP en preparados farmacéuticos y orina.

87. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Validation of analytical instrumental method by standard addition methodology". J. AOAC Int., 78 (1995) 471.
88. A.M. García Campaña, L. Cuadros Rodríguez, J. Aybar Muñoz y F. Alés Barrero. "Chemometric protocol to validate an analytical method in the presence of corrigible constant and proportional systematic errors", J. AOAC Int., 80 (1997) 657.



CAPÍTULO III
**Desarrollo de un optosensor
fluorimétrico para la determinación de
propranolol en preparados
farmacéuticos y de un test de screening
para el control de propranolol en
fluidos biológicos**



**CAPÍTULO III. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FLUORIMÉTRICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE PROPRANOLOL EN PREPARADOS
FARMACÉUTICOS Y DE UN TEST DE SCREENING PARA EL CONTROL
DE PROPRANOLOL EN FLUIDOS BIOLÓGICOS**

1 Generalidades del propranolol	229
1.1 Estructura molecular.....	229
1.2 Nomenclatura e historia.....	229
1.3 Propiedades.....	229
1.4 Usos.....	229
1.5 Toxicología.....	230
1.6 Propiedades farmacológicas.....	230
1.6.1 Propiedades farmacodinámicas.....	230
1.6.2 Propiedades farmacocinéticas.....	230
1.7 Formulaciones comerciales.....	231
1.8 Métodos analíticos.....	231
2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas	237
2.1 Espectros del propranolol en disolución.....	237
2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina.....	238
2.3 Espectros en fase sólida.....	239
2.4 Diseño del sistema de flujo.....	241
2.5 Elección de la disolución regenerante.....	242
2.6 Optimización de los parámetros instrumentales.....	245
2.6.1 Voltaje del detector.....	245
2.6.2 Ancho de rendija.....	246

2.6.3 Resolución	247
2.7 Optimización de las variables experimentales	248
2.7.1 Influencia del pH	248
2.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora	249
2.8 Optimización de las variables de flujo	251
2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo	252
2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra	253
2.9 Efecto de la temperatura	254
3 Características analíticas del método	255
3.1 Procedimiento operatorio.....	255
3.2 Recta de calibrado.....	255
3.3 Parámetros de fiabilidad	256
4 Aplicaciones del método propuesto.....	258
4.1 Determinación de propranolol en preparados farmacéuticos.....	258
4.1.1 Estudios de recuperación	259
5 Test de screening para el control de propranolol en muestras de orina	260
5.1 Procedimiento operatorio.....	261
5.2 Recta de calibrado del propranolol en presencia de orina.....	261
5.3 Parámetros de fiabilidad.....	262
5.4 Selectividad del test de dopaje propuesto	265
5.5 Aplicación al análisis cualitativo del test propuesto.....	266

1 Generalidades del propranolol

1.1 Estructura molecular

La fórmula molecular y peso molecular del propranolol son $C_{16}H_{21}NO_2$ y 259.3 g/mol, respectivamente. La estructura molecular del propranolol se presenta en la Figura III-1.

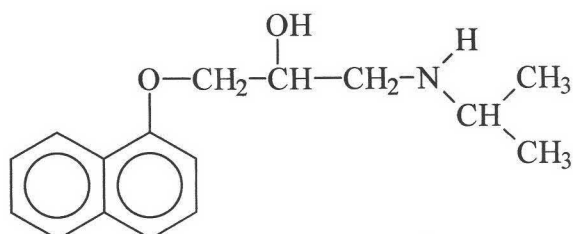


Figura III-1. Estructura molecular del propranolol

1.2 Nomenclatura e historia

El propranolol, 1-(isopropilamino)-3-(1-naftiloxi)-2-propanol, es un bloqueante β -adrenoceptor con amplia variedad de indicaciones en medicina como son el tratamiento de la hipertensión, de la arritmia cardiaca, de la angina de pecho, etc..

1.3 Propiedades

El propranolol es soluble en agua y etanol, prácticamente insoluble en éter, benceno y acetato de etilo y su punto de fusión es de 163-164 °C.

Su hidrocloreuro tiene estructura cristalina con un punto de fusión de 96 °C.

1.4 Usos

El propranolol es un antagonista competitivo de los receptores β_1 y β_2 -adrenérgicos, es decir, es un β -bloqueante.

Este compuesto está indicado en el control de la hipertensión arterial esencial y renal, en el tratamiento de la angina de pecho, profilaxis de la migraña, tratamiento del temblor esencial, de la sintomatología periférica de la ansiedad (taquicardia, temblor),

control en la mayoría de las arritmias cardíacas, profilaxis a largo plazo después de la recuperación del infarto agudo de miocardio, etc..

El propranolol está incluido en la lista de sustancias y grupos farmacológicos prohibidos y de métodos no reglamentados de dopaje en el deporte, establecida en la Resolución de 21 de marzo de 2000 del Consejo Superior de Deportes. Este compuesto se encuentra incluido en la sección I de la lista dentro del grupo I.1.6 Bloqueantes β -adrenérgicos, considerándose únicamente prohibidos por una Federación deportiva española, como la de tiro, cuando a su juicio se considere que su consumo pueda modificar artificialmente el rendimiento deportivo de los deportistas o los resultados de la competiciones deportivas y cuando su correspondiente Federación Internacional lo tenga prohibido.

1.5 Toxicología

La DL_{50} en ratones por vía intravenosa es 22 mg/Kg, 107 mg/Kg por vía intraperitoneal y 565 mg/Kg por vía oral.

1.6 Propiedades farmacológicas

1.6.1 Propiedades farmacodinámicas

El propranolol es un antagonista competitivo de los receptores β_1 , y β_2 -adrenérgicos, sin actividad antagonista a dichos receptores.

1.6.2 Propiedades farmacocinéticas

El propranolol es absorbido completamente, tras su administración oral, alcanzándose las máximas concentraciones plasmáticas 1-2 horas después de su ingesta en ayunas. Por vía hepática se elimina hasta un 90% de la dosis oral, siendo la vida media de eliminación de 3 a 6 horas. El propranolol se distribuye amplia y rápidamente, presentándose los mayores niveles en pulmones, hígado, riñón, cerebro y corazón siendo su unión a proteínas muy elevada (80-95%).

1.7 Formulaciones comerciales

El propranolol se encuentra en las siguientes preparaciones farmacéuticas comerciales: Sumial 10, Sumial 40 y Sumial Retard de los Laboratorios Zeneca, siendo estas las únicas que contienen este principio activo y se encuentran comercializadas en nuestro país.

1.8 Métodos analíticos

Para la determinación del propranolol se han descrito gran diversidad de procedimientos analíticos. Existen metodologías volumétricas tanto clásicas¹ como conductimétricas² para el análisis de esta sustancia. Dentro de las técnicas electroquímicas de análisis existe un electrodo selectivo³ aplicable a varias drogas y entre ellas el propranolol y otro específico de propranolol⁴ y además se han propuesto dos determinaciones voltamperométricas del mismo^{5,6}.

También se han descrito métodos para la determinación de los distintos enantiómeros del propranolol usando resonancia magnética nuclear⁷ y espectrometría de masas⁸.

Además de éstas hay que mencionar las técnicas separativas como son la cromatografía y la electroforesis capilar⁹⁻¹⁶. Dentro de las cromatográficas existen métodos

1. V.N. Pathak, S.R. Shukla e I.C. Shukla. "Direct titrimetric determination of the antihypertensive drugs methyl dopa and propranolol in pharmaceutical preparations". *Analyst*, 107 (1982) 1086.
2. Y.M. Issa y A.S. Amin. "Conductometric titration of pindolol and propranolol using ammonium reineckate and potassium tetracyanonickelate". *Mikrochim. Acta*, 118 (1995) 85.
3. H. Suzuki, H. Nakagawa, M. Mifune, Y. Saito. "A widely applicable electrode sensitive to basic drugs based on poly(vinyl chloride) membrane plasticized with tricresyl phosphate". *Chem. & Pharm. Bull.*, 41 (1993) 1123.
4. H.Y. Aboul Enein y X.X. Sun. "A novel ion selective PVC membrane electrode for determination of propranolol in pharmaceutical formulation". *Analisis*, 28 (2000) 855.
5. F. Belal, O.A. AlDeeb, A.A. AlMajed y E.A.R. GadKariem. "Voltammetric determination of N-nitrosoderivatives of atenolol and propranolol in simulated gastric juice". *Farmaco*, 54 (1999) 700.
6. M.M. Ghoneim, A.M. Beltagi y A. Radi. "Indirect determination of propranolol by cathodic adsorptive stripping voltammetry". *Química Analítica* 20 (2002) 237.
7. G.M. Hanna y F.E. Evans. "Optimization of enantiomeric separation for quantitative determination of the chiral drug propranolol by H-1-NMR spectroscopy utilizing a chiral solvating agent". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 24 (2000) 189.
8. W.A. Tao F.C. Gozzo y R.G. Cooks. "Mass spectrometric quantification of chiral drugs by the kinetic method". *Anal. Chem.*, 73 (2001) 1692.
9. A.J.J. Debets, T.P. Schoutsen, W.T. Kok, K.P. Hupe y U.A.T. Brinkman. "Zone electrophoretic sample treatment coupled online with column liquid-chromatography for the determination of basic and acidic compounds in biological samples". *Chromatographia*, 34 (1992) 581.

descritos en cromatografía de gases^{17,18} acoplada a detección de espectrometría de masas¹⁹⁻²¹ y en capa fina²², destacando el uso de la cromatografía líquida para el análisis de esta droga²³⁻²⁶. Casi todas las aplicaciones de esta técnica van destinadas a la determinación del propranolol en suero o plasma humano²⁷⁻³⁴, bien solo o resolviendo mezclas de drogas³⁵⁻³⁹,

10. P. Lukkari, T. Nyman y M.L. Riekkola. "Determination of 9 beta-blockers in serum by micellar electrokinetic capillary chromatography". *J. Chromatogr. A*, 674 (1994) 241.
11. M. Fillet, I. Bechet, P. Chiap, P. Hubert y J. Crommen. "Enantiomeric purity determination of propranolol by cyclodextrin-modified capillary electrophoresis". *J. Chromatogr. A*, 717 (1995) 203.
12. W.Z. Lu y R.B. Cole. "Determination of chiral pharmaceutical compounds, terbutaline, ketamine and propranolol, by on-line capillary electrophoresis- electrospray ionization mass spectrometry". *J. Chromatogr. B*, 714 (1998) 69.
13. K.A. Assi, B.J. Clark y K.D. Altria. "Enantiomeric purity determination of propranolol by capillary electrophoresis using dual cyclodextrins and a polycrylamide-coated capillary". *Electrophoresis*, 20 (1999) 2723.
14. X.X. Bai, T.Y. You, H.W. Sun, X.R. Yang y E.K. Wang. "Determination of propranolol by capillary electrophoresis with end-column amperometric detection". *Electroanalysis*, 12 (2000) 535.
15. X.X. Bai, T.Y. You, H.W. Sun, X.R. Yang y E.K. Wang. "Determination of three beta-blockers by capillary electrophoresis with end-column electrochemical detection". *Electroanalysis*, 12 (2000) 1379.
16. W. Maruszak, M. Trojanowicz, M. Margasinska y H. Engelhardt. "Application of carboxymethyl-beta-cyclodextrin as a chiral selector in capillary electrophoresis for enantiomer separation of selected neurotransmitters". *J. Chromatogr. A*, 926 (2001) 327.
17. W.R. Stenzel, G. Michael y L. Lyhs. "A modified gas chromatographical method for determination of propranolol in blood-plasma". *Pharmazie*, 40 (1985) 360.
18. M.P. Quaglio, A.M. Bellini y L. Minozzi. "Simultaneous determination of propranolol or metoprolol in the presence of benzodiazepines in the plasma by gas-chromatography". *Farmaco*, 47 (1992) 799.
19. H. Siren, M. Saarinen, S. Hainari, P. Lukkari y M.L. Riekkola. "Screening of beta-blockers in human serum by ion-pair chromatography and their identification as methyl or acetyl derivatives by gas-chromatography mass-spectrometry". *J. Chromatogr.*, 632 (1993) 215.
20. M.P. Quaglio, A.M. Bellini, L. Minozzi, G. Frisina y F. Testoni. "Simultaneous determination of propranolol or metoprolol in the presence of butyrophenones in human plasma by gas-chromatography with mass-spectrometry". *J. Pharma. Sci.*, 82 (1983) 87.
21. W.M. Mullett, P. Martín y J. Pawliszyn. "In-tube molecularly imprinted polymer solid-phase microextraction for the selective determination of propranolol". *Anal. Chem.*, 73 (2001) 2383.
22. J. Molling, U. Leuschner, F.P. Meyer y H. Walther. "Thin-layer chromatographic determination of talinolol, propranolol and triameteran in urine-contribution to the valuation of the compliance of patients with hypertension". *Pharmazie*, 41 (1986) 301.
23. J.P. Remon, P. Gyselinck, R. Synave, R. Vanseveren, P. Braeckmann, N. Dekimpe y N. Schamp. "Synthesis of 4-methoxypropranolol, a suitable internal standard for the determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol by HPLC". *Archiv der Pharmazie*, 314 (1981) 432.
24. K.A. Parrott. "Determination of propranolol in peritoneal-dialysis fluid by high-performance liquid-chromatography without extraction". *J. Chromatogr.*, 274 (1983) 171.
25. M.H.A. Botterblom, M.G.P. Feenstra y E.B.H.W. Erdtsieckernste. "Determination of propranolol, labetalol and clenbuterol in rat-brain by high-performance liquid-chromatography". *J. Chromatogr. B*, 613 (1993) 121.
26. C. Mislanova, A. Stefancova, J. Oravcova, J. Horecky, T. Trnovec y W. Lindner. "Direct high-performance liquid chromatographic determination of (R)- and (S)-propranolol in rat microdialysate using on-line column switching procedures". *J. Chromatogr. A*, 739 (2000) 151.
27. N. Terao y D.D. Shen. "A sensitive high-pressure liquid-chromatographic method for the determination of propranolol in microliter serum samples". *Chromatographia*, 15 (1982) 685.
28. H. Takei, H. Ogata y A. Ejima. "Determination of propranolol and its major metabolite, naphthoxylactic acid, in human-plasma by high-performance liquid- chromatography". *Chem. Pharma. Bull.*, 31 (1983) 1392.
29. K.A. Smith, S. Wood y M. Crous. "Rapid high-performance liquid-chromatographic method for the determination of propranolol in plasma". *Analyst* 112 (1987) 407.

y en preparaciones farmacéuticas⁴⁰⁻⁴⁴. Igualmente, en la bibliografía aparecen diversos trabajos de determinación del propranolol junto con algunos de sus metabolitos⁴⁵⁻⁴⁸.

-
30. M.E. Abdelhamid. "High-performance liquid-chromatographic determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in serum". *J. Clinical Pharmacy and Therapeutics*, 13 (1988) 183.
 31. K. Yamashita, M. Motohashi y T. Yashiki. "Sensitive high-performance liquid-chromatographic determination of propranolol in human plasma with ultraviolet detection using column switching combined with ion-pair chromatography". *J. Chromatogr. B*, 527 (1990) 196.
 32. K.M. Hedeen, K. Tyczkowska, D.P. Aucoin y R.M. Norton. "Rapid high-performance liquid-chromatographic method for the determination of propranolol levels in canine and feline plasma". *J. Chromatogr. B*, 572 (1991) 239.
 33. A.J. Braza, P. Modamio y E.L. Marino. "Two reproducible and sensitive liquid chromatographic methods to quantify atenolol and propranolol in human plasma and determination of their associated analytical error functions". *J. Chromatogr. B*, 738 (2000) 225.
 34. C. Mislanova y A. Stefancova. "Comparison of two different approaches of sample pretreatment for stereoselective determination of (R,S)-propranolol in human plasma". *J Trace Microporobe Techniques* 19 (2001) 163.
 35. G. Degroot, D.J. Dewildt, J.J.M. Langemeyer y B. Sangster. "RP-HPLC determination of timolol and propranolol in rat plasma by ion-pair chromatography and combined solid-phase liquid-liquid-extraction". *Pharmaceutisch Weekblad-Scientific Edition*, 7 (1985) 286.
 36. E.M. Koves y J. Wells. "Evaluation of a photodiode array hplc-based system for the detection and quantitation of basic drugs in postmortem blood". *J. Forensic Sci.*, 37 (1992) 42.
 37. J. Hermansson y A. Grahn. "Determination of drugs by direct-injection of plasma into a biocompatible extraction column based on a protein-entrapped hydrophobic phase". *J. Chromatogr. A*, 660 (1994) 119.
 38. C. Mislanova y M. Hutta. "Influence of various biological matrices (plasma, blood microdialysate) on chromatographic performance in the determination of beta-blockers using an alkyl-diol silica precolumn for sample clean-up". *J. Chromatogr. B*, 765 (2001) 167.
 39. M. Katayama, Y. Matsuda, K. Shimokawa, S. Tanabe, I. Hara, T. Sato, S. Kaneko y H. Daimon. "Determination of beta-blockers by high performance liquid chromatography coupled with solid phase microextraction from urine and plasma samples". *Anal. Lett.*, 34 (2001) 91.
 40. M.E. Hitscherich, E.M. Rydberg, D.C. Tsilifonis y R.E. Daly. "Simultaneous determination of hydrochlorothiazide and propranolol hydrochloride in tablets by high-performance liquid-chromatography". *J. Liquid Chromatogr.*, 10 (1987) 1011.
 41. A.G. Cabanillas, T.G. Díaz, F. Salinas y C.G. Cabanillas. "Rapid-determination of propranolol hydrochloride and hydralazine hydrochloride in pharmaceutical preparations by reverse-phase liquid-chromatography". *Annali di Chimica*, 83 (1993) 523.
 42. R. Ghanem, M.A. Bello, M. Callejón y A. Guiraum. "Determination of beta-blocker drugs in pharmaceutical preparations by non-suppressed ion chromatography". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15 (1996) 383.
 43. I. Rapado Martínez, M.C. García Álvarez Coque y R.M. Villanueva Camanas. "Liquid chromatographic procedure for the evaluation of beta-blockers in pharmaceuticals using hybrid micellar mobile phases". *J. Chromatogr. A*, 765 (1997) 221.
 44. M.I.R.M. Santoro, H.S. Cho y E.R.M. Kedor Hackmann. "Enantiomeric separation and quantitative determination of propranolol in tablets by chiral high-performance liquid chromatography". *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 27 (2001) 693.
 45. G. Tamai, I. Morita, T. Masujima, H. Yoshida y H. Imai. "Direct, simultaneous determination of propranolol and its 4-hydroxy metabolite by liquid-chromatography". *J. Pharma. Sci.*, 73 (1984) 1825.
 46. M.J. Wilson y T. Walle. "Silica-gel high-performance liquid-chromatography for the simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol enantiomers after chiral derivatization". *J. Chromatogr.*, 310 (1984) 424.
 47. W.H. Li y R.C. Lanman. "Determination of propranolol and 3 metabolites in rat bile by gradient elution HPLC". *Anal. Lett.*, 20 (1987) 603.
 48. V.L. Herring y J.A. Johnson. "Direct high-performance liquid-chromatographic determination in urine of the enantiomers of propranolol and its major basic metabolite 4-hydroxypropranolol". *J. Chromatogr. B*, 612 (1993) 215.

La cromatografía líquida de alta resolución con detección fluorimétrica también ha sido ampliamente utilizada para la determinación de esta sustancia⁴⁹⁻⁵⁵. En los últimos años se ha usado la cromatografía líquida con detección de masas para la determinación y cuantificación de diferentes beta-bloqueantes entre los que se encuentra el propranolol^{56,57}.

Dentro de los métodos descritos también existen varios trabajos de determinación del propranolol haciendo uso de técnicas ópticas como la espectrofotometría de absorción molecular^{58,60}. Sastry *y col.*⁶¹ en 1996 proponen un método espectrofotométrico para determinar propranolol basado en la reactividad del mismo con N-bromosuccinimida teniendo límites de detección entorno a 4 µg/mL. Posteriormente, Prasad⁶² determina de forma simultánea, propranolol y metoprolol por espectroscopía derivada en preparaciones farmacéuticas. En 1998, se propone la determinación espectrofotométrica de propranolol

-
49. F. Albani, R. Riva y A. Baruzzi. "Simple and rapid-determination of propranolol and its active metabolite, 4-hydroxypropranolol, in human-plasma by liquid-chromatography with fluorescence detection". *J. Chromatogr.*, 228 (1982) 362.
 50. R.P. Koshakji y A.J.J. Wood. "Improved high-performance liquid-chromatographic method for the simultaneous determination of propranolol and 4-hydroxypropranolol in plasma with fluorescence detection". *J. Chromatogr.B*, 422 (1987) 294.
 51. G. Shao, J. Goto y T. Nambara. "Separation and determination of propranolol enantiomers in plasma by high-performance liquid-chromatography with fluorescence detection". *J. Liquid Chromatogr.*, 14 (1991), 753.
 52. G.S. Rekhi, S.S. Jambhekar, P.F. Souney y D.A. Williams. "A fluorimetric liquid chromatographic method for the determination of propranolol in human serum plasma". *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 13 (1995) 1499.
 53. I.R. Martínez, R.M.V. Camanas y M.C.G. Álvarez Coque. "Micellar liquid chromatography: A worthy technique for the determination of beta-antagonists in urine samples". *Anal. Chem.*, 71 (1999) 319.
 54. H.K. Kim, J.H. Park, J.S. Kang y M.H. Lee. "Determination of propranolol concentration in small volume of rat plasma by HPLC with fluorimetric detection". *Biomed. Chromatogr.*, 15 (2001) 539.
 55. V.P. Ranta, E. Toropainen, A. Talvitie, S. Auriola y A. Urtili. "Simultaneous determination of eight beta-blockers by gradient high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and fluorescence detection in corneal permeability studies in vitro". *J. Chromatogr. B*, 772 (2002) 81.
 56. M.E. Abdel Hamid. "Comparative LC-MS and HPLC analyses of selected antiepileptics and beta-blocking drugs". *Farmaco*, 55 (2000) 136.
 57. R. Bakhtiar y F.L.S. Tse. "High-throughput chiral liquid chromatography/tandem mass spectrometry". *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 14 (2000) 1128.
 58. D. Radulovic, M.S. Jovanovic y L. Zivanovic. "Spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride as bromthymolblue pair in tablets". *Pharmazie*, 41 (1986) 434.
 59. L. Zivanovic, D. Radulovic y M. Jovanovic. "Colorimetric determination of propranolol chloride in pharmaceutical preparations". *Pharmaceutica Acta Helveticae*, 63 (1988) 350.
 60. N.A. Zakhari, S.M. Hassan y Y. Elshabrawy. "Colorimetric determination of beta-adrenergic blocking-drugs with carbon-disulfide and copper(I) ions". *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 9 (1991) 421.
 61. C.S.P. Sastry, K.R. Srinivas y K.M.M.K. Prasad. "Spectrophotometric determination of drugs in pharmaceutical formulations with N-bromosuccinimide and celestine blue". *Mikrochim. Acta*, 122 (1996) 77.
 62. C.V.N. Prasad, V. Bharadwaj, V. Narsimhan, R.T. Chowdhary y P. Parimoo. "Simultaneous determination of metoprolol-hydrochlorothiazide and propranolol-hydrochlorothiazide in combined formulations by derivative spectroscopy". *J. AOAC Inter.*, 80 (1997) 325.

por formación de complejos con Cr(III)⁶³. En 2001, Yamaguchi *y col.*⁶⁴ y Golcu *y col.*⁶⁵ proponen dos métodos espectrofotométricos para la determinación de propranolol por formación de diferentes complejos coloreados.

Existen, además, tres trabajos de determinación indirecta por espectrometría de absorción atómica de los cuales dos están basados en la formación de asociados iónicos de la droga con compuestos como cobaltonitrito sódico, ferrocianuro potásico, etc., obteniendo límites de detección del orden de 2 µg/mL^{66,67}. En cambio, El-Ries *y col.*⁶⁸, aplicaron la determinación de propranolol a productos farmacéuticos obteniendo buenos porcentajes de recuperación, comparando los resultados obtenidos con un método espectrofotométrico para la determinación del mismo.

Dentro de las mencionadas técnicas ópticas tenemos también determinaciones por métodos luminiscentes tanto por fluorescencia como fosforescencia. Dentro de los métodos fluorimétricos, en 1991 Muñoz de la Peña *y col.*⁶⁹ describen la determinación simultánea de propranolol e hidralazina por espectrofluorimetría sincrónica derivada aplicándola al análisis en preparaciones farmacéuticas. Más tarde, en 1998, se publica otra determinación por espectrofluorimetría sincrónica de propranolol y pindolol teniendo un rango de determinación para el propranolol desde 0.02 hasta 1.00 µg/mL, aplicando dicha metodología al análisis de ambos analitos en muestras de orina y preparaciones farmacéuticas, para el caso del propranolol⁷⁰. En este mismo año Murillo Pulgarín *y col.*⁷¹

-
63. I. Ganescu, A. Popescu, I. Papa, L. Chirigiu y M. Aciu. "Complex chromium III anions in drug control. propranolol determination as Cr (III) thiocyanate complexes". *Revista de Chimie*, 49 (1998) 115.
 64. T. Yamaguchi, H. Murase, I. Mori y Y. Fujita. "Spectrophotometric determination of propranolol hydrochloride and its related drugs bases on color development with the bromopyrogallol red-molybdenum (VI) complex". *Bunseki Kagaku*, 50 (2001) 563.
 65. A. Golcu, M. Dolaz y S. Serin. "Spectrophotometric determination of propranolol as Cu(II), Ni(II) and Co(II) dithiocarbamate complexes". *Turkish Journal of Chemistry*, 25 (2001) 485.
 66. S. Khalil y N. Borham. "Indirect atomic absorption spectrometric determination of pindolol, propranolol and levamisole hydrochlorides based on formation of ion-associates with ammonium reineckate and sodium cobaltinitrite". *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 235.
 67. S. Khalil y M.M. ElRabiehi. "Indirect atomic absorption spectrometric determination of pindolol, propranolol and levamisole hydrochlorides based on formation of ion associates with manganese thiocyanate and potassium ferricyanide". *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 22 (2000) 7.
 68. M.A. El-Ries, F.M. Abou Attia y S.A. Ibrahim. "AAS and spectrophotometric determination of propranolol HCL and metoprolol tartrate". *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 24 (2000) 179.
 69. A. Muñoz de la Peña, F. Salinas y M.S. Durán. "Simultaneous determination of propranolol and hidralazina by derivative synchronous spectrofluorometry". *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 317.
 70. T.P. Ruiz, C. Martínez Lozano, V. Tomás y J. Carpena. "Simultaneous determination of propranolol and pindolol by synchronous spectrofluorimetry". *Talanta*, 45 (1998) 969.

determinan por espectrofluorimetría derivada sincrónica de ángulo variable varias drogas, entre las que se encuentra el propranolol, con un rango dinámico lineal para el propranolol de 6 a 200 ng/mL. Además de éstos hay descrito un fluoroinmunoensayo para cuantificar el propranolol en suero y plasma⁷².

Se han obtenido distintos datos sobre métodos fosforimétricos de cuantificación del propranolol. Así, Bateh y Winefordner⁷³ en 1983, aplican la fosforimetría en soporte sólido a la determinación del propranolol en preparaciones farmacéuticas usando como átomo pesado externo el yoduro potásico. En 1986, Femia y Cline Love⁷⁴, hacen un estudio comparativo de la espectrofosforimetría sincrónica a temperatura ambiente en disolución empleando medios micelares y ciclodextrinas y resuelven una mezcla de propranolol y su 4-hidroximetabolito en medio micelar haciendo uso de la segunda derivada. Existe también otra determinación fosforimétrica de esta droga en preparados farmacéuticos utilizando la metodología en superficie sólida, propuesta por Long y col.⁷⁵ en 1988.

En el año 1994, Rapado Martínez y col.⁷⁶ publican una metodología para la determinación de propranolol en preparaciones farmacéuticas por fosforimetría en disolución empleando medios micelares (dodecil sulfato sódico), TiNO_3 como sal de átomo externo, Na_2SO_3 como agente desoxigenante y una disolución tampón de fosfato. En esta determinación es necesario un tiempo de 30 minutos a temperatura ambiente después de la preparación de la muestra y después una termostatación a 18 °C durante 10 minutos para observar la fosforescencia del propranolol a unas longitudes de onda de excitación y emisión de 290 y 487 nm respectivamente, obteniéndose un límite de detección de $9 \cdot 10^{-10}$ M y un rango dinámico lineal hasta $8 \cdot 10^{-5}$ M. La aplicabilidad de dicho método se lleva a

-
71. J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina y P.T. López. "Simultaneous determination of atenolol, propranolol, dipyridamole and amiloride by means of non-linear variable-angle synchronous fluorescence spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 370 (1998) 9.
 72. M.H.H. Alhakiem, G.W. White, D.S. Smith y J. Landon. "Direct determination of propranolol in serum or plasma by fluoroimmunoassay". *Therapeutic Drug Monitoring*, 3 (1981) 159.
 73. R.P. Bateh y J.D. Winefordner. "Room-Temperature Phosphorescence determination of propranolol in pharmaceutical formulations". *J. Pharma. Sci.*, 72 (1983) 559.
 74. R.A. Femia y L.J. Cline Love. "Synchronous wavelength scanning room temperature phosphorescence: comparison of cyclodextrin and micellar media". *Spectrochim. Acta A*, 42 (1986) 1239.
 75. W.J. Long, S.Y. Su y H.T. Karnes. "Surface analysis of tablets by room-temperature phosphorimetry". *Anal. Chim. Acta*, 205 (1988) 279.
 76. I.R. Martínez, R.M.V. Camanas y M.C. García Álvarez Coque. "Micelle-Stabilized Room-Temperature Phosphorimetric Procedure for the Determination of Naproxen and propranolol in Pharmaceutical Preparations". *Analyst*, 119 (1994) 1093.

cabo mediante el análisis del propranolol en dos preparaciones comerciales que lo contienen, Betadipresan y Sumial.

Recientemente, Long *y col.*⁷⁷ y Cañabate Díaz *y col.*⁷⁸ emplean la metodología denominada fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados para la determinación de propranolol en principios farmacéuticos.

2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

2.1 Espectros del propranolol en disolución

Para conocer los espectros de excitación y emisión fluorescente del propranolol se preparó una disolución de 500 ng/mL de propranolol en agua bidestilada. Los espectros obtenidos se pueden ver en la Figura III-2, en la que se observa que el propranolol posee fluorescencia intrínseca, con un máximo de excitación a 294 nm y un máximo de emisión a 338 nm.

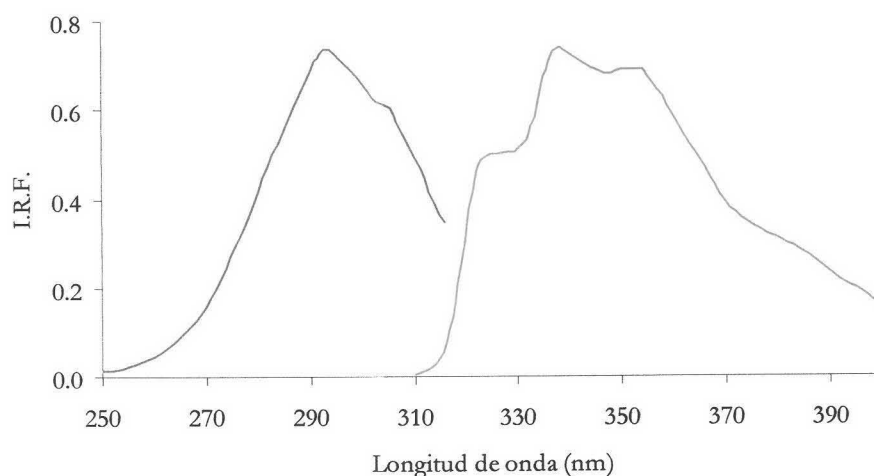


Figura III-2. Espectros de excitación y emisión del propranolol en disolución.

77. W.Q. Long, Z.X. Zhang y L.D. Li. "Studies on properties and application of non-protected room temperature phosphorescence of propranolol". *Spectrochim. Acta Pt. A-Mol. Bio.*, 58 (2002) 2185.
78. B. Cañabate Díaz, C. Cruces Blanco, A. Segura Carretero y A. Fernández Gutiérrez. "Simple determination of propranolol in pharmaceutical preparations by heavy atom induced room temperature phosphorescence". *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 30 (2002) 987.

2.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina

La fase sensora es un elemento imprescindible en el diseño de un sensor de flujo ya que afecta a la selectividad, reproducibilidad y precisión del método analítico que se establezca. Por ello, se llevó a cabo un estudio pormenorizado y detallado sobre la elección de dicha fase sensora. Para ello se probaron once tipos de resinas:

- No iónicas: Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4, Amberlita XAD 7, Gel de Sílica Davisil y Gel de Sílica Merck.
- Aniónicas: Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8.
- Catiónicas: Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8.

Debido a que el pK_a del propranolol es del orden de 11, la elección de la fase sensora se llevó a cabo a dos valores de pH por debajo y por encima de dicho pK_a (4 y 12, respectivamente). Para ello a disoluciones portadoras y disoluciones de 150 ng/mL de propranolol, se les ajustó el pH a los valores mencionados anteriormente con HCl o NaOH y se registró la diferencia entre la señal analítica y el ruido de fondo a una longitud de onda de excitación y emisión de 300/338 nm respectivamente, rendijas de 4 nm tanto para la excitación como para la emisión, voltaje a 600 V y a una resolución de 5 s (véase Figura III-3).

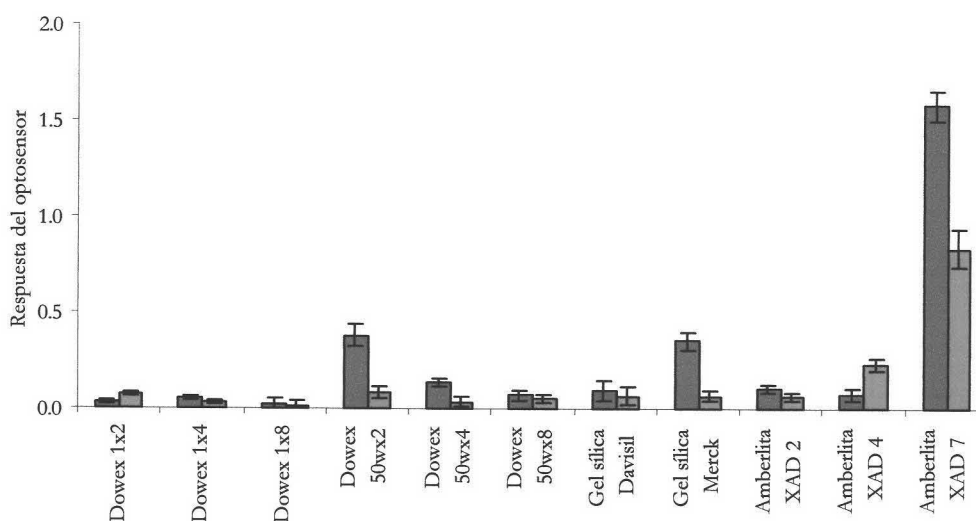


Figura III-3. Respuesta del optosensor con las diferentes fases sensoras estudiadas a ■ pH 4 y ■ pH 12. [propranolol]=150 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

Tras la selección del tipo de resina, se llevó a cabo el estudio del tamaño de partícula más apropiado de la misma para obtener buenas características analíticas. Para ello, la resina seleccionada se trituró en un mortero de ágata y se tamizó, obteniendo tres tamaños: entre 80 y 120, 120 y 160 μm y 160 y 200 μm . Tamaños inferiores a 80 μm no se probaron ya que favorecen la aparición de sobrepresiones en el sistema de flujo. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura III-4.

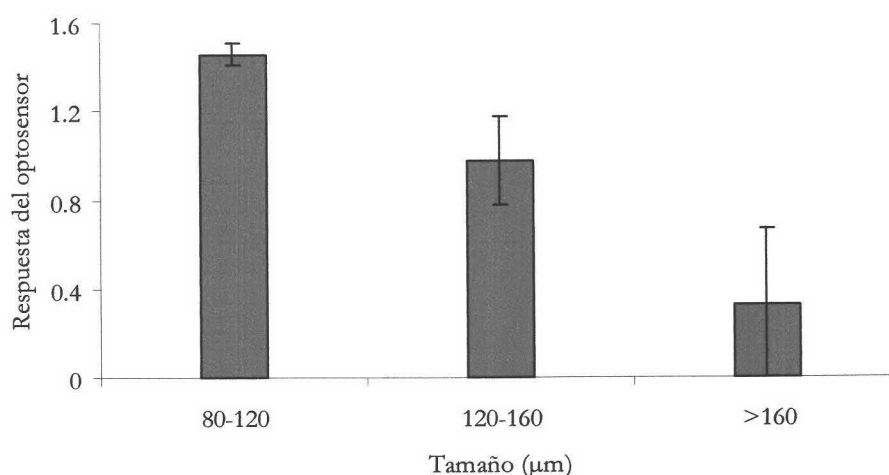


Figura III-4. Efecto del tamaño de partícula de la Amberlita XAD7 en la respuesta del optosensor. [propranolol]=150 ng/mL y pH=4 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

Como se observa en la figura anterior, la mayor diferencia entre la señal y el ruido se obtiene con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm , observándose diferencias significativas con respecto a los otros tamaños de partícula ensayados. Por lo tanto, la fase sensora seleccionada para la obtención del optosensor de propranolol ha sido Amberlita XAD 7 con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm .

Fase sensora: Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm .

2.3 Espectros en fase sólida

En el desarrollo de optosensores selectivos es necesario conocer las características espectroscópicas del analito soportado sobre la fase sensora seleccionada.

Para ello, una suspensión de la resina elegida en una disolución de 150 ng/mL de propranolol a pH 4 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas del propranolol soportado en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada a pH 4 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda del propranolol, obteniendo las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión del analito en estudio (véase Figura III-5 a y b).

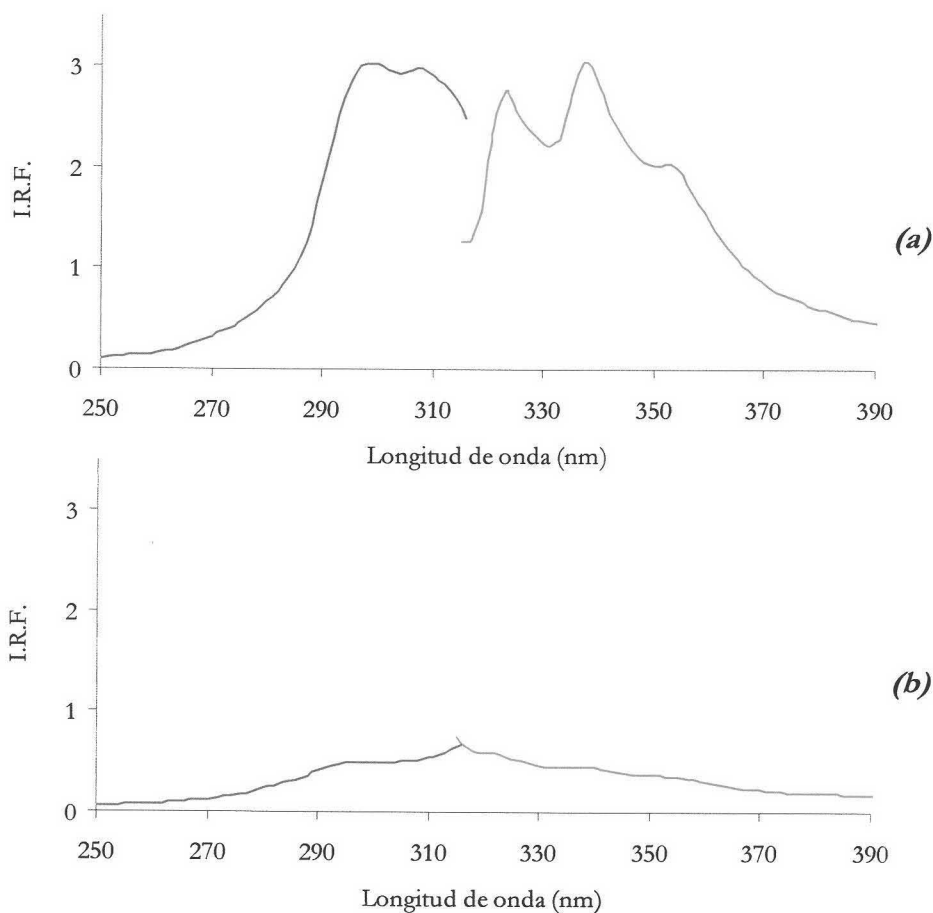


Figura III-5. Espectros de excitación y emisión de a) propranolol soportado en Amberlita XAD 7 y b) Amberlita XAD 7 a $\lambda_{exc/em}$ del propranolol. [propranolol]=150 ng/mL, pH=4 (fijado con HCl). Voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

En esta figura se observa que el propranolol se retiene ya que hay un aumento de la emisión fluorescente de la fase sensora. Para determinar cuales son las longitudes de onda

más apropiadas para la medida de fluorescencia se procedió a la eliminación mediante una substracción de la contribución de la fase sensora en los espectros obtenidos cuando en propranolol estaba fijado. El resultado obtenido se muestra en la Figura III-6.

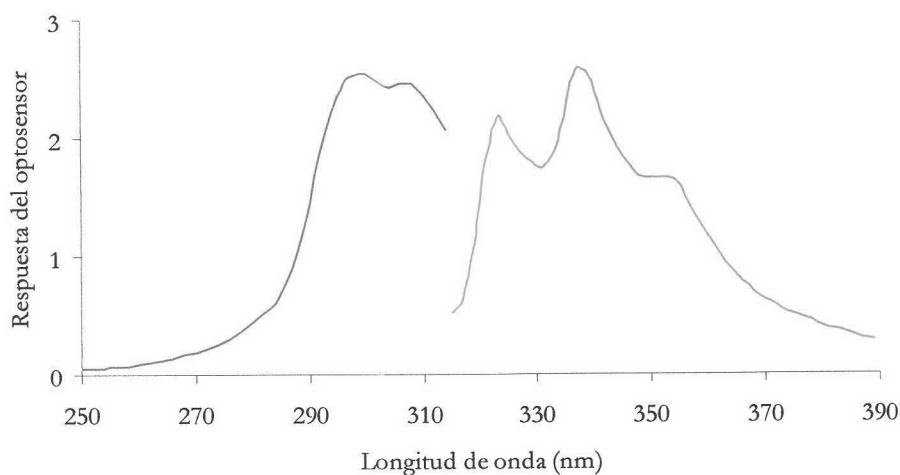


Figura III-6. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del propranolol soportado en Amberlita XAD 7 y esta fase sensora a los máximos del analito.

Se puede observar que las longitudes de onda de excitación y emisión para el propranolol soportado en la fase sensora son 300 y 338 nm respectivamente, siendo similares a las longitudes de onda del propranolol en disolución.

Para el resto del trabajo experimental, las longitudes de onda elegidas han sido:

$$\lambda_{\text{exc/em}} = 300/338 \text{ nm}$$

2.4 Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA). El sistema FIA propuesto, si bien ha sido descrito en la introducción y en la parte experimental, presenta una serie de particularidades propias del sistema en estudio. Concretamente consta de (véase Figura III-7):

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen conocido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle de inyección.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta la fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7) y colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro.

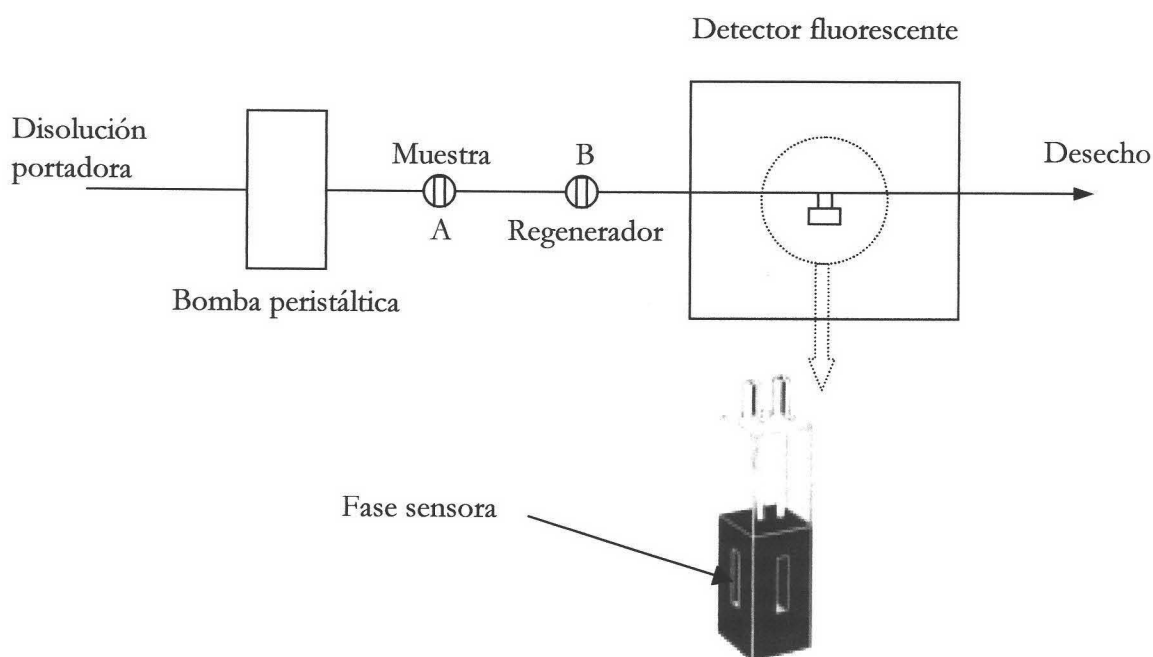


Figura III-7. Sistema de flujo utilizado.

2.5 Elección de la disolución regenerante

La interacción entre el propranolol y la fase sensora es irreversible en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas y, por tanto, es necesario el uso de una disolución regenerante que permita reutilizar el optosensor.

Como se ha demostrado anteriormente en la elección de la fase sensora, cuanto mayor es el pH del medio menor es la interacción entre el propranolol y la Amberlita XAD 7, por lo que cabría esperar buenos resultados en el uso de bases fuertes como disolución regenerante.

Por ello, se ensayó NaOH a diferentes concentraciones (0.05, 0.1, 0.5, 1.0 y 8.0 M) observando una disminución en la emisión fluorescente mientras el bolo de disolución regenerante (NaOH) atravesaba la fase sensora recuperándose después la misma señal, lo que significaba que la emisión fluorescente se veía influida por el pH pero el propranolol no se eluía de la fase sensora.

Al no conseguir resultados positivos usando bases fuertes, se ensayaron ácidos fuertes a altas concentraciones (HCl 6M, HNO₃ 6M y H₂SO₄ 6M) observándose, en todos los casos, una disminución de la señal fluorescente que recuperaba su señal una vez que el bolo de ácido había atravesado la fase sensora, lo que indicaba, al igual que el caso del uso de bases fuertes, que el propranolol no se había eluido de la resina.

Por último, se estudió el efecto de diferentes disolventes orgánicos miscibles con agua (metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol y acetona) sobre el propranolol retenido en la fase sensora, observándose que, en todos los casos, un cambio brusco de la constante dieléctrica produce una buena regeneración del sistema (véase Figura III-8).

Para elegir la disolución regenerante adecuada se tuvo en cuenta la repetibilidad del sistema. Para ello se llevaron a cabo 3 réplicas para cada uno de los regeneradores, inyectando 2 mL de una disolución de 150 ng/mL de propranolol a pH 4. Como se puede observar en la Figura III-8, el disolvente orgánico que proporciona una mayor repetibilidad de la señal fluorescente es el acetonitrilo y, por tanto, fue seleccionado como agente regenerante.

Además, se llevó a cabo un estudio del porcentaje mínimo de acetonitrilo que era necesario utilizar en la disolución regenerante, comprobando que, en porcentajes inferiores al 80% v/v de acetonitrilo-agua, no se regeneraba eficientemente el sistema (véase Figura III-9). Por ello, se usó una disolución de acetonitrilo en agua al 80% v/v como disolución regenerante en el resto del trabajo experimental.

Regenerador: Acetonitrilo/H₂O 80% v/v

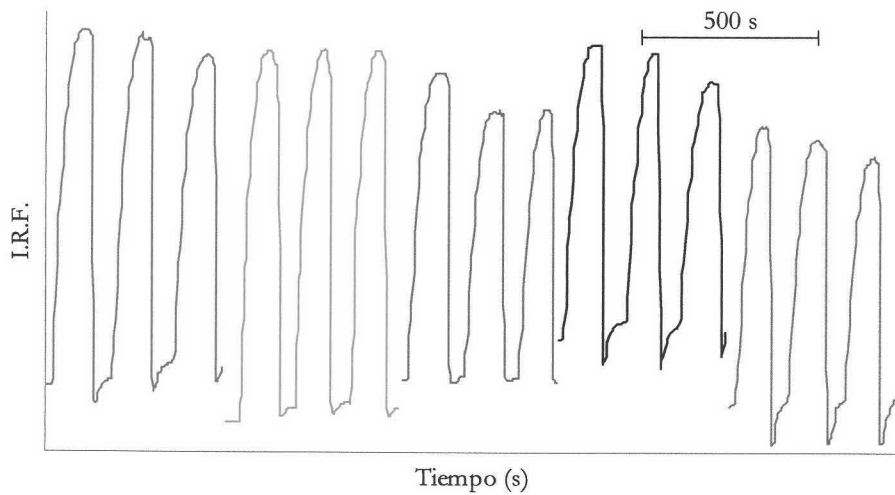


Figura III-8. Regeneración de la fase sensora con disolventes orgánicos (metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, etanol y acetona). [Propranolol]=150 ng/mL. pH 4 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

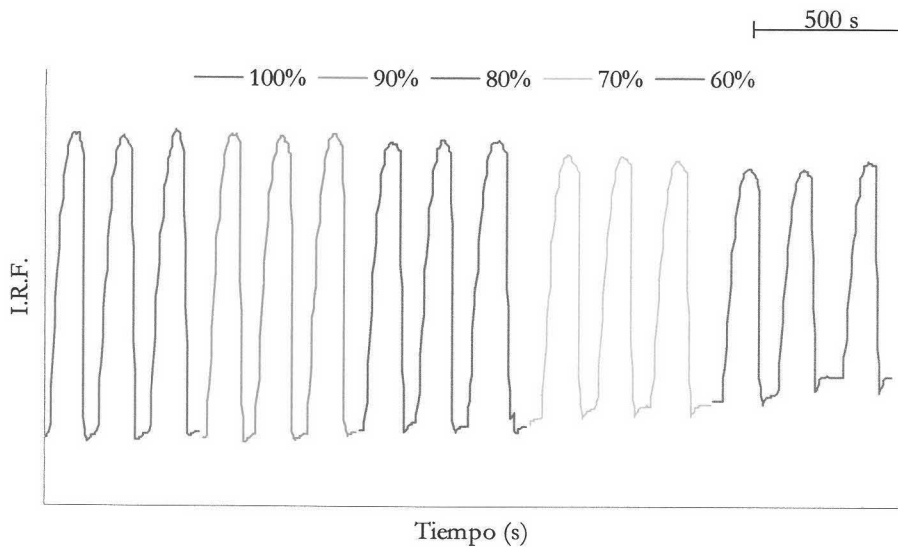


Figura III-9. Porcentaje de acetonitrilo en la disolución regeneradora. [Propranolol]=150 ng/mL. pH=4 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

En todos los casos se usó un volumen de disolución regenerante de 250 μ L.

2.6 Optimización de los parámetros instrumentales

Seleccionada la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y la disolución regenerante, se procedió a continuación a estudiar los parámetros instrumentales del equipo de medida con objeto de mejorar la diferencia señal-ruido y por tanto, las características analíticas del optosensor propuesto. Los parámetros instrumentales optimizados han sido: voltaje aplicado al detector, rendijas de los monocromadores de excitación y emisión y la resolución de las medidas del instrumento.

2.6.1 Voltaje del detector

El primer parámetro instrumental estudiado fue el voltaje que se aplica al fotomultiplicador. Este parámetro afecta tanto a la sensibilidad de la señal analítica como a la repetibilidad de la misma.

Para optimizar este parámetro se inyectó una muestra de 150 ng/mL de propranolol a pH 4 fijado con HCl, obteniéndose el fiagrama conforme se variaba el voltaje del detector realizando, en todos los casos, 3 réplicas a las condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm; rendijas de excitación y emisión de 4 nm; resolución 5 s; velocidad de flujo 1.5 mL/min y volumen de muestra inyectado 2 mL. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura III-10.

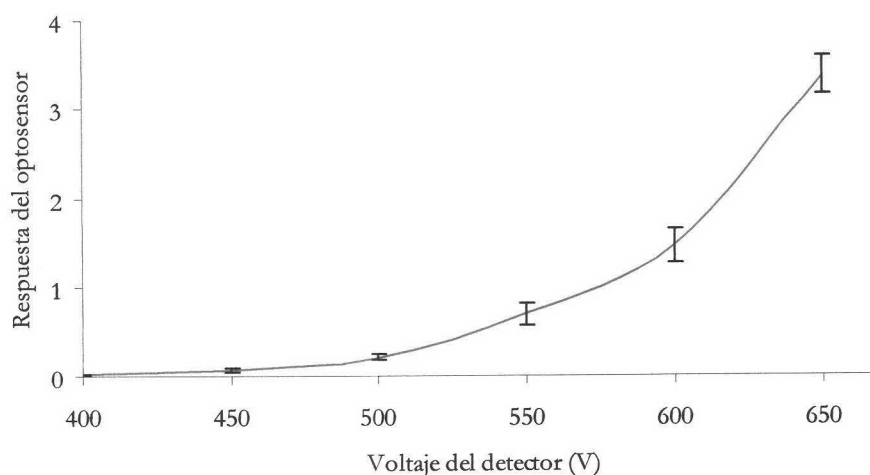


Figura III-10. Influencia del voltaje del detector en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL.

Como se observa en esta figura, un aumento del voltaje del detector provoca un aumento de la respuesta del optosensor. Además, provoca un aumento del error de la medida, aunque este error no es en ningún caso lo suficientemente elevado como para tenerlo en cuenta a la hora de seleccionar el voltaje óptimo. Por tanto, y buscando la mayor diferencia entre la señal analítica y el ruido, se seleccionó un voltaje de 600 V para el resto de trabajo experimental. Voltajes superiores a 650 V no se pueden usar ya que el detector se satura.

Voltaje del detector: 600 V

2.6.2 Ancho de rendija

La apertura de las rendijas de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre el analito soportado en la fase sensora y por tanto, sobre la intensidad de emisión de éste. La apertura de la rendija de emisión influye sobre la cantidad de luz que llega al detector. Los valores de ambas rendijas en el equipo instrumental utilizado pueden adquirir valores comprendidos entre 0.5 y 16 nm, tanto para la excitación como para la emisión.

Para estudiar el efecto de la anchura de las rendijas sobre la señal analítica se inyectó en el sistema de flujo una muestra de 150 ng/mL de propranolol a pH 4 y se fijaron el resto de los parámetros instrumentales a los valores óptimos ya establecidos variando la anchura de las rendijas y barriendo todas las posibilidades. Se realizaron tres réplicas para cada una de las anchuras de rendija ensayadas y el estudio se encuentra reflejado en la Figura III-11.

Como se observa en la figura, un aumento de la anchura de las rendijas provoca un aumento de la respuesta del optosensor, obteniéndose la mayor diferencia cuando la anchura de las rendijas es de 4 nm, tanto para la excitación como para la emisión. Aperturas de rendija mayores a las seleccionadas no se pueden estudiar ya que saturan la respuesta del detector.

Ancho de rendijas: 4/4 nm

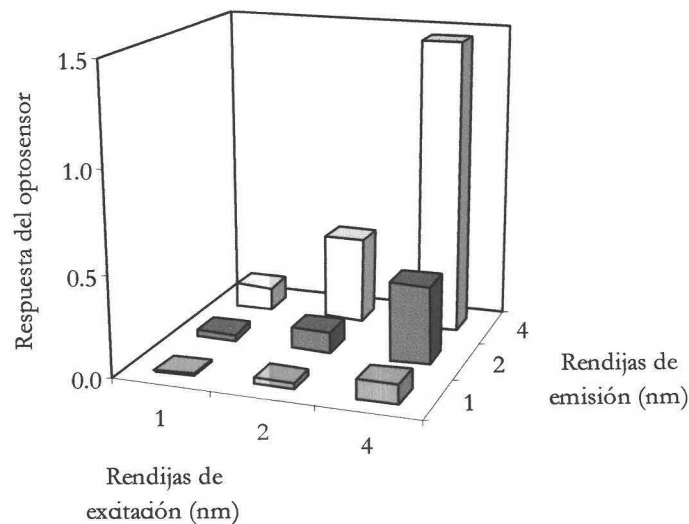


Figura III-11. Influencia del ancho de rendija en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL. pH=4 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

2.6.3 Resolución

La resolución es el tiempo que transcurre entre las medidas realizadas por el instrumento y afecta a la forma y definición de los diagramas y a la repetibilidad de la respuesta del optosensor. Para ver la influencia de la resolución sobre estos parámetros se inyectó en el sistema una muestra de 150 ng/mL de propranolol a pH 4 y se fijaron los parámetros instrumentales a las condiciones óptimas establecidas variando la resolución del equipo. El estudio se encuentra reflejado en la Figura III-12.

Como se observa en la figura, la resolución afecta muy levemente a la respuesta del optosensor, pero sí afecta considerablemente al error de las medidas, por lo que para tener un número significativo de puntos en la medida de cada muestra analizada y definir adecuadamente los picos de los diagramas y así tener un error adecuado, se fijó una resolución de 5 s.

Resolución: 5 s

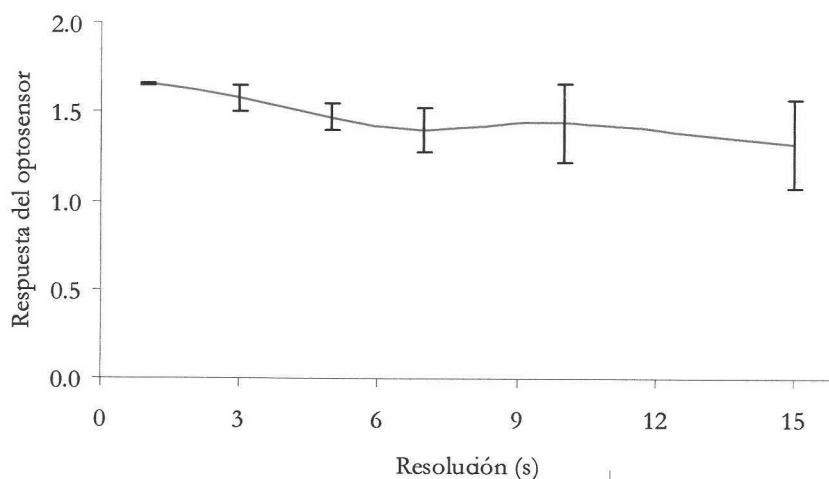


Figura III-12. Influencia de la resolución del equipo en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL. pH=4 fijado con HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

2.7 Optimización de las variables experimentales

Establecidos los parámetros instrumentales, se procedió a estudiar la influencia de las variables experimentales para establecer los valores óptimos de las variables químicas que afectan al optosensor propuesto. Las variables estudiadas han sido: pH y tipo y concentración de disolución reguladora.

2.7.1 Influencia del pH

El pH afecta tanto a la fluorescencia intrínseca del propranolol, ya que tiene grupos protonizables, como a la interacción de éste con la fase sensora.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones portadoras y de muestras de 150 ng/mL de propranolol, con pHs comprendidos entre 2.0 y 13.0 ajustados con HCl o NaOH. Se realizaron 3 réplicas para cada muestra medida y los resultados obtenidos se muestran en la Figura III-13.

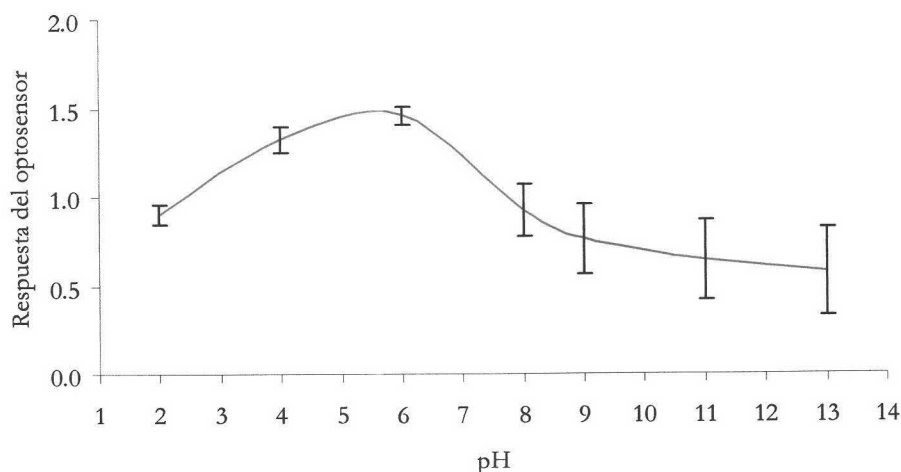


Figura III-13. Influencia del pH en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

Se observa en dicha figura que la mejor diferencia señal-ruido se obtiene en el intervalo de pHs comprendido entre 5.5 y 6.5, seleccionando 6 como pH de trabajo.

pH: 6.0

2.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora

Es necesario elegir una disolución reguladora que fije el pH y la fuerza iónica del medio. Por ello, se estudió el efecto que producían sobre la diferencia señal-ruido el uso de diferentes disoluciones reguladoras disponibles al pH de trabajo. Las disoluciones ensayadas fueron: ftalato ácido de potasio/HCl y $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones portadoras y muestras de 150 ng/mL de propranolol a pH 6 a una concentración de 5 mM de cada una de las disoluciones reguladoras estudiadas, y se registró la variación de la respuesta del optosensor y del error de las medidas a las condiciones instrumentales óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III-14.

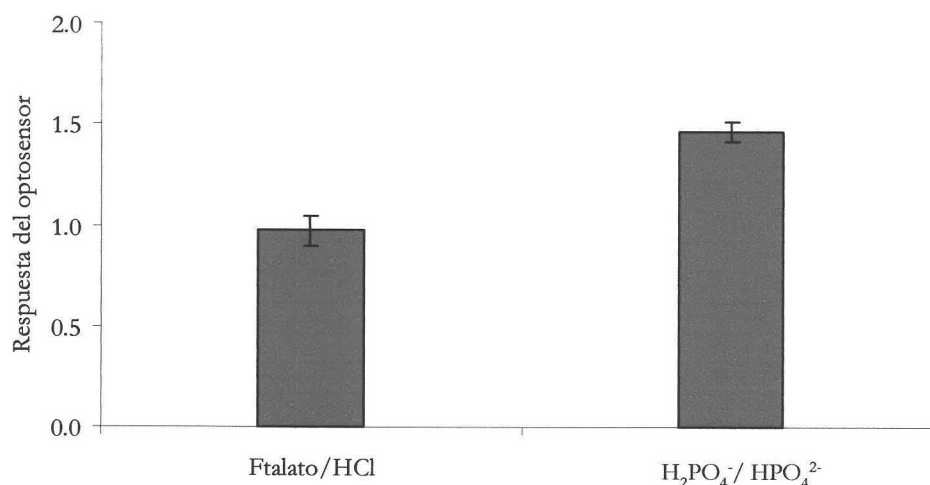


Figura III-14. Efecto del tipo de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL. pH=6. HCl. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, volumen de muestra inyectado 2 mL.

En esta figura se observa que la respuesta del optosensor es mayor cuando se usa como disolución reguladora H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻, por lo que se seleccionó ésta para el resto de trabajo experimental.

Disolución reguladora: H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻

Una vez seleccionado el tipo de disolución reguladora, es necesario fijar la concentración óptima para que la fuerza iónica de la disolución portadora y las muestras sea la misma.

Fueron ensayadas diferentes concentraciones de disolución reguladora de H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ de pH 6.0 adicionadas al portador y las muestras, simultáneamente, registrando tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura III-15.

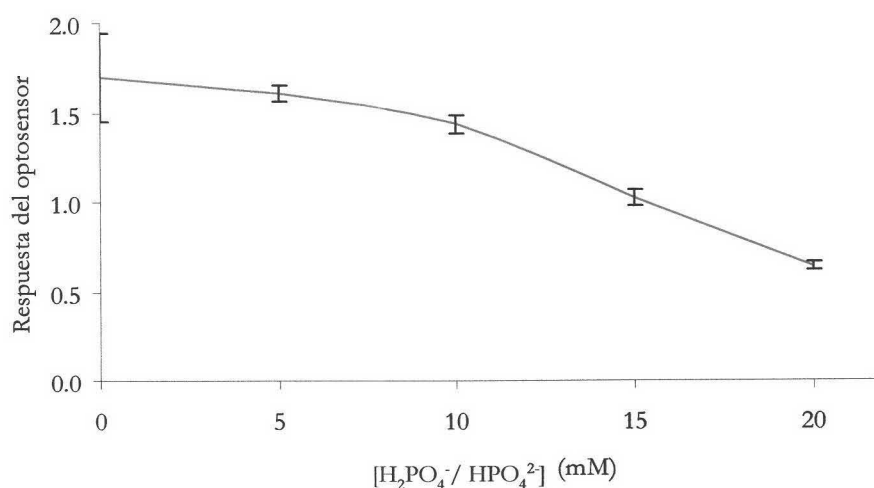


Figura III-15. Influencia de la concentración de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. [Propranolol]=150 ng/mL, disolución reguladora empleada H₂PO₄⁻/ HPO₄²⁻ a pH 6. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min, 3 inyecciones de muestra de volumen 2 mL.

Como se puede observar en esta figura, la concentración de la disolución reguladora afecta a la respuesta del optosensor y a la repetibilidad de las medidas, de modo que un aumento de la fuerza iónica del portador y las muestras disminuye la respuesta del optosensor pero también disminuye el error en las medidas. Se seleccionó una concentración de disolución reguladora de 5 mM pues tenemos una elevada diferencia señal-ruido y un error adecuado.

[H₂PO₄⁻ / HPO₄²⁻]: 5 mM

2.8 Optimización de las variables de flujo

Estudiados los parámetros instrumentales y variables experimentales, se procedió al estudio de las variables que afectan al sistema de flujo. Concretamente, las variables más importantes son: velocidad de flujo y volumen de inyección de muestra.

2.8.1 Efecto de la velocidad de flujo

Para que tenga lugar la emisión fluorescente del propranolol en fase sólida, es necesario que el analito que pasa a través de la resina quede retenido durante un tiempo. Este proceso, al ser de naturaleza cinética, está determinado por la velocidad a la que pasa el portador arrastrando al analito, afectando a la respuesta final del optosensor. Además lógicamente también influye sobre el tiempo de respuesta del mismo.

Para evaluar dicha influencia se varió la velocidad de flujo del portador, en las condiciones óptimas anteriormente fijadas, realizando sucesivas inyecciones de una disolución de 150 ng/mL de propranolol registrándose la respuesta y el tiempo de respuesta para cada flujo. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura III-16.

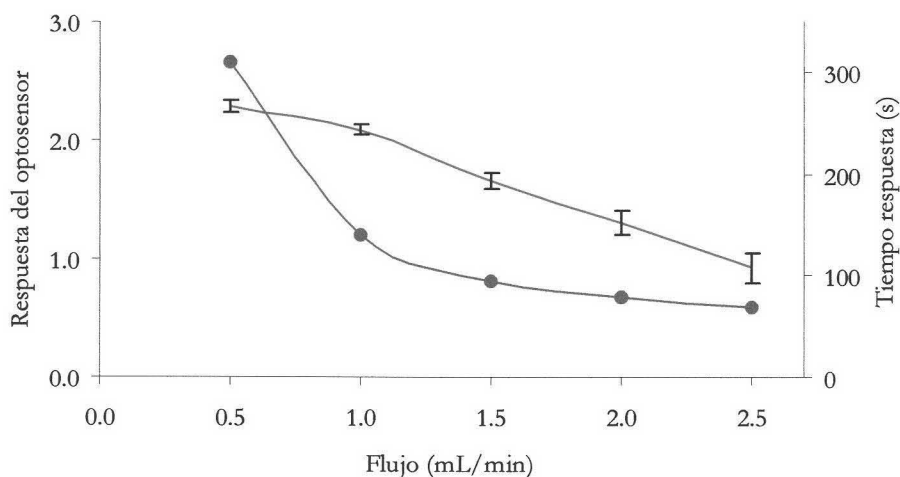


Figura III-16. Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor (● tiempo de respuesta). [Propranolol]=150 ng/mL. [H₂PO₄⁻/ HPO₄²⁻ a pH 6] 5 mM. λ_{exc/em} 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Volumen de muestra inyectado 2 mL.

Como se observa en la figura anterior, a velocidades de flujo pequeñas se consigue una mayor señal analítica a costa de mayores tiempos de respuesta y viceversa. Por tanto, se adoptó una solución de compromiso entre una señal analítica útil y un tiempo de respuesta favorable, eligiendo como velocidad de flujo óptima la de 1.5 mL/min.

Velocidad de flujo: 1.5 mL/min

2.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra

El volumen de inyección de muestra afecta a la respuesta del optosensor y al tiempo de respuesta. Para investigar dicha influencia, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección del analito (válvula A) y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 150 ng/mL de propranolol, registrándose la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor para cada volumen inyectado (véase Figura III-17).

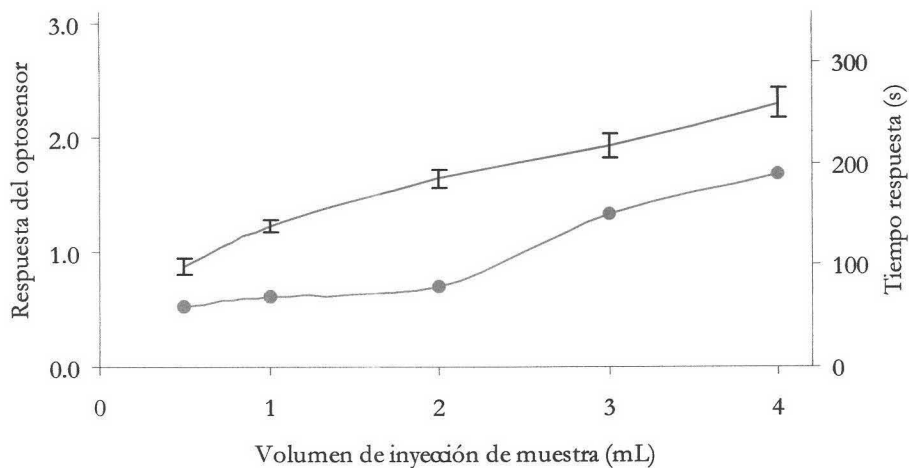


Figura III-17. Efecto del volumen de inyección de muestra en la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor (● tiempo de respuesta). [Propranolol]=150 ng/mL. $[H_2PO_4^- / HPO_4^{2-}]$ a pH 6] 5 mM. $\lambda_{exc/em}$ 300/338 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 1.5 mL/min.

Como se puede observar, un aumento del volumen de inyección de muestra provoca un aumento considerable de la señal analítica aunque también provoca un aumento del error del optosensor y, además, un aumento del volumen lleva implícito un aumento del tiempo de respuesta. Por tanto, se seleccionó un volumen de inyección de muestra de 2 mL, pues se obtiene una buena diferencia señal-ruido con un tiempo de respuesta y un error del optosensor adecuado.

Volumen de inyección de muestra: 2 mL

2.9 Efecto de la temperatura

La emisión fluorescente, como todos los fenómenos luminiscentes, se ve afectada por cambios en la temperatura. Además, la temperatura también puede afectar a la interacción entre el analito y la fase sensora. Por ello, se realizó un estudio de la influencia de la misma sobre la respuesta del optosensor de propranolol propuesto.

Para ello, se preparó una disolución portadora y una muestra de 150 ng/mL de propranolol en las condiciones experimentales óptimas anteriormente comentadas ($[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}]$ a pH 6]=5 mM) y se registró la señal fluorescente en las condiciones instrumentales óptimas ($\lambda_{\text{exc/em}}=300/338$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s) mientras el sistema circulaba con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min inyectando 3 réplicas de 2 mL de muestra para cada una de las temperaturas estudiadas.

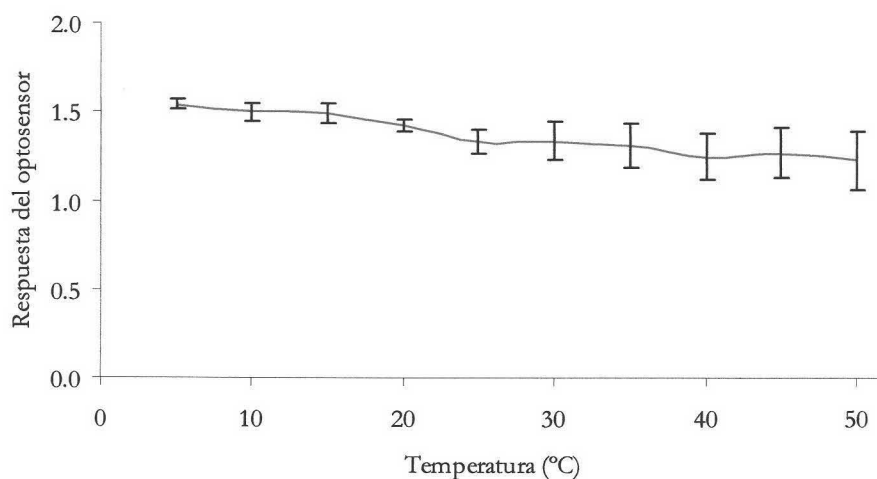


Figura III-18. Influencia de la temperatura en el optosensor de propranolol.

Como se observa en la Figura III-18, el optosensor de propranolol propuesto no se ve influenciado, en gran medida, por la temperatura, por lo que para su utilización no es necesario termostatar el compartimento de muestra del espectroluminómetro.

3 Características analíticas del método

Una vez seleccionada la fase sensora y la disolución regeneradora, optimizados los parámetros instrumentales y variables experimentales y FIA, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, la recta de calibrado y los parámetros de fiabilidad, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*⁷⁹.

3.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6 con agua bidestilada hasta una concentración de 5 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de propranolol en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6 en una concentración de 5 mM). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 1.5 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: $\lambda_{\text{exc/em}}=300/338$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de propranolol preparadas regenerando la fase sensora con 250 μL de acetonitrilo/ H_2O 80% v/v después de cada inyección de muestra.

3.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de propranolol, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla III-1 se muestran los datos obtenidos y en la Figura III-19 se muestra la influencia de la concentración de propranolol sobre la respuesta del optosensor.

79. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.

Tabla III-1. Réplicas obtenidas del calibrado

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	0.602	0.538	0.514
100	0.935	0.930	0.978
150	1.520	1.540	1.532
200	2.024	1.928	1.924
250	2.323	2.363	2.377

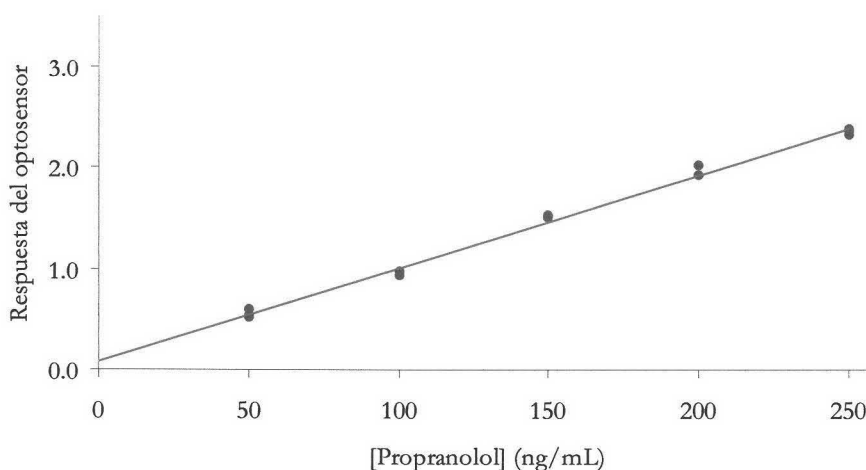


Figura III-19. Curva de calibrado del optosensor de propranolol.

3.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección (*L.D.*) y el límite de cuantificación (*L.C.*) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el *L.D.* y el *L.C.* La Tabla III-2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla III-2. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0040
Límite de detección (ng/mL)	1.3
Límite de cuantificación (ng/mL)	4.3
Rango dinámico lineal (ng/mL)	1.3-250.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en la Tabla III-3.

Tabla III-3. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0834
Desviación estándar (s_a)	0.0347
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	41.5
Pendiente (b)	0.0092
Desviación estándar (s_b)	0.0002
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	2.3
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0572
Coefficiente de correlación (r)	0.9967
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.34

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla III-4.

Tabla III-4. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
50	4.5
100	4.1
150	3.9
200	4.1
250	4.5

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla III-5.

Tabla III-5. Parámetros de fiabilidad

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	97.7	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	6.2	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	17.9	
Límite de cuantificación aproximado(ng/mL)	59.7	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	17.9-250	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	8.9
	100 ng/mL	4.4
	150 ng/mL	2.5
	200 ng/mL	2.0
	250 ng/mL	1.8

4 Aplicaciones del método propuesto

El propranolol es un principio activo presente en algunos medicamentos destinados al control de la hipertensión arterial, tratamiento de la ansiedad, etc., por lo que el método propuesto se ha aplicado a la determinación de propranolol en un preparado farmacéutico, Sumial 10.

Debido a que el propranolol está considerado por el Consejo Superior de Deportes como agente dopante se ha llevado a cabo también su determinación en orina con el fin de poder aportar un optosensor para el control de propranolol en los laboratorios de control del dopaje.

4.1 Determinación de propranolol en preparados farmacéuticos

El Sumial 10 es un fármaco que pertenece a los laboratorios Zeneca Farma S.A., se presenta en un envase de 50 comprimidos. La composición especificada por el fabricante

por comprimido es: clorhidrato de propranolol (D.C.I.) 10 mg y excipientes como: lactosa, carmín, gelatina y estearato magnésico.

4.1.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para una concentración de propranolol de 200 ng/mL, valor que está dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 5 comprimidos y se pesaron (siendo el peso medio de cada comprimido de 97.2 mg), se trituró y homogeneizó y se tomaron 24.3 mg del polvo del Sumial que se diluyeron a 100 mL con agua bidestilada. Se tomó la cantidad adecuada de cada disolución muestra para tener una concentración de propranolol de 200 ng/mL y se le añadió la cantidad adecuada de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6 para que tuviese una concentración de 5 mM y se enrasó con agua bidestilada.

Se realizaron 7 réplicas llevando a cabo el registro de la intensidad de fluorescencia a las condiciones instrumentales óptimas: $\lambda_{\text{exc/em}}=300/338$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; con una velocidad de flujo de 1.5 mL/min e inyectando 2 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla III-6.

Tabla III-6. Datos de réplicas en el análisis de propranolol en Sumial 10 mg

Muestra	Valor nominal declarado (mg/cápsula)	Valor encontrado (mg/cápsula)	% Recuperación
1	10	9.8	98.2
2	10	10.0	99.6
7	10	9.7	97.0
4	10	9.9	99.1
5	10	9.7	97.0
6	10	10.1	100.9
7	10	10.0	99.5
Media	10	9.9	98.7
D.E.R. (%)	-	-	1.5

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto puede usarse de forma rápida, simple, selectiva y sensible para la determinación de propranolol en preparados farmacéuticos.

5 Test de screening para el control de propranolol en muestras de orina

El propranolol está incluido en la lista de sustancias y grupos farmacológicos prohibidos y de métodos no reglamentados de dopaje en el deporte, establecida en la Resolución de 21 de marzo de 2000 del Consejo Superior de Deportes. Este compuesto se encuentra incluido en la sección I de la lista dentro del grupo I.1.6 Bloqueantes β -adrenérgicos.

Éstos se consideran únicamente prohibidos por una Federación deportiva española cuando a su juicio se considere que su consumo pueda modificar artificialmente el rendimiento deportivo de los deportistas o los resultados de las competiciones deportivas y cuando su correspondiente Federación Internacional lo tenga prohibido. Es decir, que la consideración de sustancia dopante no depende de su concentración en orina, sino de la presencia de éstos en la orina recogida para el control. Por lo tanto, el Laboratorio de Control del Dopaje del Consejo Superior de Deportes Español, laboratorio encargado del control del dopaje en España, informa a las Federaciones correspondientes la presencia de alguno de estos compuestos (confirmado por GC/MS) y no determina la cantidad en la que se encuentran, es decir, que sólo llevan a cabo el análisis cualitativo de los agente dopantes del Grupo I-6.

Además, el propranolol no es una sustancia prohibida en todos los deportes, sino sólo en aquellos en los que, a criterio de dichas Federaciones, influya sobre el rendimiento deportivo y/o el resultado de la competición, por ejemplo, es el caso de deportes de precisión como tiro.

Por tanto, como es necesario determinar la presencia de propranolol en la orina, se ha llevado a cabo el establecimiento de una recta de calibrado de propranolol en presencia de orina, de modo, que la mínima cantidad que nos permite detectar el optosensor propuesto sería el límite de detección obtenido. Además, si lo que queremos es determinar la cantidad de propranolol presente en la orina, podemos hacerlo por encima del límite de cuantificación.

5.1 Procedimiento operatorio

La orina de dos voluntarios de 25 y 26 años que nunca habían ingerido ningún medicamento que contuviese propranolol en su composición fue recogida en botes de polietileno esterilizados; lo mismo que la orina de un voluntario de 71 años que había ingerido medio comprimido de Sumial 10, recolectando ésta a las 24 horas de haber ingerido el fármaco. Todas las muestras fueron inmediatamente centrifugadas a 3700 r.p.m. durante 15 min y decantadas. Posteriormente fueron congeladas y conservadas a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de su análisis. En todo momento se siguieron las directrices recomendadas por la Comisión para la Investigación de los Riesgos para la Salud de los Compuestos Químicos en el Área de Trabajo⁸⁰.

5.2 Recta de calibrado del propranolol en presencia de orina

Para ello, la orina recolectada de uno de los voluntarios que no había ingerido propranolol se sometió al procedimiento operatorio anteriormente indicado y se prepararon varias disoluciones de concentraciones crecientes de propranolol en las condiciones experimentales óptimas, se le añadió una cantidad fija de orina, de forma que la dilución de la orina fuera 1:10. Se ajustaron las variables de flujo y los parámetros instrumentales óptimos y se registró la respuesta del optosensor para cada una de las disoluciones de propranolol en orina preparada. En la Tabla III-7 se muestran los datos obtenidos y en Figura III-20 se muestra la influencia de la concentración de propranolol sobre la respuesta del optosensor cuando está presente la orina en una dilución 1:10.

Tabla III-7. Réplicas obtenidas del calibrado en presencia de orina

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
0	-0.180	-0.182	-0.184
25	-0.053	-0.056	-0.062
50	0.064	0.074	0.065
75	0.181	0.183	0.180
100	0.304	0.302	0.298

80. J. Angerer y K.H. Schaller. "Analyses of hazardous substances in biological materials". Vol. 1, VCH, Weinheim, 1992.

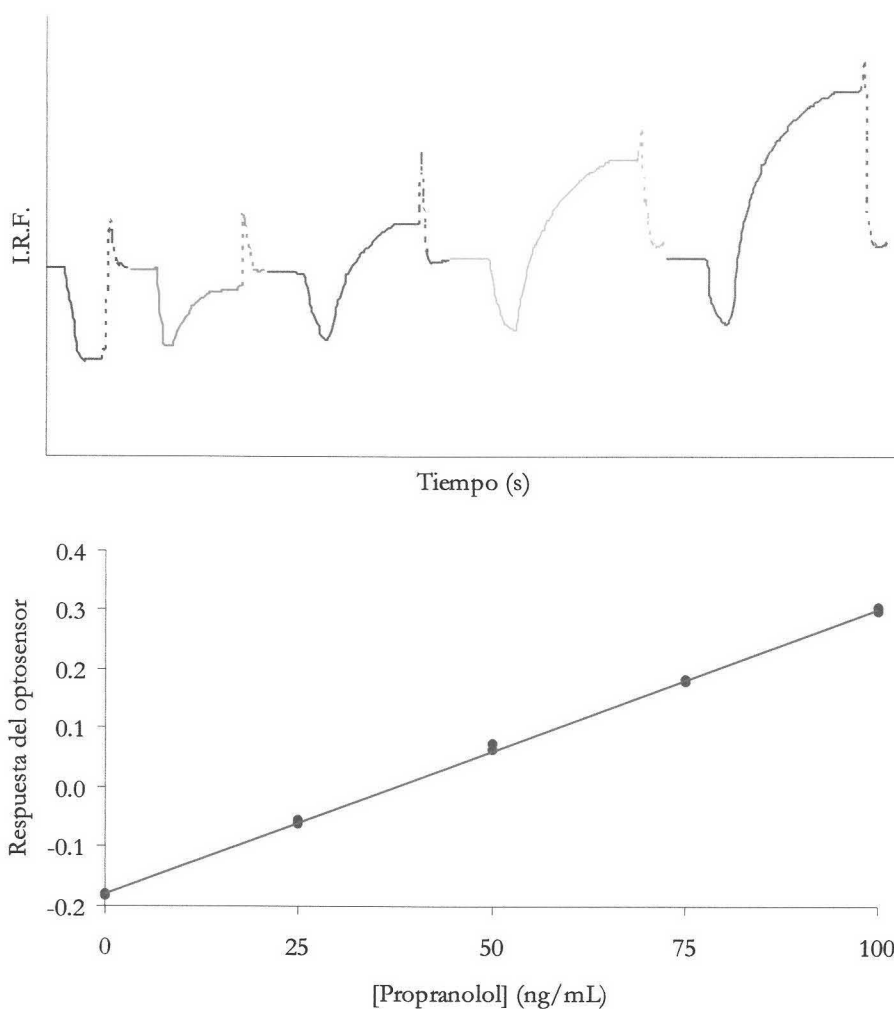


Figura III-20. *Fiograma y curva de calibrado del optosensor de propranolol en presencia de orina.*

5.3 Parámetros de fiabilidad

Los parámetros de calidad del calibrado en presencia de orina se han llevado a cabo según el criterio IUPAC y mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La Tabla III-8 muestra los resultados obtenidos con el calibrado en presencia de orina según el método de la IUPAC.

Tabla III-8. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC en el calibrado en presencia de orina

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0003
Límite de detección (ng/mL)	0.2
Límite de cuantificación (ng/mL)	0.7
Rango dinámico lineal (ng/mL)	0.2-100.0

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en la Tabla III-9.

Tabla III-9. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	-0.1787
Desviación estándar (s_a)	0.0021
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	-1.2
Pendiente (b)	0.0048
Desviación estándar (s_b)	0.0000
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	0.7
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0046
Coefficiente de correlación (r)	0.9997
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.9

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método en presencia de orina, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla III-10.

Tabla III-10. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
25	0.6
50	0.6
75	0.6
100	0.7

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla III-11.

Tabla III-11. Parámetros de fiabilidad

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	99.3	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	1.0	
Límite de detección (ng/mL)	2.1	
Límite de cuantificación (ng/mL)	7.0	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	2.1-100.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	25 ng/mL	2.5
	50 ng/mL	1.2
	75 ng/mL	0.8
	100 ng/mL	0.7

A la vista de los datos obtenidos, se puede decir que el optosensor propuesto para la determinación de propranolol en orina, se puede usar en el control del dopaje para detectar el consumo de éste por deportistas, siempre y cuando la concentración de propranolol en orina sea superior a 0.2 ng/mL. Si lo que queremos es cuantificar que cantidad de propranolol que hay en la orina recolectada, la concentración de éste debe ser

superior a 0.7 ng/mL, por lo que el optosensor propuesto es una potente herramienta para el análisis cualitativo y cuantitativo de propranolol en orina.

5.4 Selectividad del test de dopaje propuesto

Dado que un optosensor se debe considerar como un dispositivo para solucionar un problema analítico determinado, el estudio de sustancias que puedan interferir en la respuesta del optosensor propuesto deberá realizarse en base a los posibles interferentes que puedan ser encontrados en el medio donde se va a llevar a cabo la determinación.

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7) se usa habitualmente en la purificación de proteínas. La proporción de proteínas excretadas por un individuo vía urinaria depende de su reabsorción en los túbulos renales; la albúmina representa aproximadamente el 60% de las proteínas totales excretadas por los humanos vía urinaria debido a que no es completamente eliminada por la filtración de las células tubulares⁸¹.

Los valores de albúmina en orina pueden fluctuar entre 0 y 80 mg/L. Para evaluar el efecto de la presencia de proteínas en la orina sobre la respuesta del optosensor propuesto, tres niveles diferentes de albúmina (80, 160 y 800 mg/L) fueron añadidos a una muestra de orina que contenía propranolol. La Figura III-21 muestra los resultados obtenidos.

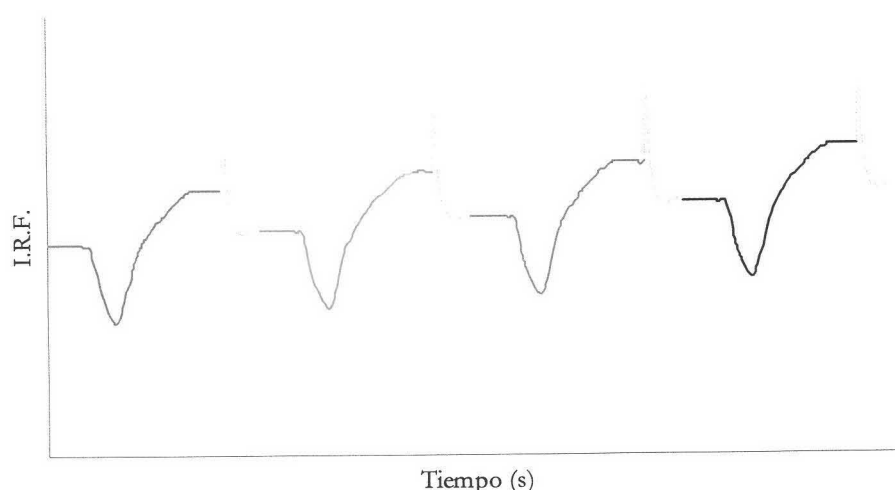


Figura III-21. Respuesta del optosensor propuesto en presencia de diferentes niveles de albúmina en orina. (— 0, — 80, — 160 y — 800 mg/L). Condiciones de medida óptimas.

81. C.A. Burtis, E.R. Ashwood. "Tietz Textbook of Clinical Chemistry". Ed. W.B. Saunders Company. Philadelphia (1999).

Como se observa en esta figura, la presencia de elevadas concentraciones de albúmina en orina no interfiere en la detección del propranolol y además, se demuestra que la albúmina, que interacciona con la fase sensora utilizada, no satura la resina y se regenera junto con el analito.

5.5 Aplicación al análisis cualitativo del test propuesto

Para corroborar la potencia del optosensor propuesto en la detección de la presencia de propranolol en orina, se inyectaron en el sistema las tres muestras de orina recolectadas observándose en la Figura III-22, como las muestras de orina de los voluntarios que no habían ingerido propranolol producen una disminución de la señal fluorescente del optosensor manteniendo esta señal constante mientras que la orina del voluntario que había ingerido media pastilla de Sumial 10 produce una disminución de la señal fluorescente mientras el bolo de muestra atraviesa la fase sensora y luego se produce un aumento de la señal debido a la retención del propranolol en la fase sensora.

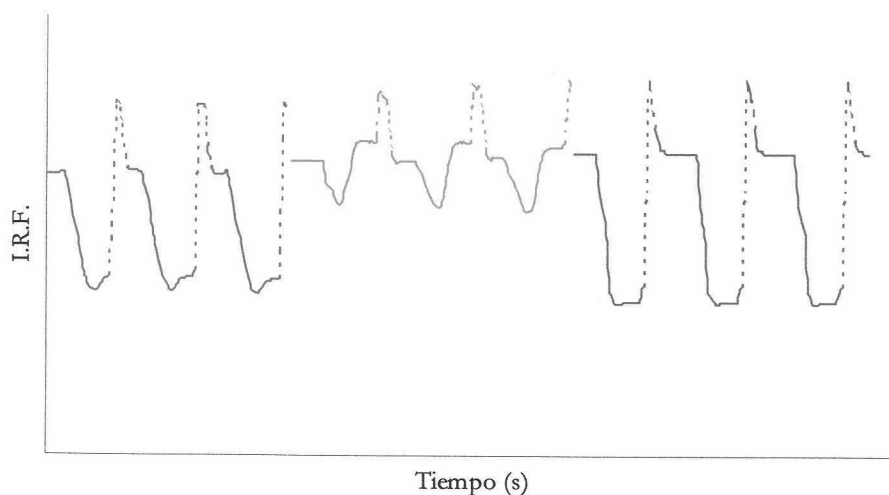

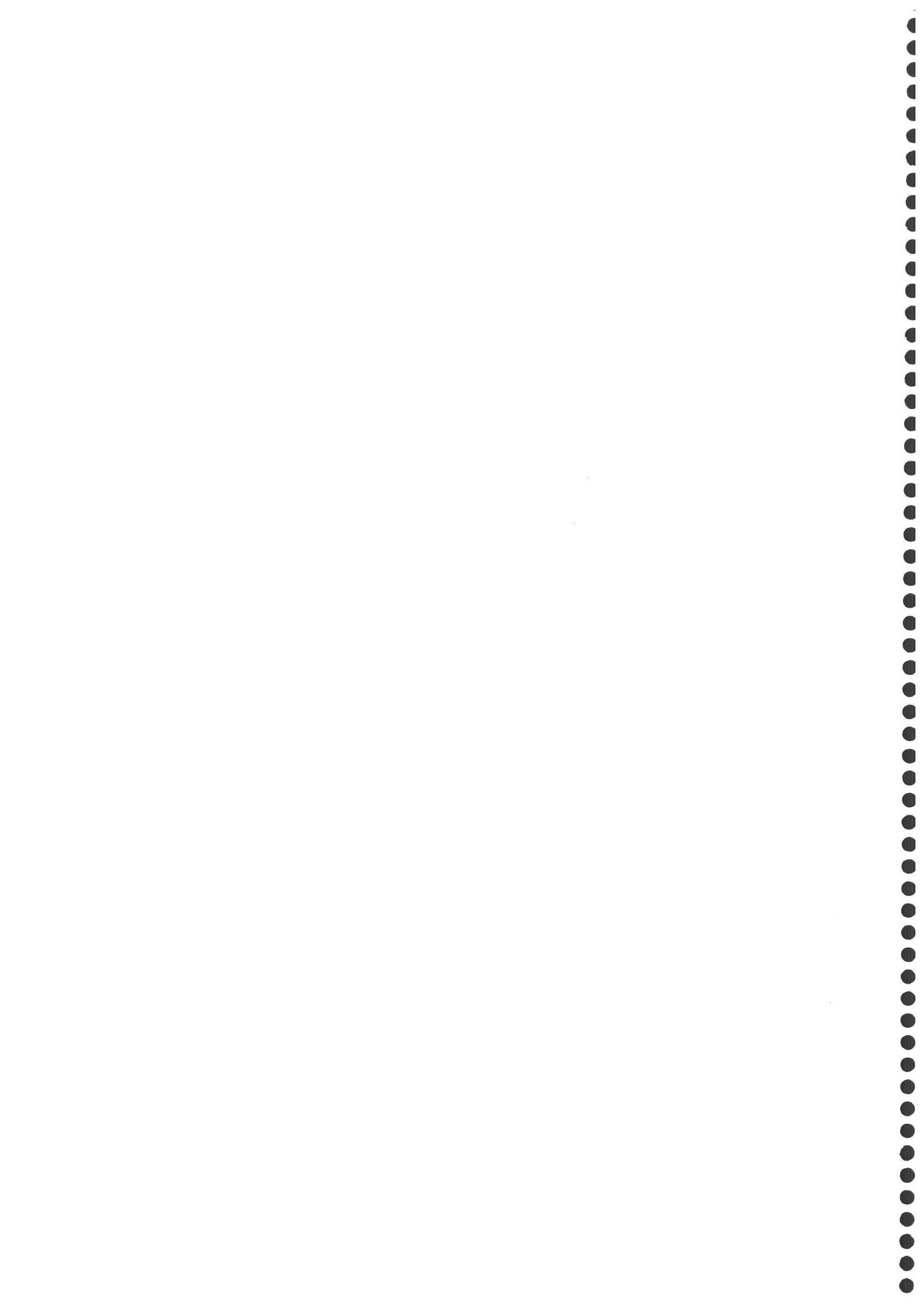


Figura III-22. Respuesta del optosensor propuesto a dos muestras de orina de voluntarios que no habían ingerido propranolol (— y —) y a la muestra de orina de un voluntario que había ingerido media pastilla de Sumial 10 al cabo de 24 horas de su ingestión (—).

Por esto, podemos decir, que el optosensor propuesto puede ser una buena herramienta para el control de dopaje por propranolol por aquellas Federaciones deportivas que lo consideren agente dopante y puede ser considerado como un test de screening para el control del dopaje por propranolol.

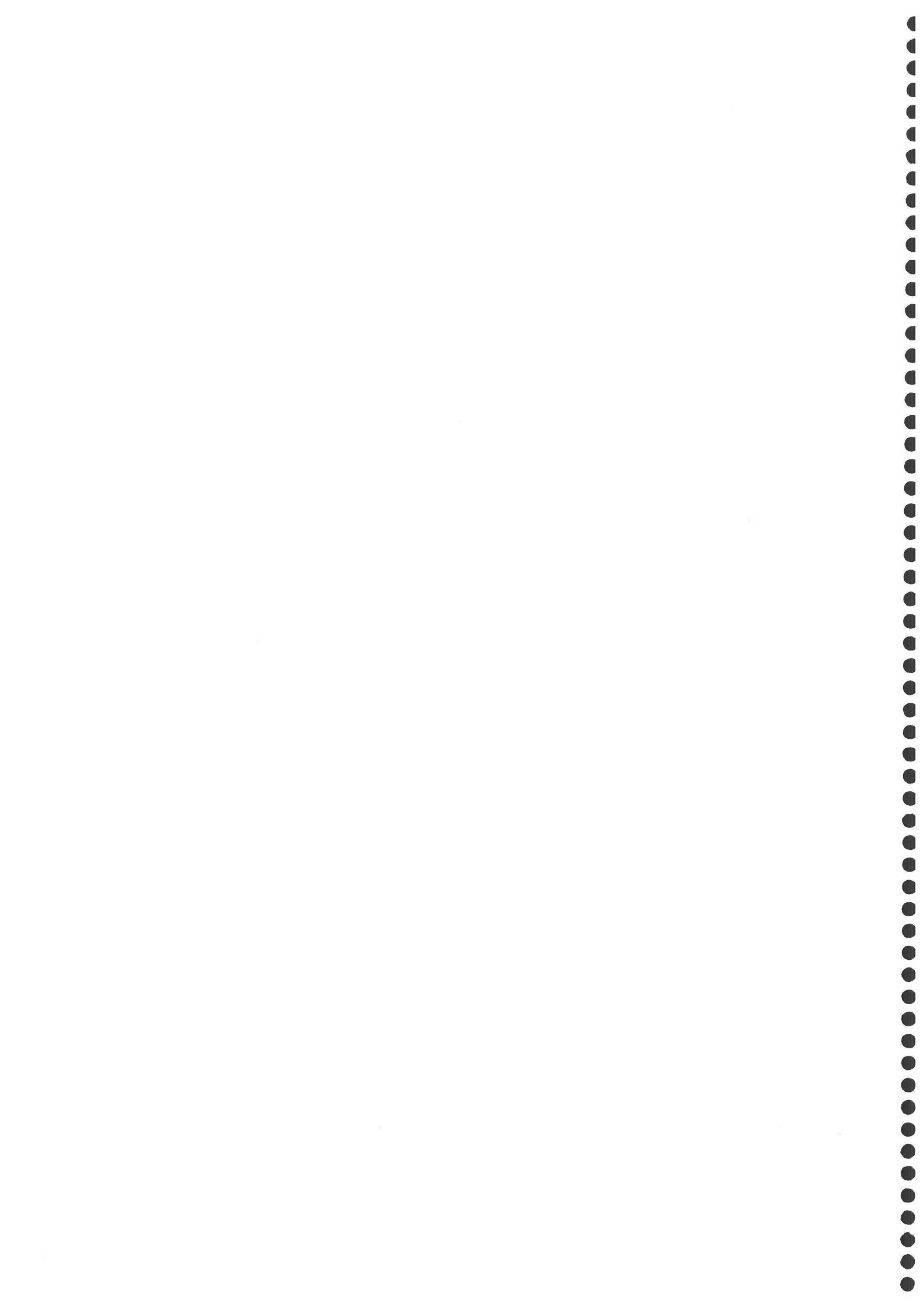


CAPÍTULO IV
Desarrollo de un optosensor de fibra
óptica para la determinación de
naproxeno y propranolol en muestras
de orina humana



**CAPÍTULO IV. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR DE FIBRA ÓPTICA
PARA LA DETERMINACIÓN DE NAPROXENO Y PROPRANOLOL EN
MUESTRAS DE ORINA HUMANA**

1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas	271
1.1 Desarrollo instrumental	271
1.2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas	273
1.3 Diseño del sistema de flujo	274
1.4 Elección de la disolución regenerante	275
2 Características analíticas de los métodos	275
2.1 Optosensor de fibra óptica para naproxeno.....	276
2.1.1 Procedimiento operatorio.....	276
2.1.2 Recta de calibrado.....	276
2.1.3 Parámetros de fiabilidad	277
2.2 Optosensor de fibra óptica para propranolol.....	279
2.1.1 Procedimiento operatorio.....	279
2.1.2 Recta de calibrado.....	280
2.1.3 Parámetros de fiabilidad	280
3 Comparación entre los optosensores convencionales y los optosensores de fibra óptica para la determinación de principios activos farmacológicos.....	283



1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

Una vez establecidos los optosensores convencionales para la determinación y control de naproxeno y propranolol en muestras biomédicas, en este capítulo, se pretende desarrollar un optosensor de fibra óptica como paso previo al diseño de un optrodo.

Este paso ha consistido en la implementación de las fases sensoras desarrolladas en los capítulos II y III, de la presente Memoria, en un dispositivo portátil de fibra óptica, reoptimizar los parámetros y variables que se vean afectados por el cambio instrumental y evaluar las características del nuevo dispositivo desarrollado.

1.1 Desarrollo instrumental

Para desarrollar un optosensor fluorimétrico de fibra óptica, es necesario disponer de una fuente de excitación, un selector de longitud de onda de excitación, un compartimiento de muestra, un selector de longitud de onda de emisión, un sistema de detección y un registrador. Como fuente de excitación se usó una lámpara continua de Xe de 150 W, los selectores de longitud de onda de excitación usados fueron filtros de corte (<340 nm y <310 nm para el NAP y propranolol, respectivamente), como compartimiento de muestra se usó una celda de flujo diseñada, los selectores de longitud de onda de emisión usados fueron filtros de corte (>340 nm y >325 nm para el NAP y propranolol, respectivamente), como sistema de detección un fotomultiplicador (R212-09 de Shimadzu) y para el procesamiento de los datos se usó una estación de trabajo de Shimadzu (referencia RF-5000).

Además fue necesario usar fibra óptica que transporte la luz de excitación de la lámpara al compartimiento de muestra y la emisión fluorescente al detector. Para ello, se diseñó un haz bifurcado de fibras ópticas formado por dos ramas de 5 fibras de 1.5 mm de diámetro, cada una, y constituidas por un núcleo de metacrilato de polimetileno y un revestimiento de un polímero fluorurado. Estas fibras poseían un número de apertura de 0.5, lo que corresponde a un semiángulo de apertura de 30° y tenían una longitud de 1 m. La Figura IV-1 muestra un esquema de un haz de fibras ópticas.

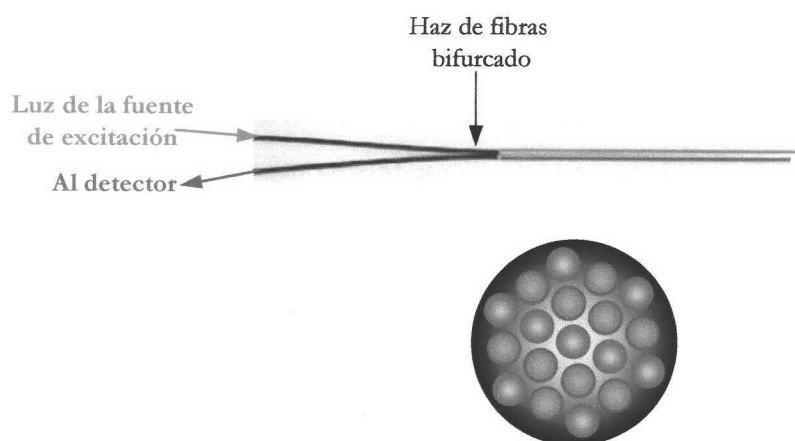


Figura IV-1. Esquema básico de un de fibras ópticas bifurcado.

Para llevar a cabo las conexiones de las fibras, a las entradas de la fuentes y del detector, se usaron unos adaptadores diseñados, que consisten básicamente en unos soportes planos con una rendija por donde se introduce el extremo del haz de fibras y queda sujeto con una tuerca. Es posible mover la posición de dicho extremo para optimizar la señal.

Las Figuras IV-2 y IV-3 muestran un esquema básico del diseño instrumental usado y de la celda de flujo diseñada, respectivamente.

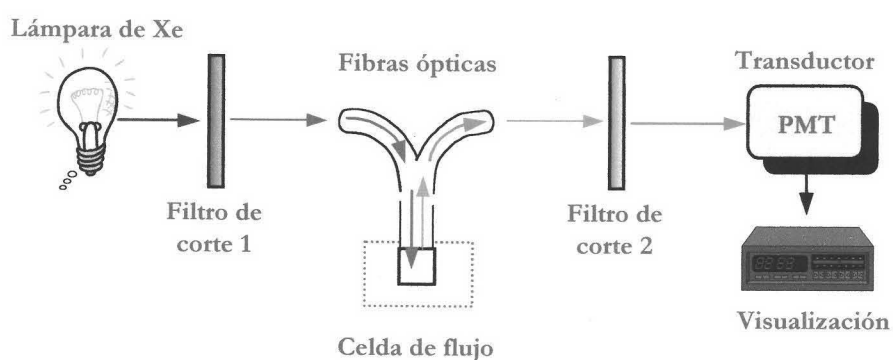


Figura IV-2. Diseño instrumental utilizado.

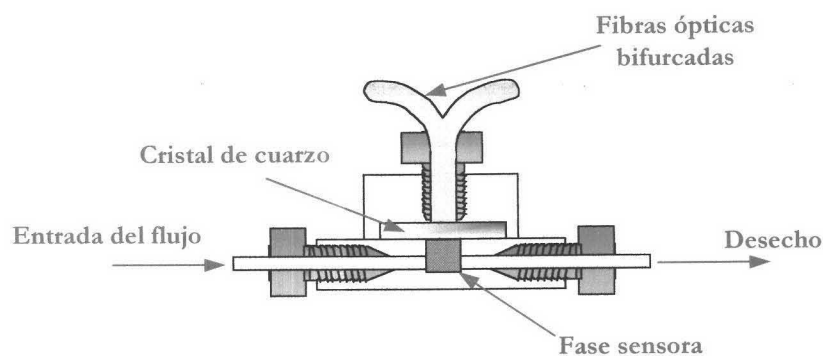


Figura IV-3. Celda de flujo utilizada.

Como se observa en la Figura IV-2, la luz proveniente de la lámpara es enfocada en un filtro de corte (<340 nm para el NAP y <310 nm para el propranolol, respectivamente) y éste está conectado con un haz de fibras ópticas, que transporta la luz monocromática obtenida a la celda de flujo. La emisión fluorescente se recolecta con otro haz de fibras cuyo final se fija a otro filtro de corte (>340 nm para el NAP y >325 nm para el propranolol, respectivamente) y esta luz incide directamente sobre el fotomultiplicador.

1.2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

Como condiciones experimentales se han mantenido las mismas que se establecieron para el optosensor convencional de naproxeno y propranolol desarrollados en los capítulos II y III de la presente Memoria, respectivamente, a excepción del volumen de inyección de muestra.

La reoptimización del volumen de inyección de muestra se llevó a cabo pues cuando se inyectaban volúmenes de 2 mL se producía una saturación de la fase sensora y por tanto, una sobrepresión en el sistema. Para ello, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección del analito (válvula A) y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 300 ng/mL de naproxeno y propranolol, registrándose la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor para cada volumen inyectado, seleccionándose un volumen de inyección de muestra de 1.5 mL en ambos casos.

En la Tabla IV-1 se resumen todas las condiciones experimentales óptimas para los optosensores de flujo desarrollados.

Tabla IV-1. Condiciones experimentales óptimas

	NAP	Propranolol
Fase sensora	Amberlita XAD 7	Amberlita XAD 7
Tamaño se resina	80-120 μm	80-120 μm
pH	2.5	6.0
Disolución reguladora	Glicina/HCl	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$
[Disolución reguladora]	15 mM	5 mM
Velocidad de flujo	2.0 mL/min	1.5 mL/min
Volumen de inyección de muestra	1.5 mL	1.5 mL
Temperatura de trabajo	No afecta	No afecta

1.3 Diseño del sistema de flujo

El sistema de flujo propuesto, si bien ha sido descrito en la introducción y en la parte experimental, presenta una serie de particularidades propias del sistema en estudio. Concretamente consta de (véase Figura IV-4):

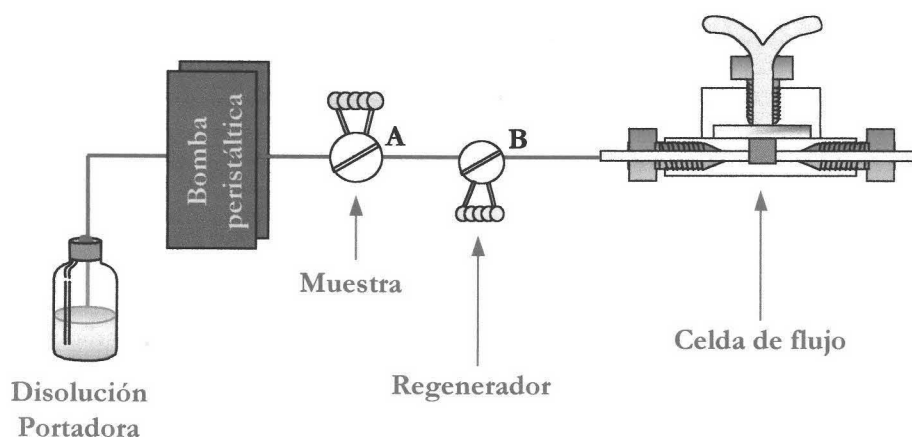


Figura IV-4. Sistema de flujo utilizada.

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.

- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen conocido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle de inyección.
- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor de fibra óptica es la celda de flujo especialmente diseñada para este dispositivo, en la que se empaqueta la fase sensora seleccionada y se conecta con la fibras ópticas bifurcadas que transportan la luz de excitación y emisión.

1.4 Elección de la disolución regenerante

Como se ha demostrado en los capítulos anteriores, la interacción del naproxeno y el propranolol con la fase sensora es irreversible en las condiciones de trabajo, por tanto, se usaba una disolución de acetonitrilo en agua al 80% v/v como disolución regenerante.

En este caso, esta disolución ataca las conexiones de la celda de flujo y a la fibra óptica por lo que fue necesario utilizar un disolvente orgánico con menor poder disolvente que el acetonitrilo. Para ello, se ensayaron disoluciones en agua de etanol y metanol para regenerar eficientemente el sistema, observándose que para el naproxeno, el sistema se regeneraba eficientemente usando una disolución de etanol en agua al 85% v/v y para el propranolol una disolución de metanol en agua al 90% v/v.

Disolución regenerante:
NAP: Etanol/H₂O 85% v/v
Propranolol: Metanol/H₂O 90% v/v

2 Características analíticas de los métodos

En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, la recta de calibrado y los parámetros de fiabilidad, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*¹.

1. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". Anal. Lett., 26 (1993) 1243.

2.1 Optosensor de fibra óptica para naproxeno

2.1.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la celda de flujo diseñada y ésta se conectó a la fibra óptica bifurcada. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de naproxeno en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de glicina/HCl a pH 2.5 en una concentración de 15 mM). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: voltaje del detector 500 V y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de naproxeno preparadas, regenerando la fase sensora con 250 μL de etanol/ H_2O al 85% v/v después de cada inyección de muestra.

2.1.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de naproxeno, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla IV-2 se muestran los datos obtenidos y en la Figura IV-5 se muestra la influencia de la concentración de naproxeno sobre la respuesta del optosensor.

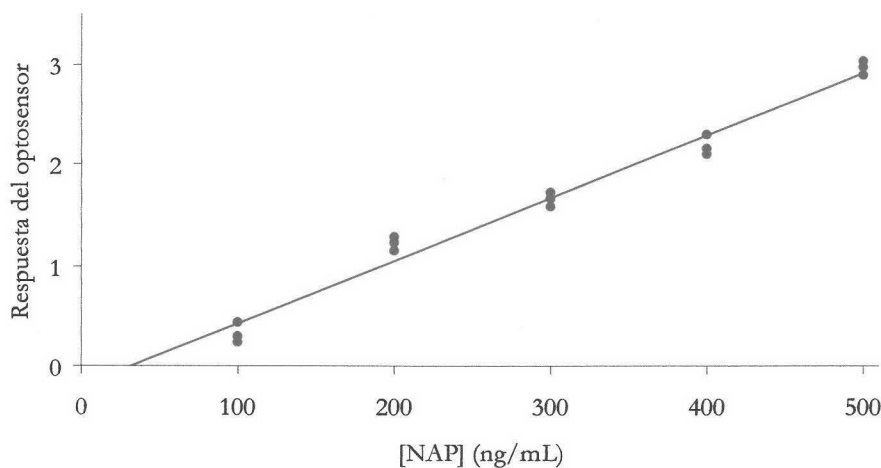


Figura IV-5. Curva de calibrado del optosensor de fibra óptica de naproxeno.

Tabla IV-2. Réplicas obtenidas del calibrado

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
100	0.29	0.23	0.44
200	1.24	1.15	1.30
300	1.67	1.60	1.73
400	2.11	2.16	2.30
500	2.90	3.05	2.98

2.1.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ La Tabla IV-3 muestra los resultados obtenidos.

Tabla IV-3. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.1302
Límite de detección (ng/mL)	62.0
Límite de cuantificación (ng/mL)	206.7
Rango dinámico lineal (ng/mL)	62.0-500.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en la Tabla IV-4.

Tabla IV-4. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	-0.2053
Desviación estándar (s_a)	0.0837
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	-40.77
Pendiente (b)	0.0063
Desviación estándar (s_b)	0.0003
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	4.0
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.1383
Coefficiente de correlación (r)	0.9896
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	97.94

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla IV-5.

Tabla IV-5. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
100	16.4
200	14.2
300	13.9
400	14.3
500	16.2

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla IV-6.

Tabla IV-6. Parámetros de fiabilidad

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	96.0	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	22.0	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	75.4	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	251.3	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	22.0-500.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	100 ng/mL	19.6
	200 ng/mL	6.2
	300 ng/mL	4.7
	400 ng/mL	3.8
	500 ng/mL	3.2

2.2 Optosensor de fibra óptica para propranolol

2.2.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 7 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la celda de flujo diseñada y ésta se conectó a la fibra óptica bifurcada. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6 con agua bidestilada hasta una concentración de 5 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de propranolol en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^- / \text{HPO}_4^{2-}$ a pH 6 en una concentración de 5 mM). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 1.5 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min, se fijaron las condiciones instrumentales, voltaje del detector 500 V, y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de propranolol preparadas regenerando la fase sensora con 250 μL de metanol/ H_2O 90% v/v después de cada inyección de muestra.

2.2.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de propranolol, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla IV-7 se muestran los datos obtenidos y en la Figura IV-6 se muestra la influencia de la concentración de propranolol sobre la respuesta del optosensor.

Tabla IV-7. Réplicas obtenidas del calibrado

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
150	0.33	0.32	0.30
250	0.63	0.71	0.73
300	0.81	0.76	0.71
400	1.16	1.21	1.26
500	1.47	1.50	1.45

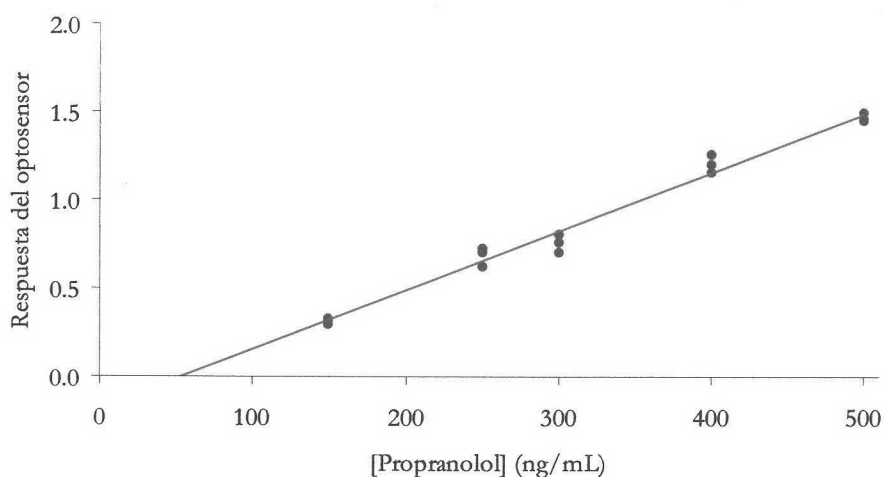


Figura IV-6. Curva de calibrado del optosensor de fibra óptica de propranolol.

2.2.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ La Tabla IV-8 muestra los resultados obtenidos.

Tabla IV-8. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0805
Límite de detección (ng/mL)	71.0
Límite de cuantificación (ng/mL)	236.7
Rango dinámico lineal (ng/mL)	71.0-500.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en la Tabla IV-9.

Tabla IV-9. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	-0.1825
Desviación estándar (s_a)	0.0416
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	-22.8
Pendiente (b)	0.0034
Desviación estándar (s_b)	0.0001
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	3.6
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0569
Coefficiente de correlación (r)	0.9915
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	98.3

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla IV-10.

Tabla IV-10. Desviaciones estándares

Concentraciones (ng/mL)	s
150	12.4
250	11.0
300	10.8
400	11.3
500	12.5

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla IV-11.

Tabla IV-11. Parámetros de fiabilidad

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	96.4	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	17.0	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	68.4	
Límite de cuantificación aproximado(ng/mL)	228.0	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	68.4-500.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	150 ng/mL	8.3
	250 ng/mL	4.2
	300 ng/mL	3.9
	400 ng/mL	2.7
	500 ng/mL	2.5

3 Comparación entre los optosensores convencionales y los optosensores de fibra óptica para la determinación de principios activos farmacológicos

Como se deduce de los datos experimentales obtenidos en los capítulos II y III de la presente Memoria, las fases sensoras desarrolladas para la determinación de NAP y propranolol son fácilmente implementables en dispositivos de fibra óptica, como un primer paso para la obtención de un optrodo, fin último que se debe perseguir en el desarrollo de sensores.

La Tabla IV-12 muestra una comparativa de las características analíticas de los optosensores convencionales y optosensores de fibra óptica para la determinación de naproxeno y propranolol.

Tabla VI-12. Comparación de las características analíticas de los optosensores convencionales y de fibra óptica para la determinación de naproxeno y propranolol

	NAP		Propranolol	
	Convencional	Fibra óptica	Convencional	Fibra óptica
LD (ng/mL)	1.5	62.0	1.3	71.0
LC (ng/mL)	5.0	206.7	4.3	236.7
Sensibilidad analítica	6.5	22.0	6.2	17.0
D.E.R.(%)*	2.8	3.2	2.0	2.9
Tiempo de respuesta (s)	110	204	80	246

* para el punto intermedio de la recta de calibrado

La implemetación de las fases sensoras desarrolladas en equipos portátiles, basados en el uso de fibras ópticas, lleva consigo una disminución de la sensibilidad analítica y por tanto un aumento del límite de detección y cuantificación. Esto se debe, principalmente, al uso de fibras ópticas y de una celda de flujo diseñada en el laboratorio.



Para mejorar las características analíticas de los optosensores de fibra óptica, se debería, en primer lugar, disponer de ayuda de ingenieros electrónicos, que mejorasen el diseño instrumental potenciando la emisión fluorescente y mejorando las conexiones entre las fibras ópticas y los selectores de longitud de onda. Además, el diseño de una celda de

flujo donde se potenciara que la mayor cantidad de luz proveniente de la lámpara incidiese sobre la fase activa y que gran parte de la emisión fluorescente llegase al detector, mejoraría las prestaciones de estos sistemas.

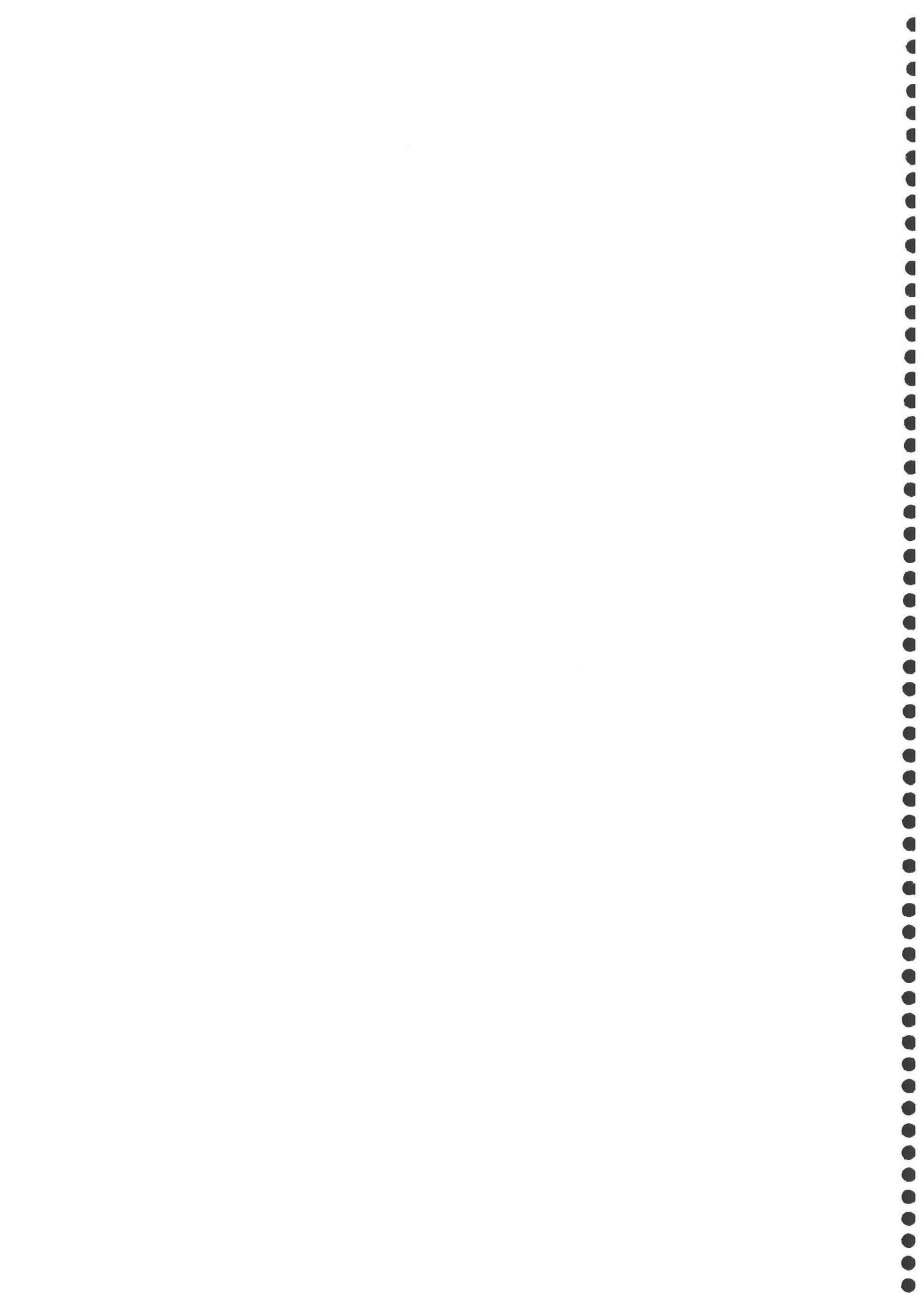
También hay que tener en cuenta, que el uso de disolventes orgánicos en la regeneración de las fases sensoras atacaban las uniones del sistema de flujo con la celda de flujo, a la propia celda y a las fibras ópticas. Por lo que el uso de materiales inertes frente a estos disolventes y un estudio adecuado de una película protectora de las fibras ópticas en la celda de flujo, mejorarían las características analíticas de los optosensores de fibra óptica propuestos.

De todas formas, se demuestra en este capítulo:

1. Que, aunque se disminuya la sensibilidad de los optosensores, éstos pueden ser usados en los laboratorios de rutina de análisis clínico o farmacológico, debido a que la concentración en la que se suelen encontrar los fármacos es del nivel de los pocos mg/L mientras que estos dispositivos presentan límites de detección del orden de los ng/mL.
2. Que los optosensores convencionales sirven, de forma eficiente, para caracterizar y obtener fases sensoras que, posteriormente, pueden ser implementadas en dispositivos portátiles y por tanto, son un paso inicial imprescindible para el desarrollo de sensores.
3. Y que para conseguir la máxima potencialidad analítica de los optosensores de fibra óptica, es necesaria la colaboración interdepartamental o multidisciplinaria entre los químicos analíticos y los ingenieros electrónicos.

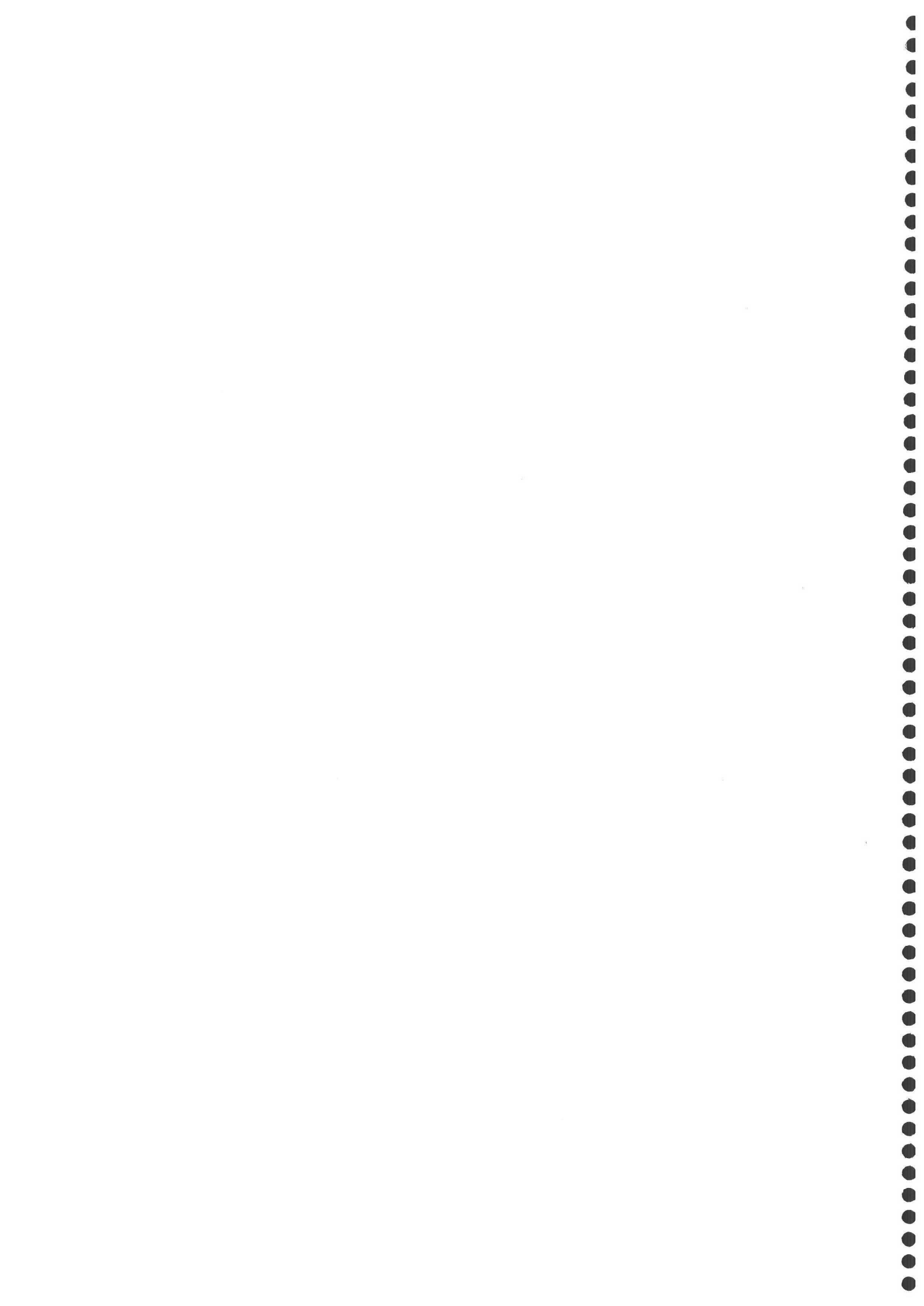


CAPÍTULO V
Caracterización fluorimétrica en fase
sólida de hidrocarburos aromáticos
policíclicos



CAPÍTULO V. CARACTERIZACIÓN FLUORIMÉTRICA EN FASE SÓLIDA DE HIDROCARBUROS AROMÁTICOS POLICÍCLICOS

1 Generalidades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos	289
1.1 Estructura molecular, nomenclatura, historia y propiedades	289
1.2 Fuentes de formación y distribución de los HAPs en la naturaleza.....	291
1.3 Carcinogénesis de los HAPs	293
1.4 Usos y formulaciones comerciales	296
1.5 Métodos analíticos.....	296
2 Establecimiento de las condiciones experimentales para el desarrollo de fases sensoras de hidrocarburos aromáticos policíclicos	308
2.1 Espectros de los HAPs en disolución	308
2.2 Parámetros instrumentales	309
2.3 Estudios preliminares de optimización de las variables experimentales....	309
2.4 Optimización de variables experimentales.....	316
2.5 Conclusiones derivadas del anterior estudio experimental.....	324



1 Generalidades de los hidrocarburos aromáticos policíclicos

1.1 Estructura molecular, nomenclatura, historia y propiedades




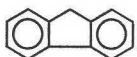




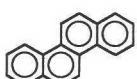
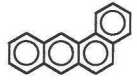
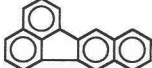
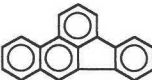



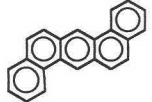
Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) son una clase compleja de compuestos constituidos por tres o más anillos aromáticos que pueden estar unidos linealmente, angularmente o bien condensados. En la amplia bibliografía existente acerca de este tipo de compuestos se utilizan otras denominaciones como la de *compuestos aromáticos polinucleares*, *compuestos aromáticos policíclicos*, *materias orgánicas policíclicas* o *compuestos orgánicos policíclicos*, entre otras. En la presente Memoria se ha optado por emplear la más utilizada en la actualidad que es la de hidrocarburo aromático policíclico y como abreviatura HAP.

Los HAPs más simples son los homocíclicos, que sólo contienen carbono e hidrógeno en su estructura, pero son cientos los HAPs que existen con uno o varios grupos sustituyentes tales como alquilo, amino, cloro, ciano, hidroxilo, oxo o tio. En otro subgrupo, se sitúan los derivados heterocíclicos de los HAPs que contienen uno o varios heteroátomos en su estructura aromática, tales como nitrógeno, oxígeno o azufre.

Por tanto, en la actualidad, al hablar de HAPs se engloba a un gran número de compuestos, siendo los más estudiados e interesantes los que fueron seleccionados por la Agencia de Protección Medioambiental Americana (EPA). Estos HAPs son dieciséis y son los que se han estudiado en la presente Memoria. La Tabla V-1 muestra los HAPs seleccionados por la EPA ordenados por orden creciente de peso molecular así como su estructura, nombre, abreviatura y algunas características.

Los HAPs han sido compuestos ampliamente estudiados en los últimos tiempos debido a su potencialidad carcinogénica y/o mutagénica. Así, hace más de dos siglos, se observó cáncer de piel en los deshojadores y posteriormente en los trabajadores de factorías de alquitrán, por lo que el contacto frecuente con el hollín y alquitrán fue relacionado con la incidencia del cáncer de piel. Investigaciones posteriores indicaron que la actividad cancerígena de estos materiales podía estar relacionada con la presencia de HAPs en su composición y ésto fue corroborado demostrando con animales que los HAPs eran cancerígenos y/o mutagénicos.

Tabla V-1. Nombre y propiedades de los HAPs de la EPA

Nombre	Estructura química	Abreviatura	Peso molecular	Punto fusión (°C)	Actividad cancerígena
Naftaleno		NAPH	128.2	81	-
Acenaftileno		ACEN	152.2	92-93	-
Acenafteno		ACE	154.2	95	-
Fluoreno		FLU	166.2	115-116	-
Fenantreno		PHE	178.2	100	-
Antraceno		ANT	178.2	216	-
Fluoranteno		FLT	202.3	107	0
Pireno		PYR	202.3	150	0
Criseno		CHRY	228.3	254	+
Benzo(a)antraceno		BaA	228.3	156	+
Benzo(k)fluoranteno		BkF	252.3	217	-
Benzo(b)fluoranteno		BbF	252.3	168	++
Benzo(a)pireno		BaP	252.3	179	++++
Indeno(1,2,3-c,d)pireno		IcdP	276.3	-	+
Benzo(g,h,i)perileno		BghiP	276.3	278	+
Dibenzo(a,h)antraceno		DBahA	278.4	266	+++

- sin determinar; 0, inactivo; +, levemente activo; ++, moderadamente activo; +++, muy activo; +++++, extremadamente activo.

A partir de la publicación de estos resultados, fueron muchos los investigadores que se sumaron al estudio de los HAPs concluyendo en 1930 con la separación de dibenzo[a,h]antraceno como el primer HAP cancerígeno y en 1933 con la separación del benzo[a]pireno del alquitrán como uno de los HAPs con mayor actividad cancerígena¹.

Así investigadores de todo el mundo se dieron cuenta de la importancia de analizar, cualitativa y cuantitativamente, estos compuestos por lo que para conseguir este objetivo se han llevado a cabo grandes esfuerzos.

1.2 Fuentes de formación y distribución de los HAPs en la naturaleza

Los HAPs se forman generalmente durante la combustión incompleta o pirólisis de materia orgánica a través de la condensación de los radicales etilénicos generados en fase gaseosa, dando lugar a la síntesis de grandes moléculas de HAPs^{2,3}. Las condiciones más favorables para la formación de HAPs son durante la pirólisis de materia orgánica en un medio deficiente de aire y en un intervalo de temperaturas entre 650 y 900°C. Sin embargo, para la aromatización de materia orgánica no se requiere necesariamente una elevada temperatura.

Los HAPs pueden formarse por fuentes naturales o antropogénicas, aunque las últimas son, con diferencia, las que más contribuyen a la mayor presencia de este tipo de compuestos en la naturaleza.

Las fuentes naturales más relevantes de formación de HAPs son: volcanes, incendios forestales, en el proceso de carbonización y a través de síntesis vegetales o bacterianas. Así, la fracción de HAPs encontrados en sedimentos jóvenes marinos se cree que fue originada, en su mayor parte, por fuegos en bosques y praderas y que posteriormente fueron dispersadas por el viento.

Las emisiones, por fuentes antropogénicas, son las más abundantes en términos de emisiones globales anuales. Estas fuentes incluyen la pirólisis o combustión incompleta de combustibles fósiles (carbones, hollín, esquistos, petróleos y derivados) y también por combustión de basuras y maderas. Además de éstas, existen otras fuentes como los

-
1. T. Vo-Dinh. "Chemical Analysis: Chemical Analysis of Polycyclic Aromatic Compounds". Wiley, 1989, New York.
 2. G.M. Badger y R.W.L. Kimber. *J. Chem. Soc.*, 266 (1960).
 3. G.M. Badger y J. Novotny. *Nature*, 198 (1963) 1086.

derrames de crudos petrolíferos o refinados que contienen de forma natural a estos compuestos y por transformación del petróleo y carbón en sus industrias⁴. Así, se han detectado concentraciones de 33 ng/L en aire en algunos puestos de trabajo de baterías de hornos de coque⁵. Otras fuentes de contaminación son los alimentos cocinados a la parrilla, fritos, asados o ahumados⁶, así como el humo del tabaco⁷.

Debido a las bajas tensiones de vapor que presentan los HAPs, al descender la temperatura por debajo de 150°C, o bien condensan como micropartículas o son adsorbidos sobre las partículas existentes en los gases o humos. A temperatura ambiente los HAPs existen principalmente asociados a partículas en aerosoles y de esta manera pueden ser aerotransportados a largas distancias por la acción de los vientos. Así, presentes en los humos y gases de combustión, los HAPs llegan a la superficie terrestre a través de la lluvia, alcanzándose de esta manera las aguas superficiales y subterráneas y, por último, la cadena alimenticia. De este modo se explica que los HAPs sean contaminantes que puedan encontrarse en las partes más remotas de la Tierra, como por ejemplo en Barrow, Alaska, donde la concentración atmosférica media de 11 HAPs en los meses de marzo y agosto de 1979, fue de 1.2 y 0.16 ng/m³, respectivamente.

Por tanto, se puede afirmar que los HAPs pueden encontrarse en casi todas las partes: en el aire, en la tierra, en el agua y los alimentos y, concretamente, esta Memoria se ha centrado en el análisis de HAPs en diferentes tipos de aguas.

Los valores de los HAPs en aguas superficiales se encuentran entre 0.1 y 830 ng/L, aunque los valores habituales oscilan entre 2 y 50 ng/L. La concentración en este tipo de aguas es mayor que en aguas de bebida o subterráneas, debido a la presencia de sólidos suspendidos donde se adsorben los HAPs. Las aguas de manantial u otras surgencias son filtradas de forma natural al pasar por diversos terrenos quedando allí retenidos los HAPs.

Análogamente, los procesos de tratamiento (decantación y filtración) de las aguas potables retiran partículas, que se encuentran en suspensión, reduciendo las

-
4. W. Funk. Merck Spectrum, 2 (1991) 18.
 5. Encyclopaedia of Analytical Sciences, Academic Press Limited, 1995, Londres.
 6. N. Kazerouni, R. Sinha, C.H. Hsu, A. Greenberg y N. Rothman. "Analysis of 200 food items for benzo[a]pyrene and estimation of its intake in an epidemiologic study". Food Chem. Toxicol., 39 (2001) 423.
 7. C. Johnson y A. Greenberg. "Extraction and high-performance liquid chromatographic separation of selected pyrene and benzo[a]pyrene sulfates and glucuronides: preliminary application to the analysis of smokers' urine". J. Chromatogr. B, 728 (1999) 209.

concentraciones de estos hidrocarburos no rebasándose el valor límite de 200 ng/L (véase Tabla V-2).

Tabla V-2. Concentraciones habituales de los HAPs en aguas

Tipos de aguas	Concentración media (ng/L)	Intervalo (ng/L)
Agua superficial	8.0	0.1-830
Agua de manantial	1.2	0.2-6.9
Agua potable	2.8	0.1-62

Una propiedad directamente relacionada con su insolubilidad en agua, es su elevado coeficiente octanol/agua. Esto implica que presenta una elevada tendencia a solubilizarse en matrices orgánicas, lo que los hace especialmente nocivos para la salud humana, ya que tienden a preconcentrarse en tejidos y órganos.

1.3 Carcinogénesis de los HAPs

En 1775, Pott constató una frecuencia anormal de cáncer en deshollinadores, pero no es hasta principios del s. XX cuando se comprueba que individuos expuestos de manera continuada a productos derivados del alquitrán de hulla tienden a desarrollar años después de la exposición y en porcentajes anormalmente elevados, cáncer de piel.

En 1915, Yamaniwa e Ichikawa pusieron de manifiesto que el cáncer del alquitrán de hulla es originado por el contacto de la piel con determinados productos químicos, pues lograron producir tumores en conejos por aplicación prolongada sobre la piel de un destilado de alquitrán de hulla. Estos trabajos dieron pie a que en 1930, Kennaway y su Grupo de Investigación del Royal Cancer Hospital de Londres, demostraran el carácter carcinogénico del DBahA y que en 1933, se aislara el BaP del alquitrán, demostrándose que es uno de los HAPs con una mayor actividad carcinogénica. Posteriormente, muchos otros HAPs fueron sintetizados y establecido su carácter carcinogénico. También se ha demostrado que todos no tienen la misma actividad cancerígena y no todos han sido igualmente estudiados (véase Tabla V-1). Además, entre los no incluidos en la lista de

HAPs de la EPA hay muchos de los que se sospecha que son carcinogénicos o mutagénicos.

Entre los años 60 y 70, se estudiaron un gran número de HAPs homocíclicos para establecer su metabolismo tanto *in vitro* como *in vivo*. El conocimiento de las rutas metabólicas permite desvelar la formación de enlaces covalentes entre los HAPs, el ADN y proteínas, previo proceso de exposición a éstos. Los HAPs, pues, son productos precarcinogénicos ya que no producen generalmente cáncer en el lugar aplicado sino en tejidos distantes de donde se produce la actividad metabólica.

En la biotransformación de estos carcinógenos se forman compuestos electrófilos muy reactivos capaces de interactuar con el ADN y otras moléculas nucleofílicas⁸. Pullman fue el primero que asoció la carcinogenicidad con la estructura señalando que aquella se relacionaba con la presencia en la molécula de un doble enlace reactivo, situado en la llamada región K, sugiriendo que el proceso primario en la inducción del cáncer es una reacción de adición de compuestos presentes en el medio celular a la región K de la molécula (véase Figura V-1).

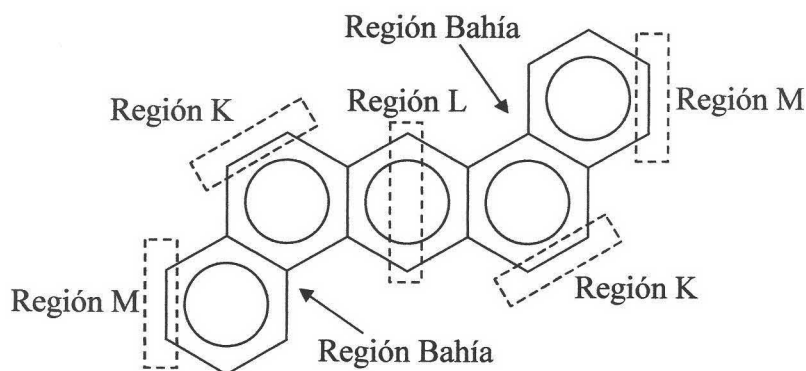


Figura V-1. Regiones moleculares típicas del dibenzo[a,h]antraceno.

En el caso del BaP y a través de una activación metabólica multietapa mediante enzimas específicas, especialmente el citocromo P450, se origina el 7,8-epóxido correspondiente, quien a su vez mediante epóxido-hidrolasas forma dioles estereoisómeros que, posteriormente, se transforman en 7,8-dihidrodiol-9,10-epóxido (véase Figura V-2).

8. V.J. Meléndez Colón, C.A. Smith, A. Seidel, A. Luch, K.L. Platt y W.M. Baird. "Formation of stable adducts and absence of depurating DNA-adducts in cells and DNA treated with the potent carcinogenic dibenzo[a,l]pyrene or its diol epoxides". Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America, 94 (1997) 13542.

Éste puede existir en cuatro posibles estereoisomerías de las que el producto con mayor actividad cancerígena es el (+)benzo[a]pireno-7,8-diol-9,10-epóxido. La reacción entre el carbono bencílico del epóxido y una posición nucleofílica del ADN da lugar a la formación de aductos. Estos aductos de ADN son los de mayor trascendencia, puesto que se cree que estas sustancias provocan reacciones que conducen a la mutación celular y/o transformaciones malignas, siendo este un posible mecanismo que explica los efectos cancerígenos de los HAPs en el cuerpo humano¹.

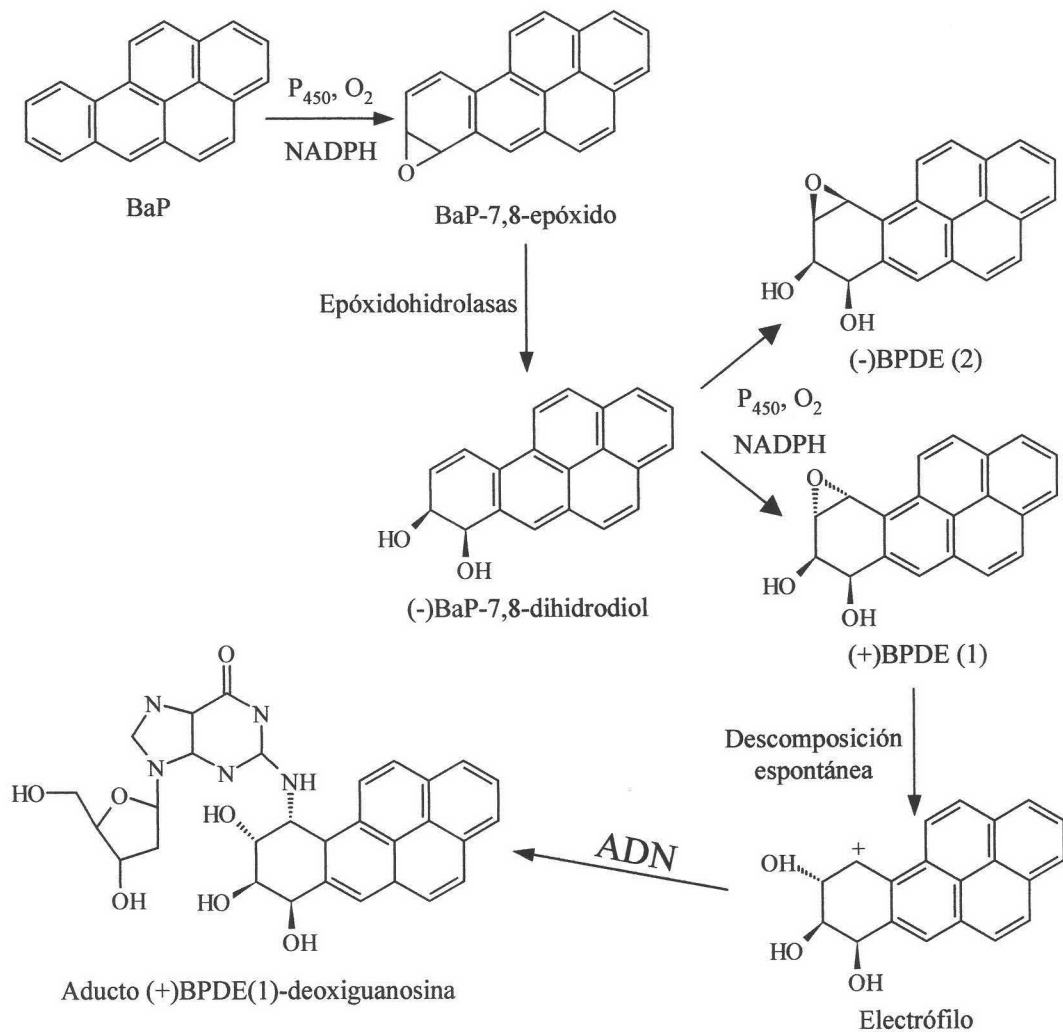


Figura V-2. Activación enzimática del benzo[a]pireno.

Existe otra teoría (teoría de la región bahía) que correlaciona carcinogenicidad con la estructura de esta zona de la molécula y con la facilidad de formación de iones carbonio en los epóxidos dioles originados. En cualquier caso, las propiedades carcinogénicas de los

HAPs dependen de su estructura; así, el benzo[a]pireno es muy cancerígeno mientras que su isómero, el benzo[e]pireno, no lo es.

1.4 Usos y formulaciones comerciales

Hay pocos usos conocidos para la mayoría de los HAPs, excepto para la investigación. Algunos de ellos se usan en medicamentos y para hacer plásticos, tintes y pesticidas.

1.5 Métodos analíticos

Al considerarse los HAPs como cancerígenos y/o mutagénicos y por actuar a unos niveles muy bajos de concentración, hace que su distribución en los más variados ambientes y productos sea objeto de notable atención por parte tanto de investigadores de diverso tipo, autoridades sanitarias y, cada vez con más fuerza, ciudadanos, asociaciones y grupos políticos^{9,10}.

Generalmente, debido a la complejidad de las muestras a analizar, es necesaria una separación previa a la detección en la que, las técnicas más empleadas son la cromatografía de gases, cromatografía líquida y cromatografía de fluidos supercríticos, aunque en la actualidad se están desarrollando muchos métodos electroforéticos para su determinación. Los sistemas de detección más comúnmente empleados son los métodos fotométricos, fluorimétricos o la espectrometría de masas.

Concretamente, la cromatografía de gases permite la determinación de sustancias que sean volátiles y estables térmicamente. Los HAPs son moléculas térmicamente estables pero su volatilidad va a depender tanto del número de átomos de carbono como del grado de condensación entre ellos. Se puede situar el límite de aplicación de la técnica en HAPs planares con estructuras muy condensadas en un máximo de 24 átomos de carbono¹¹⁻¹³. La

-
9. N.T. Edwards. "Polycyclic aromatic hydrocarbons in the terrestrial environment. A review". *J. Environmental Quality*, 12 (1983) 427.
 10. C.S. Davis, P. Fellin y R. Otson. "A review of sampling method for polyaromatic hydrocarbons in air". *Int. J. Air Pollution Control Hazardous Waste Management*, 37 (1992) 67.
 11. S. Lesage. "Characterization of groundwater contaminants using dynamic thermal stripping and adsorption thermal desorption-GC-MS". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 339 (1991) 516.
 12. A. Robbat, T.Y. Liu y M.D. Abraham. "On-site detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in contaminated soils by thermal-desorption gas-chromatography mass-spectrometry". *Anal. Chem.* 64 (1992) 1477.

sensibilidad, selectividad y poder de resolución van a depender del tipo de columna y detector empleado. El detector más comúnmente empleado es el de ionización de llama¹⁴⁻²⁹, debido tanto a su precio como a su respuesta universal, pero su uso es limitado en mezclas complejas, mientras que el empleo de un detector de masas prácticamente resuelve toda la problemática de estos compuestos³⁰⁻⁴⁵. Además de los sistemas de detección anteriormente

-
13. W.R. Trevelin, L.H. Vidal, M.D. Landgraf, I.C.E. Silva y M.O.O. Rezende. "Optimization of parameters for the gas-chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 67.
 14. A. Egizabal, O. Zuloaga, N. Echevarria, L.A. Fernández y J.M. Madariaga. "Comparison of microwave-assisted extraction and Soxhlet extraction for phenols in soil samples using experimental designs". *Analyst* 123 (1998) 1679.
 15. M.A. Díez, A. Domínguez, C. Barriocanal, R. Álvarez, C.G. Blanco, M.D. Casal y C.S. Canga. "Gas chromatography study for the evaluation of suitability of bituminous waste material as an additive for coke production". *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 527.
 16. B. Zielinska, E. Fujita, J. Sagebical, G. Hashfield, E. Uberna, T. Hayes y F. Keene. "Arizona hazardous air pollutants monitoring program". *J. Air Waste Manage.* 48 (1998) 1038.
 17. T. Hyotylainen y A. Oikari. "The toxicity and concentrations of PAHs in creosote-contaminated lake sediment". *Chemosphere*, 38 (1999) 1135.
 18. D. Djozan y Y. Assadi. "Monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using headspace solid-phase microextraction and capillary gas chromatography". *Microchem. J.*, 63 (1999) 276.
 19. T. Hyotylainen y A. Oikari. "Assessment of toxicity hazards of dredged lake sediment contaminated by creosote". *Sci. Total Environ.*, 294 (1999) 97.
 20. Z.D. Wang, M. Fingas y L. Sigouin. "Characterization and source identification of an unknown spilled oil using fingerprinting techniques by GC-MS and GC-FID". *LC GC N. AM.*, 18 (2000) 1058.
 21. I.N. Glazkov, I.A. Revelsky, I.P. Efimov y Y.A. Zolotov. "Direct supercritical-fluid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from aqueous solutions". *Chromatographia*, 52 (2000) 495.
 22. J.D. Van Hamme y O.P. Ward. "Development of a method for the application of solid-phase microextraction to monitor biodegradation of volatile hydrocarbons during bacterial growth on crude oil". *J. Ind. Microbiol. Biot.*, 25 (2000) 155.
 23. E.V. Blanco, P.L. Mahía, S.M. Lorenzo, D.P. Rodríguez, E.F. Fernández. "Optimization of microwave-assisted extraction of hydrocarbons in marine sediment: comparison with the Soxhlet extraction method". *Fresen. J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 283.
 24. K. Dobosiewicz, K. Lux Betlej y D. Bodzek. "Concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and base cations in the air and drinking water of the Silesian rehabilitation centre, Poland". *Waste Air Soil Poll.*, 118 (2000) 101.
 25. M. Czaplicka, A. Weglarz y K. Klejnowski. "Analysis of organic contaminants from motor vehicles adsorbed on particulate matter". *Chem. Anal. Warsaw*, 46 (2001) 677.
 26. Y. Zeng y P.K.A. Hong. «Slurry phase ozonation for remediation of sediments contaminated by polycyclic aromatic hydrocarbons». *J. Air Waste Manage.*, 52 (2002) 58.
 27. S. Bigham, J. Medlar, A. Kabir, C. Shende, A. Alli y A. Malik. "Sol-gel capillary microextraction". *Anal. Chem.*, 74 (2002) 752.
 28. C. Marianna. "Determination of selected organic pollutants in ground water- A method of analysis". *Fresen. Environ. Bull.*, 11 (2002) 91.
 29. K. Klejnowski, H. Pyta y M. Czaplicka. "Distribution of selected PAHs concentration in urban agglomerations of the Silesian Voivodship, Poland". *Fresen. Environ. Bull.*, 11 (2002) 60.
 30. C. McRae, A. Ioannou, C. Sun, C.E. Snape y A.E. Fallick. "Application of gas chromatography-isotope ratio mass spectrometry to source coal-derived polycyclic aromatic hydrocarbons in the environment". *Abstr. Pap. Am. Chem. S.*, 216 (1998) 011.
 31. G.D. Wang, A.S. Lee, M. Lewis, B. Kamath y R.K. Archer. "Accelerated solvent extraction and gas chromatography mass spectrometry for determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in smoked food samples". *J. Agr. Food Chem.*, 47 (1999) 1062.
 32. H.X. Pan, B.X. Mai, H.P. Zhuang, Z. Lin, Y.S. Min, G.Y. Sheng y J.M. Fu. "Quantitative analysis of trace polycyclic aromatic hydrocarbons in drinking water with C-18-solid-phase extraction gas chromatography mass spectrometry". *Chinese J. Anal. Chem.*, 27 (1999) 140.

mencionados también aparecen en la bibliografía métodos de cromatografía de gases con detección ultravioleta, por infrarrojos y por fluorescencia inducida por láser, para la determinación de HAPs en diversas matrices^{46,47}.

La aplicación de la cromatografía líquida al análisis de HAPs data de 1976 en que Boden⁴⁸ la aplicó a la determinación de residuos en muestras de interés ambiental. El requerimiento básico para que un analito pueda ser determinado por esta técnica es que sea suficientemente soluble en la fase móvil, propiedad que, en el caso de los HAPs, está

33. C. Miege, M. Bouzige, S. Nicol, J. Dugay, V. Pinchon y M.C. Hennion. "Selective immunoclean-up followed by liquid or gas chromatography for the monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons in urban waste water and sewage sludges used for soil amendment". *J. Chromatogr. A*, 859 (1999) 29.
34. P. Agozzino, G. Avellone, G. Boscaïno y S. Miceli. "Determination by solid-phase microextraction/gas chromatography/mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons in bitumen fumes during road paving". *J. Mass Spectrom.*, 34 (1999) 1383.
35. D. Cam, S. Gagni, L. Meldolesi y G. Galleti. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment using solid-phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry". *J. Chromatogr. Sci.*, 38 (2000) 55.
36. M. Callen, S. Hall, A.M. Mastral, T. Gacía, A. Ross y K.D. Bartle. "PAH presence in oils and tars from coal-tyre coprocessing". *Fuel Process Technol.*, 62 (2000) 53.
37. M.D. Gillen, P. Sopelana y M.A. Partearroyo. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in commercial liquid smoke flavorings of different compositions by gas chromatography-mass spectrometry". *J. Agr. Food Chem.*, 48 (2000) 126.
38. M.D. Gillen, P. Sopelana y M.A. Partearroyo. "Study of several aspects of a general method for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in liquid smoke flavourings by gas chromatography-mass spectrometry". *Food Addit. Contam.*, 17 (2000) 27.
39. P. Mottier, V. Parisod y R.J. Turesky. "Quantitative determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in barbecued meat sausages by gas chromatography couples to mass spectrometry". *J. Agr. Food Chem.*, 48 (2000) 1160.
40. L. Ramos, J.J. Vreuls, U.A.T. Brinkman. "Miniaturised pressurised liquid extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from soil and sediment with subsequent large-volume injection-gas chromatography". *J. Chromatogr.*, 891 (2000) 275.
41. C.L. Song, G.L. Fan, X.F. Tu, W.Z. Li y J.X. Duan. "Quantitative analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in exhaust particulates of diesel engine with selected ion monitor of gas chromatography-mass spectrometry". *Chinese J. Anal. Chem.*, 28 (2000) 1121.
42. N. Grova, C. Laurent, C. Feidt, G. Rychen, F. Laurent y E. Lichtfouse. « Gas chromatography-mass spectrometry study of polycyclic aromatic hydrocarbons in grass and milk from urban and rural farms". *Eur. J. Mass Spectrom.*, 6 (2000) 656.
43. T.B. Mahajan, F.L. Plows, J.S. Gillette, R.N. Zare y G.A. Logan. "Comparison of microbore two-step laser desorption/laser ionisation mass spectrometry and gas chromatography/mass spectrometry studies of polycyclic aromatic hydrocarbons in ancient terrestrial rocks". *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12 (2001) 989.
44. P.W. Crozier, J.B. Plomley y L. Matchuk. "Trace level analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface waters by solid phase extraction (SPE) and gas chromatography-ion trap mass spectrometry (GC-ITMS)". *Analyst*, 126 (2001) 1974.
45. I. Al Saleh y I. Al Doush. "Gas chromatography-mass spectrometry determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in five species of fish from three sites in the Arabian Gulf". *Int. J. Environ. Heal. R.*, 12 (2002) 193.
46. I.B. Litofsky. "A review of analytical methodology for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in coal tar products". *J. Toxicol. Cutan. Ocul.*, 18 (1999) 151.
47. W. Wilcke. "Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in soil – a review". *J. Plant Nutr. Soil Sc.*, 163 (2000) 229.
48. H. Boden. *J. Chrom. Sci.*, 14 (1976) 391.

relacionada con el número total de átomos de carbono presentes así como de su grado de aromaticidad. Así, por HPLC, se pueden determinar desde derivados alquilbencénicos hasta HAPs con 38 átomos de carbono (13 anillos). En cuanto al grado de aromaticidad, al aumentar éste disminuye su solubilidad en disolventes como diclorometano o clorobenceno.

Desde la primera aplicación de esta técnica, son muy numerosos los artículos publicados empleando como sistemas de detección métodos fotométricos⁴⁹⁻⁵², fluorimétricos⁵³⁻⁶¹ o fosforimétricos⁶². En la última década se han desarrollado igualmente métodos de HPLC acoplados a detectores de masas⁶³⁻⁶⁹.

-
49. F.S. Sun, D. Littlejohn y M.D. Gibson. "Ultrasonication extraction and solid phase extraction clean-up for determination of US-EPA 16 priority pollutants polycyclic aromatic hydrocarbons in soils by reversed-phase liquid chromatography with ultraviolet absorption detection". *Anal. Chim. Acta*, 364 (1998) 1.
 50. S. Pérez, I. Ferrer, M.C. Hennion y D. Barceló. "Isolation of priority polycyclic aromatic hydrocarbons from natural sediment and sludge reference materials by an anti-fluorene immunosorbent followed by liquid chromatography and diode array detection". *Anal. Chem.*, 70 (1998) 4996.
 51. S.Y. Xie, R.B. Huang y L.S. Zheng. "Separation and identification of perchlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons by high-performance liquid chromatography and ultraviolet absorption spectroscopy". *J. Chromatogr. A*, 864 (1999) 173.
 52. S.Y. Xie, S.L. Deng, J.J. Yu, R.B. Huang y L.S. Zheng. "Separation and identification of perchlorated polycyclic aromatic hydrocarbons and fullerenes (C-60, C-70) by coupling highperformance liquid chromatography with ultraviolet absorption spectroscopy and atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 932 (2001) 53.
 53. M.T.U. Garagorri, M.C.F. González y B.B. Irisarri. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tarmac used in laying roads by high-performance liquid chromatography with fluorescence detector". *Quim. Anal.*, 16 (1997) 253.
 54. J.L. Beltrán, J. Guiteras y R. Ferrer. "Three-way multivariate calibration procedures applied to high-performance liquid chromatography coupled with fast-scanning fluorescence spectrometry detection. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples". *Anal. Chem.*, 70 (1998) 1949.
 55. M.N. Kayali Sayadi, S. Rubio Barroso, M.P. Cuesta Jiménez y L.M. Polo Diez. "Rapid determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in tea infusion samples by high-performance liquid chromatography and fluorimetric detection based on solid-phase extraction". *Analyst*, 123 (1998) 2145.
 56. C. Miege, J. Dugay y M.C. Hennion. "Optimization and validation of solvent and supercritical fluid extraction for the trace-determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage sludges by liquid chromatography coupled to diode array and fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 219.
 57. M. Bouzige, V. Pichon y M.C. Hennion. "Class-selective immunosorbent for trace-level determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in complex sample matrices, used in off-line procedure or on-line coupled with liquid chromatography fluorescence and diode array detections in series". *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 1916.
 58. M.A. Rodríguez Delgado, M.S. Astorga, R. Corbella y F.J.T. Montelongo. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the fish *chromis limbatus* by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. A study of their degree of bioaccumulation". *Quim. Anal.*, 18 (1999) 313.
 59. V. Fernández Pérez y M.D. Luque de Castro. "Micelle formation for improvement of continuous subcritical water extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil prior to high-performance liquid chromatography-fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 357.
 60. S.G. Amigo, M.A.L. Yusty y J.S. Lozano. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from buzzards (*Buteo buteo*) and tawny owl (*Strix aluco*) by liquid chromatography with fluorescence detection". *J. AOAC Int.*, 85 (2002) 141.

Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos determina la mayor eficiencia cromatográfica de la cromatografía que emplea dichos disolventes respecto a la HPLC y GC, observándose un futuro prometedor en el análisis de HAPs, principalmente en mezclas complejas ampliando considerablemente las limitaciones impuestas (volatilidad y solubilidad) por la GC y HPLC en cuanto al número de átomos de carbono se refiere. Las propiedades físicas de los fluidos supercríticos permiten el empleo de detectores de ionización de llama⁷⁰, de fluorescencia^{71,72} y proporcionan también posibilidades de acoplar con facilidad detectores de masas⁷³⁻⁷⁸ aumentando así la potencialidad de la técnica.

61. V. Pino, J.H. Ayala, A.M. Alfonso y V. González. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in seawater by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection following Michelle-mediated preconcentration". *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 291.
62. S.S. Levinskii, I.A. Khitrovo y L.V. Krivosheeva. "Unified procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitro derivatives by low-temperature luminescence". *J. Anal. Chem.*, 56 (2001) 1098.
63. H. Wilkes, U. Disko y H. Willsch. "Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons in geological samples by charge-transfer liquid chromatography atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry". *Abst. Pap. Am. Chem.*, 215 (1998) 079-GEOC Part I.
64. B.A. Mansoori. "Isometric identification and quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples by liquid chromatography tandem mass spectrometry using a high pressure quadrupole collision cell". *Rapid Commun. Mass Sp.*, 12 (1998) 712.
65. C.H. Marvin, R.W. Smith, D.W. Bryan y B.E. McCarry. "Analysis of high-molecular-mass polycyclic aromatic hydrocarbons in environmental samples using liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionisation mass spectrometry". *J. Chromatogr. A*, 863 (1999) 13.
66. T. Letzel, U. Poschl, E. Rosenberg, M. Grasserbauer y R. Neissner. "In-source fragmentation of partially oxidized mono- and polycyclic aromatic hydrocarbons in atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry coupled to liquid chromatography". *Rapid Commun. Mass Sp.*, 13 (1999) 2456.
67. C.Y. Airiau, R.G. Brereton y J. Crosby. "High-performance liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Rapid Commun. Mass Sp.*, 15 (2001) 135.
68. S. Pérez y D. Barceló. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in sewage reference sludge by liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical-ionization mass spectrometry". *Chromatographia* 53 (2001) 475.
69. M. Takino, S. Daishima, K. Yamaguchi y T. Nakahara. "Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using silver nitrate as a post-column reagent". *J. Chromatogr. A*, 928 (2001) 53.
70. B.N. Barman, V.L. Cebolla y L. Membrado. "Chromatographic techniques for petroleum and related products". *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 30 (2000) 75.
71. T. Vo-Dinh, J. Fetzer y A.D. Campiglia. "Monitoring and characterization of polyaromatic compounds in the environment". *Talanta*, 47 (1998) 943.
72. W.R. LaCourse y C.O. Dasenbrock. "Column liquid chromatography: Equipment and instrumentation". *Anal. Chem.*, 70 (1998) 37R.
73. T.L. Chester, J.D. Pinkston y D.E. Raynie. "Supercritical fluid chromatography and extraction". *Anal. Chem.*, 70 (1998) 301R.
74. L. Toribio, M.J. del Nozal, J.L. Bernal, J.J. Jiménez y M.L. Serna. "Packed-column supercritical fluid chromatography coupled with solid-phase extraction for the determination of organic microcontaminants in water". *J. Chromatogr. A*, 823 (1998) 163.
75. R.M. Smith. "Supercritical fluid in separation science –the dreams, the reality and the future". *J. Chromatogr. A*, 856 (1999) 387.
76. W.E. Rudzinski y T.M. Aminabhavi. "A review on extraction and identification of crude oil and related products using supercritical fluid technology". *Energ. Fuel*, 14 (2000) 83.
77. B.J. Turpin, P. Saxena y E. Andrews. "Measuring and simulating particulate organics in the atmosphere: problems and prospects". *Atmos. Environm.*, 34 (2000) 289.

La electroforesis capilar, ha sido también, en los últimos tiempos, usada para la determinación y cuantificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos. Esta metodología, aunque aún queda mucho para que desplace a los métodos cromatográficos, ofrece ciertas ventajas que hace que esté pugnando junto a éstos en el análisis en general y en concreto en el análisis de HAPs. La cromatografía capilar electrocinética micelar^{79,80}, supone una simplificación metodológica frente a la cromatografía de fluidos supercríticos y debido a que usa medios organizados (medios micelares⁸¹⁻⁸³, ciclodextrinas^{84,85} u otros⁸⁶⁻⁸⁸) solventa los problemas de solubilidad y volatilidad de los métodos de HPLC y GC. Además, los nuevos desarrollos instrumentales que permiten acoplar la técnica a multitud de sistemas de detección (UV⁸⁹, fluorescencia inducida por láser⁹⁰⁻⁹⁵ y espectrometría de

-
78. M.C. Bruzzoniti, C. Sarzanini y E. Mentasti. "Preconcentration of contaminants in water analysis". *J. Chromatogr. A*, 902 (2000) 289.
 79. J.J. Pesek y M.T. Matyska. "Column technology in capillary electrophoresis and capillary electrochromatography". *Electrophoresis*, 18 (1997) 2228.
 80. M.G. Cikalo, K.D. Bartle, M.M. Robson, P. Mayers y M.R. Euerby. "Capillary electrochromatography". *Analyst*, 123 (1998) 87R.
 81. J.H.T. Luong y Y. Guo. "Mixed-mode separation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in electrokinetic chromatography". *Electrophoresis*, 19 (1998) 723.
 82. J.H.T. Luong. "The combined effect of acetonitrile and urea on the separation of polycyclic aromatic hydrocarbons using sodium dioctyl sulfosuccinate in electrokinetic chromatography". *Electrophoresis*, 19 (1998) 1461.
 83. G. Kavran y F.B. Erim. "Separation of polycyclic aromatic hydrocarbons with sodium dodecylbenzenesulfonate in electrokinetic chromatography". *J. Chromatogr. A*, 949 (2002) 301.
 84. I.S. Lurie. "Separation selectivity in chiral and achiral capillary electrophoresis with mixed cyclodextrins". *J. Chromatogr. A*, 792 (1997) 297.
 85. J.H.T. Luong, T. Rigby, K.B. Male y P. Bouvrette. "Separation of resin acids using cyclodextrin-modified capillary electrophoresis". *Electrophoresis*, 20 (1999) 1546.
 86. M.J. Xie, Y.Q. Feng, S.L. Da, D.Y. Meng y L.W. Ren. "Capillary electrophoresis and open tubular capillary electrochromatography using a magnesia-zirconia coated capillary". *Anal. Chim. Acta*, 428 (2001) 255.
 87. C.Y. Liu. "Stationary phases for capillary electrophoresis and capillary electrochromatography". *Electrophoresis*, 22 (2001) 173.
 88. W. Shi y C.P. Palmer. "Effect of pendent group structures on the chemical selectivity and performance of sulfonated copolymers as novel pseudophase in electrokinetic chromatography". *Electrophoresis*, 23 (2002) 1285.
 89. Y. Takagai y S. Igarashi. "UV-detection capillary electrophoresis for benzo[a]pyrene and pyrene following a two-step concentration system using homogeneous liquid-liquid extraction and a sweeping method". *Analyst*, 126 (2001) 551.
 90. C.J. Smith, J. Grainger y D.G. Peterson. "Separation of polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites by gamma-cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection". *J. Chromatogr. A*, 803 (1998) 241.
 91. K.P. Roberts, C.H. Lin, R. Jankowiak, G.J. Small. "On-line identification of diastereomeric dibenzo[a,l]pyrene diol epoxide-derived deoxyadenosine adducts by capillary electrophoresis-fluorescence line-narrowing and non-line narrowing spectroscopy". *J. Chromatogr. A*, 853 (1999) 1546.
 92. K.P. Roberts, C.H. Lin, M. Singhal, G.P. Casale, G.J. Small y R. Jankowiak. "On-line identification of depurinating DNA adducts in human urine capillary electrophoresis-fluorescence line narrowing spectroscopy". *Electrophoresis*, 21 (2000) 799.
 93. R. Jankowiak, K.P. Roberts y G.J. Small. "Fluorescence line-narrowing detection in chromatography and electrophoresis". *Electrophoresis*, 21 (2000) 293.

masas⁹⁶) la están transformando en una potente herramienta en los laboratorios de Química Analítica^{97,98} y posibilitando su aplicación al análisis de HAPs en matrices complejas^{99,100}.

Además de las técnicas separativas para el análisis de HAPs se han propuesto multitud de métodos espectrofotométricos y luminiscentes. Debido a que los HAPs poseen estructuras altamente condensadas, presentan espectros de absorción UV-visible muy característicos, con bandas estrechas y generalmente muy bien definidas, propiedad que ha permitido la detección individual de los mismos por espectrofotometría UV-visible^{101,102}. Sin embargo, no es una técnica que sea útil para la resolución de mezclas. Para mejorar su selectividad, sin necesidad de una etapa previa de separación, se propusieron métodos de análisis multicomponente empleando para ello derivadas¹⁰³, aunque tampoco eran útiles con muestras complejas pues las longitudes de onda de los HAPs están muy próximas.

Además, los métodos para el análisis de HAPs deben ser muy sensibles pues se suelen encontrar en muy pequeñas cantidades. Las técnicas luminiscentes presentan como característica inherente la sensibilidad, por lo que constituyen, desde hace varias décadas, procedimientos de rutina en los laboratorios de análisis.

-
94. G.F. Wang y L. Geng. "Two-dimensional fluorescence correlation in capillary electrophoresis for peak resolution and species identification". *Anal. Chem.*, 72 (2000) 4531.
 95. Y. Takagai y S. Igarashi. "Homogeneous liquid-liquid extraction and micellar electrokinetic chromatography using sweeping effect concentration system for determination of trace amount of several polycyclic aromatic hydrocarbons". *Anal. Bioanal. Chem.*, 373 (2002) 87.
 96. S. Takeda. "Analysis of hazardous chemicals by capillary electrophoresis". *Bunseki Kagaku* 50 (2001) 267.
 97. E. Dabek Zlotorzynska. "Capillary electrophoresis in the determination of pollutants". *Electrophoresis*, 18 (1997) 2453.
 98. G.W. Sovocool, W.C. Brumley y J.R. Donnelly. "Capillary electrophoresis and capillary electrochromatography of organic pollutants". *Electrophoresis*, 20 (1999) 3297.
 99. C.L. Koper y K.W. Whitaker. "Capillary electrophoresis: Part II. Applications". *J. Chem. Educ.*, 75 (1998) 347.
 100. G.P. Casale, M. Singhal, S. Bhattacharya, S. Bhattacharya, R. RamaNathan, K.P. Robert, D.C. Barbacci, J. Zhao, R. Jankowiak, M.L. Gross, E.L. Cavalieri, G.J. Samll, S.I. Rennard, J.L. Mumford y M.L. Shen. "Detection and quantification of depurinated benzo[alpha]pyrene-adducted DNA bases in the urine of cigarette smokers and women exposed to household coal smoke". *Chem. Res. Toxicol.*, 14 (2001) 255.
 101. M.T. Rossi, D.J. Desilets y H.L. Pardue. "Quantitation and identification of polynuclear aromatic hydrocarbons by liquid-chromatography and multiwavelength absorption spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 161 (1984) 191.
 102. M.T. Rossi y H.L. Pardue. "Effects of wavelength range on the simultaneous quantitation of polynuclear aromatic hydrocarbons with absorption-spectra". *Anal. Chim. Acta*, 175 (1985) 153.
 103. J. Ares. "Uvdecode-an algorithm for direct extraction and analysis of environmental polycyclic aromatic hydrocarbons with derivative UV spectrometry". *Anal. Chim. Acta*, 268 (1992) 135.

Todos los HAPs poseen fluorescencia intrínseca, por lo que existen numerosos métodos espectrofluorimétricos directos para su determinación individual¹⁰⁴. Sin embargo, de nuevo, existe un gran solapamiento de las bandas fluorescentes de los distintos HAPs lo que limita la aplicación de la técnica a muestras complejas por falta de selectividad.

La limitación de la selectividad de esta técnica para el análisis de muestras complejas puede ser soslayada, sin la necesidad de llevar a cabo una etapa de separación previa, usando medios organizados u optimizando la instrumentación de medida.

La utilización de medios organizados supuso una gran avance en este tipo de análisis, pues no sólo se consigue un gran aumento en la selectividad, sino que los analitos, al ordenarse en este tipo de medios, experimentan una auténtica preconcentración aumentando la sensibilidad de la técnica y disminuyendo los límites de detección. Como medios organizados se han utilizado la α -ciclodextrina¹⁰⁵, β -ciclodextrina¹⁰⁶, γ -ciclodextrina¹⁰⁷, TX-100¹⁰⁸, cloruro de bencil-dimetil-hezadecilamonio, Pluoronic F-68¹⁰⁹, Brij-96¹¹⁰ y polioxietileno 10 lauril éter¹¹¹, entre otros.

En cuanto a la manipulación que se puede llevar a cabo a nivel instrumental para el aumento de selectividad en la detección fluorimétrica hay que destacar la aplicación de la espectrofluorimetría de tiempo resuelto¹¹², la obtención de espectros de luminiscencia

-
104. R.A. Velapoldi, P.A. White, W.E. May y K.R. Eberhardt. "Spectrofluorimetric determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in aqueous effluents from generator columns". *Anal. Chem.*, 55 (1983) 1896.
105. J.M. Bello y R.J. Hurtubise. "Interactions of compounds adsorbed on an 80-percent alpha-cyclodextrin sodium-chloride mixture investigated by diffuse reflectance and luminescence spectrometry". *Anal. Chem.*, 59 (1987) 2395.
106. M. Tachibana y M. Furusawa. "Solvent extraction of acenaphthene from dodecane into aqueous β -cyclodextrin medium and applications to synchronous spectrofluorimetric determination in kerosene". *Analyst*, 120 (1995) 437.
107. J.M. Schuette y I.M. Warner. "Structural consideration and fluorescence spectral definition of cyclodextrin/perylene complexes in the presence of 1-pentanol". *Talanta*, 41 (1994) 647.
108. J.J. Santana, Z. Sosa, A. Alfonso y V. González. "Simultaneous synchronous fluorimetric-determination of benzo[a]pyrene and perylene in micellar media". *Anal. Chim. Acta*, 255 (1991) 107.
109. S. Rubio Barroso, D. López López, C. Val Ontillera y L. Polo Díez. "Estudio espectrofluorimétrico de PAHs en medios organizados de β -ciclodextrina y pluronic-F 68". *Química Analítica*, 10 (1991) 127.
110. J.J. Santana, Z. Sosa, A. Alfonso y V. González. "Sensitive simultaneous determination of benzo[a]pyrene, perylene and chrysene by synchronous spectrofluorimetry in nonionic micellar media". *Talanta*, 39 (1992) 1611.
111. J.J. Santana, J. Hernández García, M.M. Bernal Suárez y A. Bermejo Martín-Lázaro. "Analysis of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in sea-water by synchronous fluorescence spectrometry in organized media". *Analyst*, 118 (1993) 917.
112. S. Yamada. "Fiberoptic multiphoton ionization detection of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Anal. Chim. Acta*, 264 (1992) 1.

total¹¹³, espectros sincrónicos¹⁰⁶, espectros sincrónicos de ángulo variable¹¹⁴ o la posibilidad de manipular la señal analítica¹¹⁵.

Otra técnica ampliamente utilizada para determinación de HAPs es la fosforescencia. Esta técnica, por presentar una mayor selectividad y sensibilidad que la fluorescencia, podría solventar los problemas en la resolución de mezclas complejas. Así, en la bibliografía aparecen multitud de métodos de fosforescencia a baja temperatura, fosforescencia sobre soporte sólido y en disolución, usando medios micelares, ciclodextrinas, microemulsiones o incluso sin el uso de ningún medio organizado (fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados), para el análisis individual de HAPs o de mezclas de ellos¹¹⁶.

Aunque los métodos fluorescentes y fosforescentes descritos anteriormente son más selectivos y sensibles que los espectrofotométricos, no son capaces, al menos de forma rápida, sencilla y barata, de resolver problemas complejos. Por tanto, en la actualidad se está recurriendo a la utilización de redes neurales para la resolución de estos problemas.

Desde que en 1993, Bos *y col.*¹¹⁷ usaran las redes neuronales en Química Analítica, han sido muchos los artículos publicados en los que se combinaban los conocimientos en Química Analítica y en Sistemas de Inteligencia Artificial. Pero no ha sido hasta 1998, cuando Amador Hernández *y col.*¹¹⁸ utilizaron las redes neuronales para la resolución de una mezcla de HAPs mediante fluorescencia lineal de ángulo variable, existiendo sólo una publicación más en la bibliografía en la que se usen las redes neuronales en la resolución espectral de los HAPs, correspondiente a Ferrer *y col.*¹¹⁹ en el que compararon el método

113. U.P. Wild, M. Luond, E. Meinster y G.W. Suter. "Total luminescence spectroscopy". *J. Luminescence*, 40 (1988) 270.

114. L.F. Capitán Vallvey, M del Olmo, R. Avidad, A. Navalón, I de Orbe y J.L. Vilchez. "Close overlapping discrimination of polycyclic aromatic hydrocarbons by synchronous scanning at variable-angle solid-phase spectrofluorimetry". *Anal. Chim. Acta*, 302 (1995) 193.

115. L. Yao Qun, H. Xian Zhi, X. Jin Gou y C. Guo Zhen. "Derivative constant-energy synchronous fluorescence analysis of polynuclear aromatic hydrocarbons mixtures". *Anal. Chim. Acta*, 256 (1992) 285.

116. A. Fernández Gutiérrez y S.G. Schulman. "Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aproximación Práctica". Editorial Universidad de Granada, 2001, Granada.

117. M. Bos, A. Bos y W.E. Vanderlinden. "Data-processing by neural networks in quantitative chemical-analysis". *Analyst*, 118 (1993) 323.

118. J. Amador Hernández, A. Cladera, J.M. Estela, P.L. López de Alba y V. Cerdá. "Resolution of a multicomponent polycyclic aromatic hydrocarbon system in micellar media by linear variable angle fluorescence applying distinct chemometric techniques". *Analyst*, 123 (1998) 2235.

119. R. Ferrer, J. Guiteras y J.L. Beltrán. "Artificial neural networks (ANNs) in the analysis on polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by synchronous fluorescence". *Anal. Chim. Acta*, 384 (1999) 261.

PLS con las redes neuronales para optimizar la resolución de espectros sincrónicos de fluorescencia de diez HAPs.

Aunque los métodos que usan sistemas de inteligencia artificial ayudan a resolver mezclas complejas, y en concreto mezclas de HAPs, no permiten obtener información de la distribución espacial e “in situ” de las sustancias a determinar. Por ello, en los últimos años, la Química Analítica se ha encaminado al desarrollo de dispositivos robustos, de uso sencillo y preferiblemente portátiles y que proporcionen de forma directa y continua información de su entorno, es decir, al desarrollo de sensores químicos.

En 1990, Niessner *et al.*¹²⁰ propusieron un sensor basado en un fenómeno fotemisor para la cuantificación de mezclas HAPs. Este sensor, por ser el más antiguo del que se tiene constancia según la bibliografía consultada, ha sido el más utilizado en aplicaciones reales¹²¹⁻¹²³.

Debido al amplio número de métodos luminiscentes descritos para HAPs y a su propiedades inmejorables para obtener fluorescencia y fosforescencia, la gran mayoría de los sensores desarrollados para su determinación están basados en medidas luminiscentes. Así se han desarrollado sensores basados en la medida de intensidad y/o tiempos de vida de fluorescencia y/o fosforescencia evaluándose diferentes dispositivos para la excitación y recolección de la emisión y desarrollándose diferentes fases sensoras, siendo las más interesantes las basadas en la técnica de la impresión molecular^{124,125}.

-
120. R. Niessner, B. Hemmerich y P. Wilbring. “Aerosol photoemission for quantification of polycyclic aromatic hydrocarbons in simple mixtures adsorbed on carbonaceous and sodium chloride aerosols”. *Anal. Chem.*, 62 (1990) 2071.
 121. R. Wasserkort, A. Hartmann, R.M. Widmer y H. Burtscher. “Correlation between on-line PAH detection in airborne particulate samples and their bacterial genotoxicity”. *Ecotoxicology Environ. Safety*, 40 (1998) 126.
 122. J.C. Dunbar, C.I. Lin, I. Vergucht, J. Wong y F.L. Durant. “Estimating the contributions of mobile sources of PAH to urban air using real-time PAH monitoring”. *Sci. Total Environ.*, 279 (2001) 1.
 123. T. Chetwittayachan, D. Shimazaki y K. Yamamoto. “A comparison of temporal variation of particulate-bound polycyclic aromatic hydrocarbons (pPAHs) concentration in different urban environments: Tokyo, Japan and Bangkok, Thailand”. *Atmospheric Environ.*, 36 (2002) 2027.
 124. F. L. Dickert, H. Besenbock y M. Tortschanoff. “Molecular imprinting through van der Waals interactions: fluorescence detection of PAHs in water”. *Advanced Materials*, 10 (1998) 149.
 125. F.L. Dickert, O. Hayden y K.P. Halikias. “Synthetic receptors as sensor coatings for molecules and living cells”. *Analyst*, 126 (2001) 766.

Basándose en esta tecnología, Dickert *y col.*¹²⁶ desarrollaron un sensor para la determinación de HAPs en agua consiguiendo límites de detección del orden de las ppm usando como sistema de detección la fluorescencia intrínseca de los HAPs retenidos en la fase sensora.

Baumann *y col.*¹²⁷ usaron la diferencia de los tiempos de vida de fluorescencia de los distintos HAPs para su determinación en agua subterránea y sólidos usando para ello un láser como fuente de excitación, desarrollando un sensor rápido y reproducible, capaz de llevar a cabo determinaciones de analitos simples (PYR y BaP) o mezclas complejas haciendo uso de las curvas de decaimiento de la intensidad de fluorescencia.

En el año 2000, Panne *y col.*¹²⁸ desarrollaron un sensor de fibra óptica para la determinación de HAPs en aerosoles mediante medidas de fluorescencia a tiempo resuelto con un dispositivo de termodesorción. El sensor está basado en una célula de flujo para aerosoles a la cual se le acopló la fibra óptica para transportar la luz proveniente de un láser pulsado de nitrógeno y como detector se usó un fotomultiplicador con un osciloscopio digital. Usando este dispositivo analizaron BaP, BbF y BghiP obteniendo límites de detección entre 110 y 850 ng/L con tiempos de respuesta de 2-3 minutos. En este mismo año, también se desarrolló otro sensor de fibra óptica¹²⁹ basado en espectroscopía de fluorescencia de emisión y excitación a tiempo resuelto estimulada con dispersiones Raman para generar longitudes de onda de excitación entre 250 y 400 nm. Como fuente de excitación usaron un láser de Nd:YAG de frecuencia doblada y una mezcla de hidrógeno-metano como medio Raman y como sistema de detección se usó un dispositivo de acoplamiento de carga intensificado (ICCD), consiguiendo un tiempo de resolución del orden de los nanosegundos y límites de detección del orden de las ppt para el pireno.

126. F.L. Dickert, M. Tortschanoff, W.E. Bulst y G. Fischerauer. "Molecularly imprinted sensor layers for the detection of polycyclic aromatic hydrocarbons in water". *Anal. Chem.*, 71 (1999) 4559.

127. T. Baumann, S. Haaszio y R. Niessner. "Applications of a laser-induced fluorescence spectroscopy sensor in aquatic system". *Water Research*, 34 (2000) 1318.

128. U. Panne, A. Knoller, R. Kotzick y R. Niessner. "On-line and in-situ detection of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) on aerosols via thermodesorption and laser-induced fluorescence spectroscopy". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 366 (2000) 408.

129. U. Panne, C. Dicke, R. Duesing, R. Niessner y G. Bidoglio. "Stimulated raman scattering as an excitation source for time-resolved excitation-emission fluorescence spectroscopy with fiber-optical sensors". *Appl. Spectros.*, 54 (2000) 536.

En 2002, Patra y Mishra¹³⁰, desarrollaron un nuevo sensor fluorescente de fibra óptica para la determinación de HAPs. En este caso, se usó como fuente de excitación una lámpara de Xe y como sistema de detección un fotomultiplicador, desarrollando un sensor simple, flexible, barato y capaz de actuar en ambientes hostiles. Este sensor fue evaluado para la determinación de HAPs, principalmente perileno y antraceno, obteniendo límites de detección del orden de las ppb en muestras ambientales.

El primer sensor para HAPs basado en medidas de fosforescencia a temperatura ambiente fue descrito por Campiglia y Vo-Dinh en 1996¹³¹ usando como fase sensora papel de filtro impregnado con acetato de talio (0.1 M) para la determinación de criseno, 1,2-benzofluoreno, 7,8-benzoquinolina, fenantridina y 5-6,benzoquinolina y con acetato de plomo (0.5 M) para fluoranteno, obteniendo límites de detección del orden de los ng/mL. Posteriormente, Ghauch *et al.*¹³² propusieron papel de filtro Whatman N° 1 no fluorescente impregnado con nitrato de talio o yoduro sódico como fase activa para un sensor fosforescente de HAPs. Así desarrollaron un sensor basado en el uso de una lámpara pulsada de Xe como fuente de excitación y un espectrógrafo equipado con un detector de acoplamiento de carga y fibras ópticas como medios de transporte de la luz de excitación y emisión, consiguiendo determinar PYR, BaA, NAPH, PHE, FLU, coroneno y FLT.

Además de estos sensores químicos ópticos, en la bibliografía también aparecen sensores bioquímicos o biosensores^{133,134} y sensores piezoeléctricos o microbalanzas¹³⁵⁻¹³⁷.

En la actualidad, la investigación se está encaminando a caracterizar nuevas fases activas selectivas que permitan el desarrollo de nuevos sensores más sensibles para el

-
130. D. Patra y A.K. Mishra. "A novel disposable sensor head for a fiber optic spectrofluorimeter". *Inst. Sci. Technol.*, 30 (2002) 31.
131. A.D. Campiglia y T. Vo-Dinh. "Fiber optic sensor for laser-induced room temperature phosphorescence detection of polycyclic aromatic hydrocarbons". *Talanta* 43 (1996) 1805.
132. A. Ghauch, J. Rima, C. Fachinger, J. Suptil y M. Martin Bouyer. "Room temperature phosphorescence analyses of polycyclic aromatic hydrocarbons using an imaging sensing system combined with a bifurcated optical fiber and a cooled charge couples device detector". *Talanta*, 51 (2000) 807.
133. M. Liu, Q.X. Li y G.A. Rechnitz. "Flow injection immunosensing of polycyclic aromatic hydrocarbons with a quartz crystal microbalance". *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 29.
134. A. Koning, T. Reul, C. Harmeling, F. Spener, M. Knoll y C. Zaborosch. "Multimicrobial sensor using microstructured three-dimensional electrodes based on silicon technology". *Anal. Chem.*, 72 (2000) 2022.
135. M.C. Su, E.R. Christiansen y F.J. Karls. "Determination of PAH sources in dated sediments from Green Bay, Wisconsin, by a chemical mass balance model". *Environ. Pollut.*, 99 (1998) 411.
136. P. Rachdawong, E.R. Christiansen y J.F. Karls. "Historical PAH fluxes to Lake Michigan sediments determined by factor analysis". *Water Res.*, 32 (1998) 2422.
137. O. Hayden, L. Piu y R. Sikorski. "Sensors based on fingerprints of neutral and ionic analytes in polymeric materials". *Sensors Act. B Chem.*, 76 (2001) 295.

análisis de HAPs. Así están apareciendo nuevos métodos de impresión molecular^{138,139} y se están evaluando nuevas fases sensoras basadas en la tecnología sol-gel. Las últimas investigaciones en este campo han llevado al desarrollo de un chip equipado con una nueva fase estacionaria diseñada bajo la tecnología sol-gel para el análisis de HAPs mediante electrocromatografía capilar con detección fotométrica¹⁴⁰.

2 Establecimiento de las condiciones experimentales para el desarrollo de fases sensoras para hidrocarburos aromáticos policíclicos

2.1 Espectros de los HAPs en disolución

Para conocer las características fluorescentes de los 16 HAPs se prepararon disoluciones de 500 µg/L de cada uno en agua bidestilada y se registraron los espectros de excitación y emisión. Las longitudes de onda de máximas de excitación y emisión se muestran en la Tabla V-3.

Tabla V-3. Características fluorescentes de los HAPs de la EPA

HAP	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)	HAP	λ_{exc} (nm)	λ_{em} (nm)
NAPH	286	322	CHRY	322	386
ACEN	292	324	BaA	288	388
ACE	292	322	BkF	308	414
FLU	290	304	BbF	358	446
PHE	294	364	BaP	386	406
ANT	358	402	IcdP	362	496
FLT	358	460	BghiP	336	394
PYR	300	406	DBahA	304	404

138. F.L. Dikert, P. Lieberzeit y M. Tortschanoff. "Molecular imprints as artificial antibodies- a new generation or chemical sensors". *Sensors Act. B Chem.*, 65 (2000) 186.

139. F.L. Dicker, P. Achatz y K. Halikias. "Double molecular imprinting a new sensor concept for improving selectivity in the polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water". *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371 (2001) 11.

140. S. Constantin, R. Freitag, D. Solignac, A. Sayah y M.A.M. Gijs. "Utilization of the sol-gel technique for the development of novel stationary phases for capillary electrochromatography on a chip". *Sensor Actuact. B Chem.*, 78 (2001) 267.

Las longitudes de onda registradas coinciden con las publicadas en la bibliografía y teniendo en cuenta que en los métodos desarrollados hasta ahora, las longitudes de onda de los analitos en disolución coinciden prácticamente a las que presentan retenidos en una fase sólida, se van a utilizar estos valores para comenzar el estudio de optimización del resto de variables experimentales para la propuesta de fases sensoras.

2.2 Parámetros instrumentales

Antes de optimizar las variables experimentales se han fijado unas condiciones de medida. Los parámetros instrumentales afectan a la diferencia señal-ruido y por tanto, a las características analíticas del método, sin embargo, no afectan a la capacidad de los analitos a interaccionar con una fase sensora. Por tanto, como lo que se pretende en este capítulo es determinar en qué condiciones experimentales los 16 HAPs de la EPA interaccionan con las fases sensoras seleccionadas (como un primer paso para el desarrollo de fases sensoras de HAPs) se han fijado unos parámetros instrumentales estándares para llevar a cabo medidas de fluorescencia. Éstas se muestran en la Tabla V-4.

Tabla V-4. Parámetros instrumentales seleccionados

Parámetro instrumental	Valor seleccionado
Voltaje del detector	600 V
Tamaño de rendijas (exc/em)	4/4 nm
Resolución	5 s

2.3 Estudios preliminares de optimización de las variables experimentales

Las variables experimentales más importantes que pueden afectar a la emisión fluorescente en fase sólida de los HAPs son: pH, tipo de soporte sólido y disolvente orgánico presente en el medio.

- a) El pH afecta a la disociación de grupos ionizables tanto de los analitos como de los soportes sólidos. Como los HAPs no poseen ningún grupo ionizable su fluorescencia no se ve afectada por cambios en el pH del medio. Sin embargo, sí se puede ver modificada la forma química en la que se encuentren los soportes sólidos y por tanto variaciones del pH pueden afectar a la interacción entre los

analitos y éstos. Por ello, se ensayarán 3 valores de pH diferentes, un pH ácido (pH=3), neutro (pH=7) y básico (pH=12) fijados con HCl y/o NaOH para conocer cómo afecta el pH a la interacción entre los HAPs y los soportes sólidos ensayadas.

- b) Otra variable experimental fundamental que afecta a la fluorescencia en fase sólida es el tipo de soporte sólido usado. En este tipo de dispositivos, los soportes sólidos actúan propiciando una preconcentración de los analitos en una pequeña región del mismo que es donde se mide la emisión fluorescente. Para evaluar las características fluorescentes de los 16 HAPs de la EPA en fase sólida, se probarán 11 resinas: tres resinas de intercambio aniónico (Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8), tres de intercambio catiónico (Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8) y cinco no iónicas (Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4, Amberlita XAD 7, Gel de Sílica Davisil y Gel de Sílica Merck).
- c) Por otro lado, debido a que los HAPs son altamente insolubles en agua, es necesario añadir un disolvente orgánico a las muestras que ayude a su solubilización y evite que queden retenidos en las tuberías de teflón usadas para diseñar los sistemas de análisis por inyección en flujo. Por tanto, se estudiará el efecto que produce la presencia de seis disolventes orgánicos miscibles con agua (etanol, metanol, acetonitrilo, 1,4-dioxano, dimetilformamida y acetona) en las muestras.

Como se puede deducir de lo comentado anteriormente, se va a estudiar la interacción de 16 analitos con 11 soportes sólidos, a tres niveles de pH y en presencia de 6 disolventes orgánicos distintos, lo que supone llevar a cabo 3168 experiencias. Para disminuir las experiencias preliminares, se eligieron 3 analitos en función de su estructura química (ACE, PYR y BaP; véase la Figura V-3) y se llevó a cabo el estudio completo con los tres, con lo que se redujeron a 594 el número de experiencias a realizar.

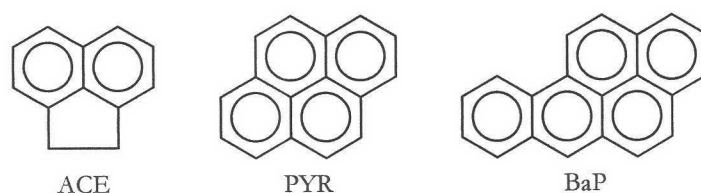


Figura V-3. Estructura química del ACE, PYR y BaP.

Se prepararon diferentes disoluciones de 600 $\mu\text{g/L}$ de ACE, PYR y BaP, añadiendo la cantidad adecuada de cada uno de los disolventes orgánicos para conseguir un porcentaje final del 10% v/v y pequeñas cantidades de HCl o NaOH para fijar el pH.

Para llevar a cabo las medidas, se empaquetaron los soportes sólidos en una cubeta de flujo convencional, que se situó en el compartimento de muestra del espectroluminómetro, registrando la emisión fluorescente de la resina o ruido de fondo. Posteriormente, se hicieron pasar 500 μL de cada una de las disoluciones de los HAPs y se registró la emisión fluorescente o señal de los analitos retenidos en la fase sólida. Las medidas luminiscentes tanto del ruido como de la señal se realizaron a las longitudes de onda apropiadas para cada compuesto seleccionado fijando las condiciones instrumentales comentadas en el apartado 2.2 de este capítulo.

Las Figuras V-4, V-5 y V-6 muestran la influencia del pH, tipo de soporte sólido y tipo de disolvente orgánico sobre la diferencia señal-ruido y por tanto sobre la interacción analito-fase sensora para el ACE, PYR y BaP, respectivamente. De estas tres figuras se pueden deducir una serie de conclusiones preliminares que ayuden a concretar el estudio sobre todos los HAPs:

- a) No hay diferencias significativas de la interacción analito-soporte sólido a los tres niveles de pH ensayados. Por lo que se puede concluir que la interacción de los tres analitos estudiados con las once resinas ensayadas no se ve influenciada por el pH. Por tanto, se seleccionó un pH 7 para llevar a cabo la caracterización fluorescente de los 16 HAPs en superficie sólida.

pH: 7.0

- b) En cuanto a los soportes sólidos estudiados, se puede observar en dichas figuras que los tres HAPs no interaccionan de forma significativa con las resinas catiónicas (Dowex 50wx2, Dowex 50wx4 y Dowex 50wx8), ni aniónicas (Dowex 1x2, Dowex 1x4 y Dowex 1x8) y sin embargo, sí interaccionan con las de carácter no iónico. Este resultado lógico es debido al carácter apolar o no iónico de los analitos en estudio. Por esta razón, sólo las resinas no iónicas (Gel de Sílica Davisil, Gel de Sílica Merck, Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7) fueron seleccionadas para llevar a cabo la caracterización fluorescente de los 16 HAPs en superficie sólida.

Soportes sólidos: Resinas no iónicas

- c) Con respecto a los disolventes orgánicos presentes en las muestras, se puede decir, que la presencia de éstos afecta en gran medida a la diferencia señal-ruido. Se puede observar en la Figura V-6 que cuando se usa dimetilformamida para ayudar a solubilizar el BaP a pH neutro la emisión fluorescente de éste en fase sólida es cuatro veces mayor que cuando se usa etanol o metanol, y en la Figura V-4 cuando se usa acetonitrilo con ACE a pH ácido, la emisión fluorescente de este analito en fase sólida es cinco veces mayor que cuando se usa dimetilformamida ó 1,4-dioxano. Por tanto, los seis disolventes orgánicos miscibles con agua (etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, dimetilformamida y 1,4-dioxano) deben ser evaluados en la caracterización fluorescente de los 16 HAPs en superficie sólida.

Disolventes orgánicos: etanol, metanol, acetona, acetonitrilo, dimetilformamida y 1,4-dioxano

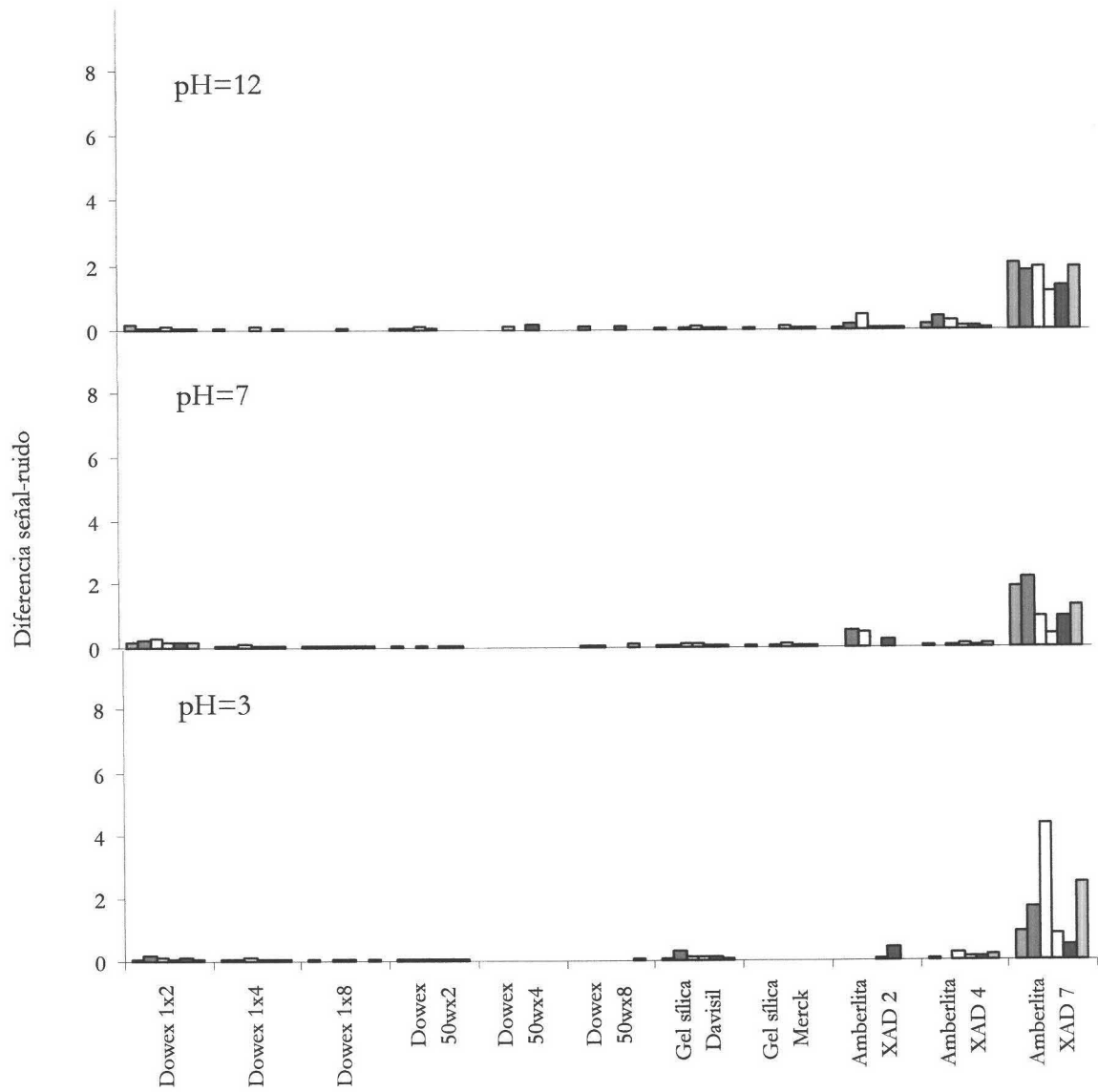


Figura V-4. Influencia del pH, tipo de soporte sólido y disolvente orgánico sobre la intensidad de fluorescencia en fase sólida del ACE en presencia de ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

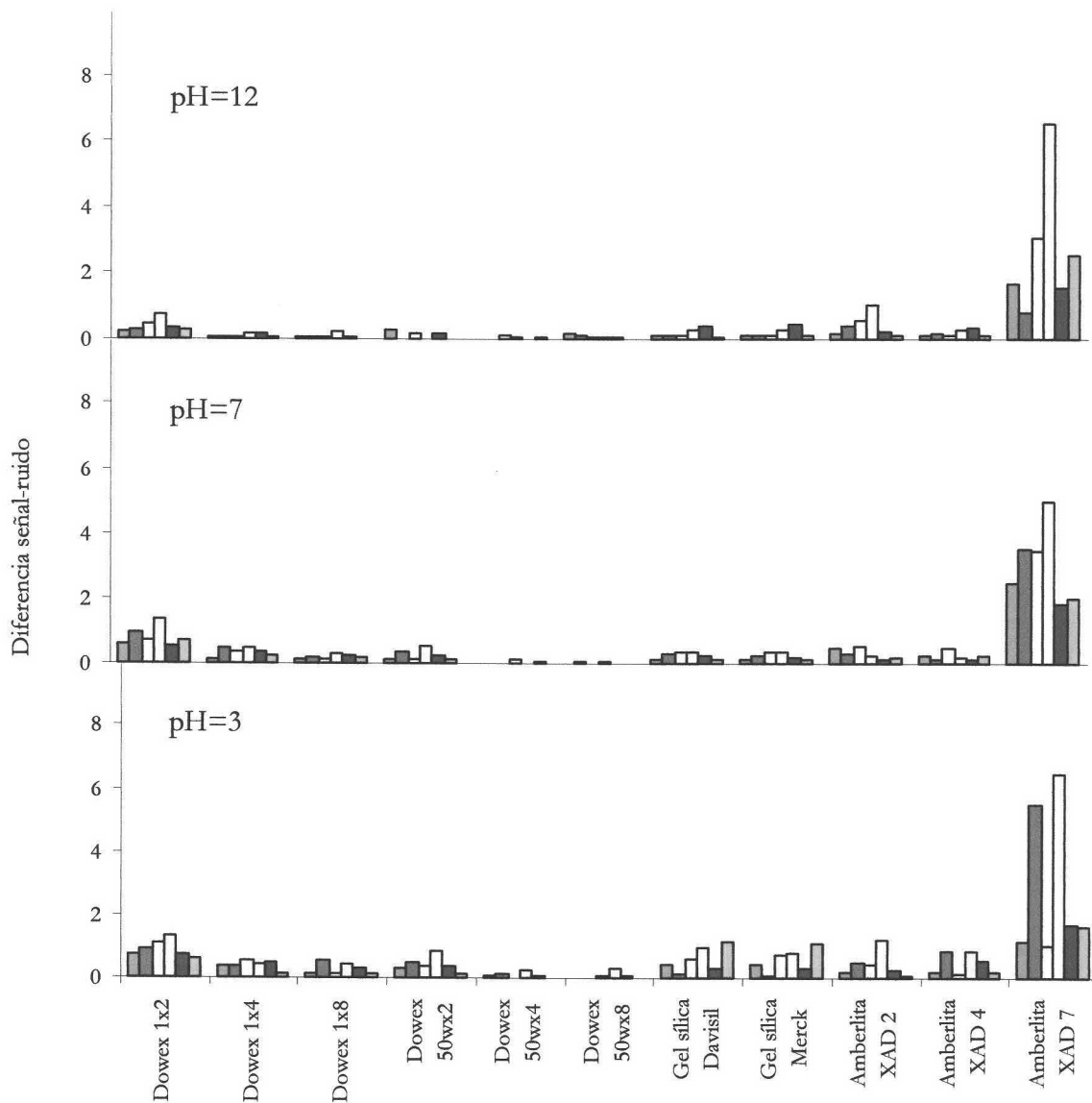


Figura V-5. Influencia del pH, tipo de soporte sólido y disolvente orgánico sobre la intensidad de fluorescencia en fase sólida del PYR en presencia de etanol, acetona, acetonitrilo, dimetilformamida, 1,4-dioxano y metanol.

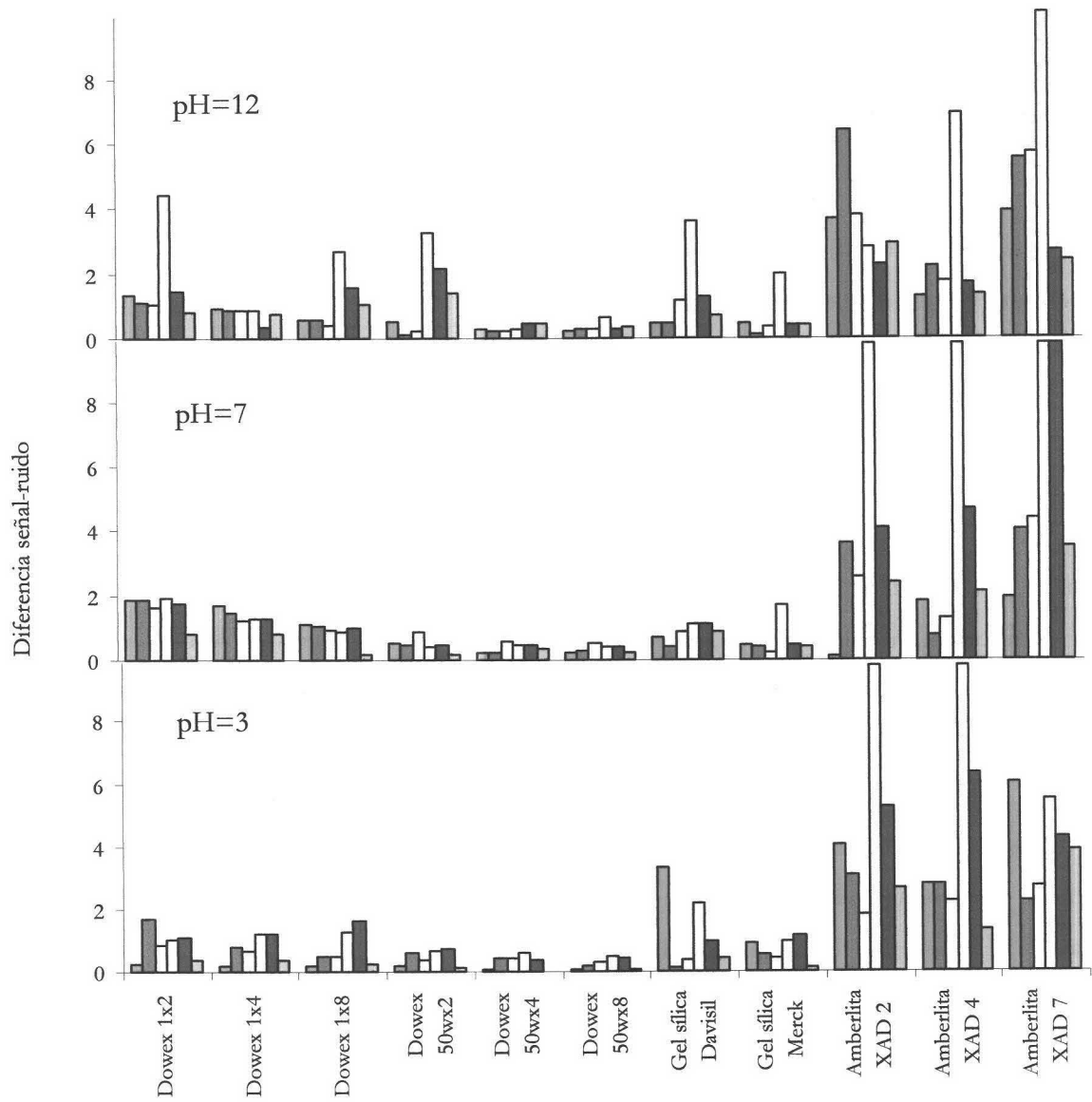


Figura V-6. Influencia del pH, tipo de soporte sólido y disolvente orgánico sobre la intensidad de fluorescencia en fase sólida del BaP en presencia de ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

2.4 Optimización de variables experimentales

Establecidos los parámetros instrumentales y variables experimentales se procedió a la caracterización fluorescente en fase sólida de los 16 HAPs de la EPA.

Para ello, se prepararon diferentes disoluciones de 600 µg/L de los dieciséis HAPs, añadiendo la cantidad adecuada de cada uno de los disolventes orgánicos (etanol, metanol, acetonitrilo, dimetilformamida, 1,4-dioxano y acetona) para que se encontraran en un porcentaje final del 10% en volumen y se ajustó el pH adicionando pequeñas cantidades de HCl o NaOH, para que su valor fuese 7.

Para llevar a cabo las medidas, se empaquetaron los soportes sólidos (Gel de Sílica Davisil, Gel de Sílica Merck, Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7) en una cubeta de flujo convencional, que se situó en el compartimento de muestra del espectroluminómetro, registrándose la emisión fluorescente de la resina o ruido de fondo. Posteriormente, se hicieron pasar 500 µL de cada una de las disoluciones de los HAPs preparadas y se registró la emisión fluorescente o señal de los analitos retenidos en la fase sólida. Las medidas luminiscentes tanto del ruido como de la señal se realizaron a las longitudes de onda apropiadas para cada compuesto seleccionado fijando 600 V como voltaje del detector, un ancho de rendijas de 4 nm tanto para la rendija de excitación como para la de emisión y una resolución de 5s.

En las Figuras V-7 a V-12 se muestran la interacción analito-fase sensora que se produce entre los 16 HAPs y los soportes sólidos seleccionados en las condiciones experimentales ensayadas.

Para considerar la interacción analito-resina efectiva o no, se adoptó la condición que si la diferencia señal-ruido era superior a un 10% de la mayor de las diferencia señal-ruido, la interacción sería efectiva, mientras que si esta diferencia era menor la interacción sería considerada no efectiva. La Tabla V-5 muestra un resumen de la experiencia realizada.

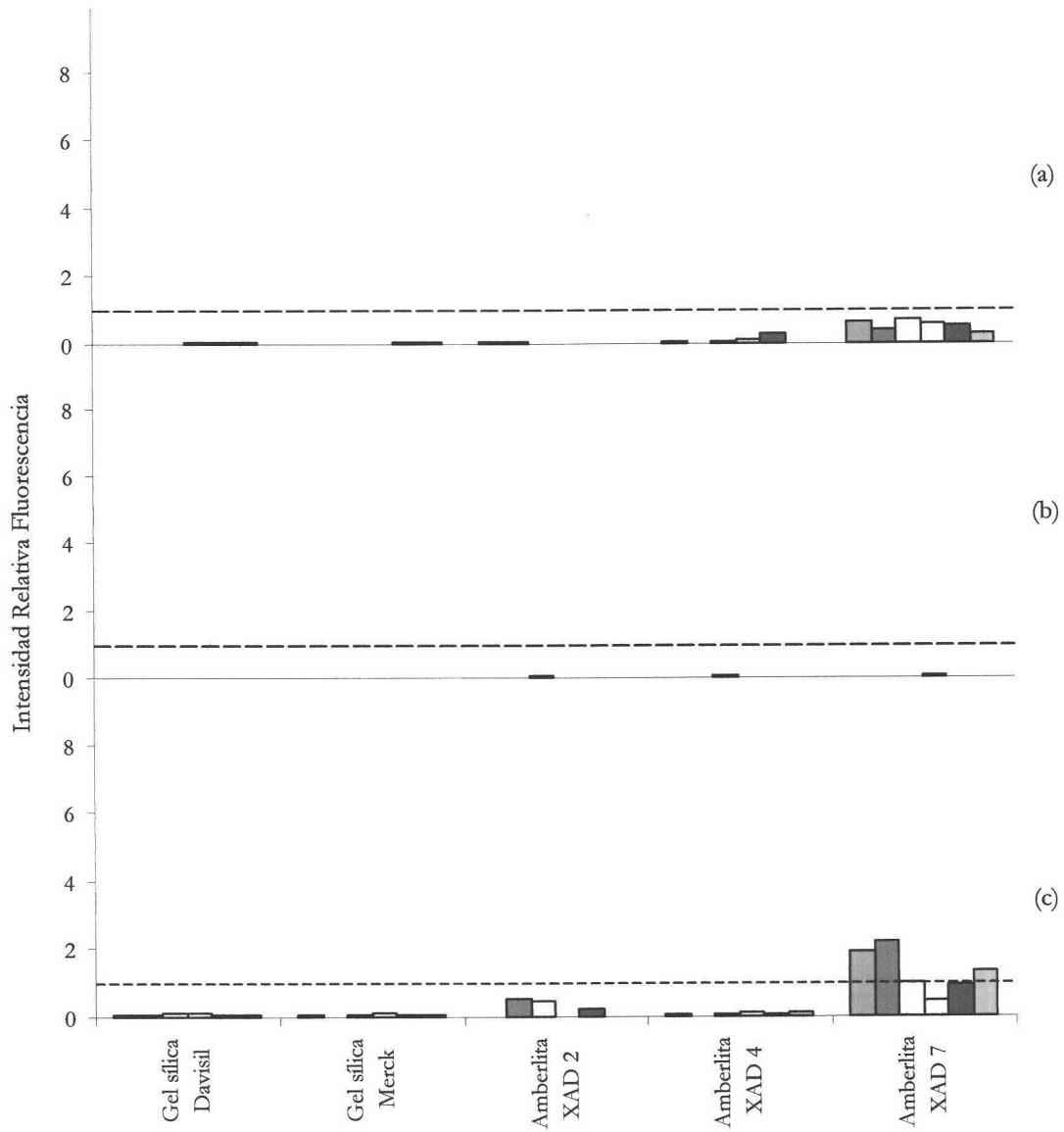


Figura V-7. Caracterización fluorescente en fase sólida del a)NAPH, b)ACEN y c)ACE. [HAP] = 600 µg/L, pH = 7, ■ etanol, ■ acetona, acetónitrilo, dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

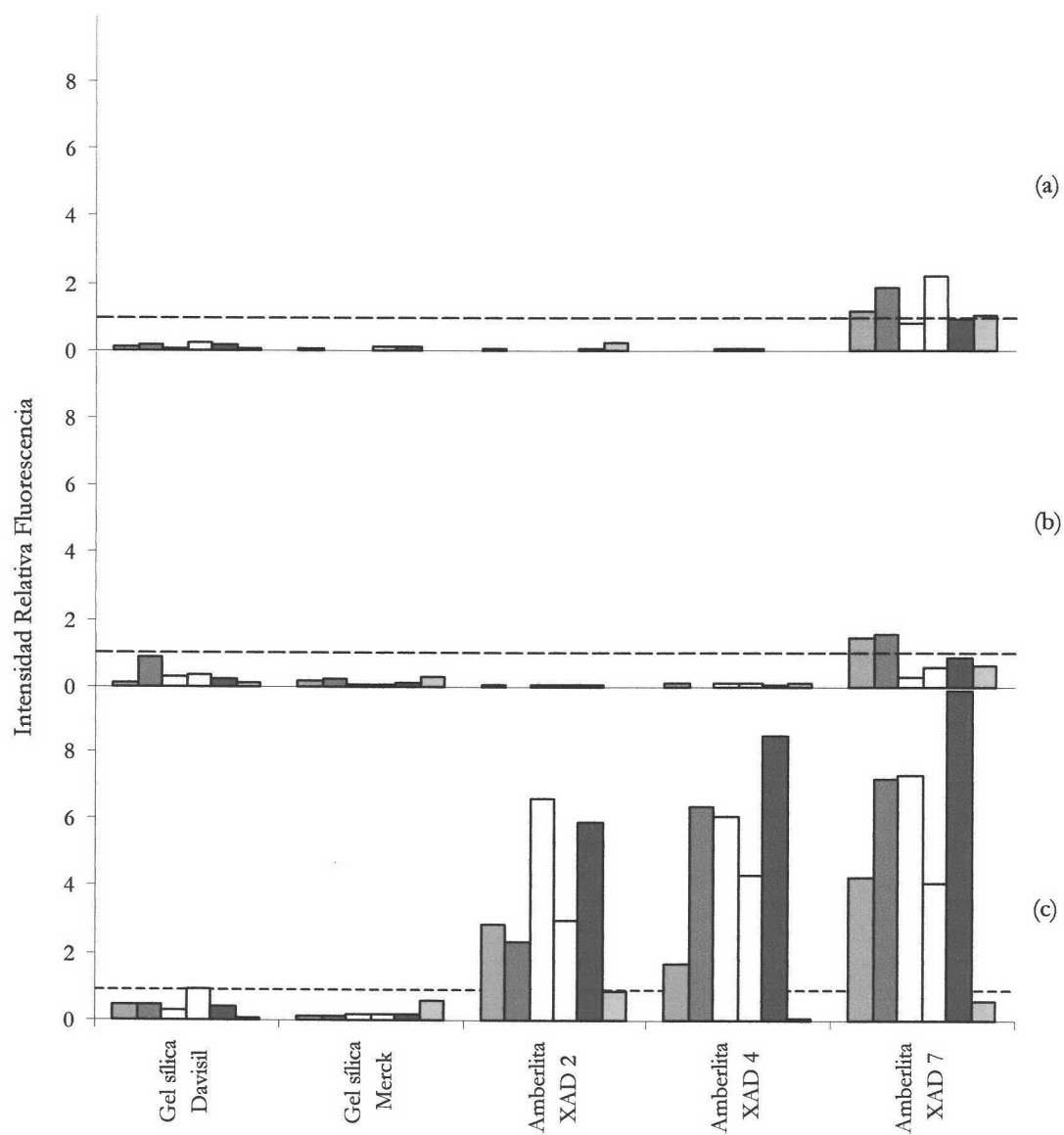


Figura V-8. Caracterización fluorescente en fase sólida del a)FLU, b)PHE y c)ANT. $[HAP] = 600 \mu\text{g/L}$, $\text{pH} = 7$, ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

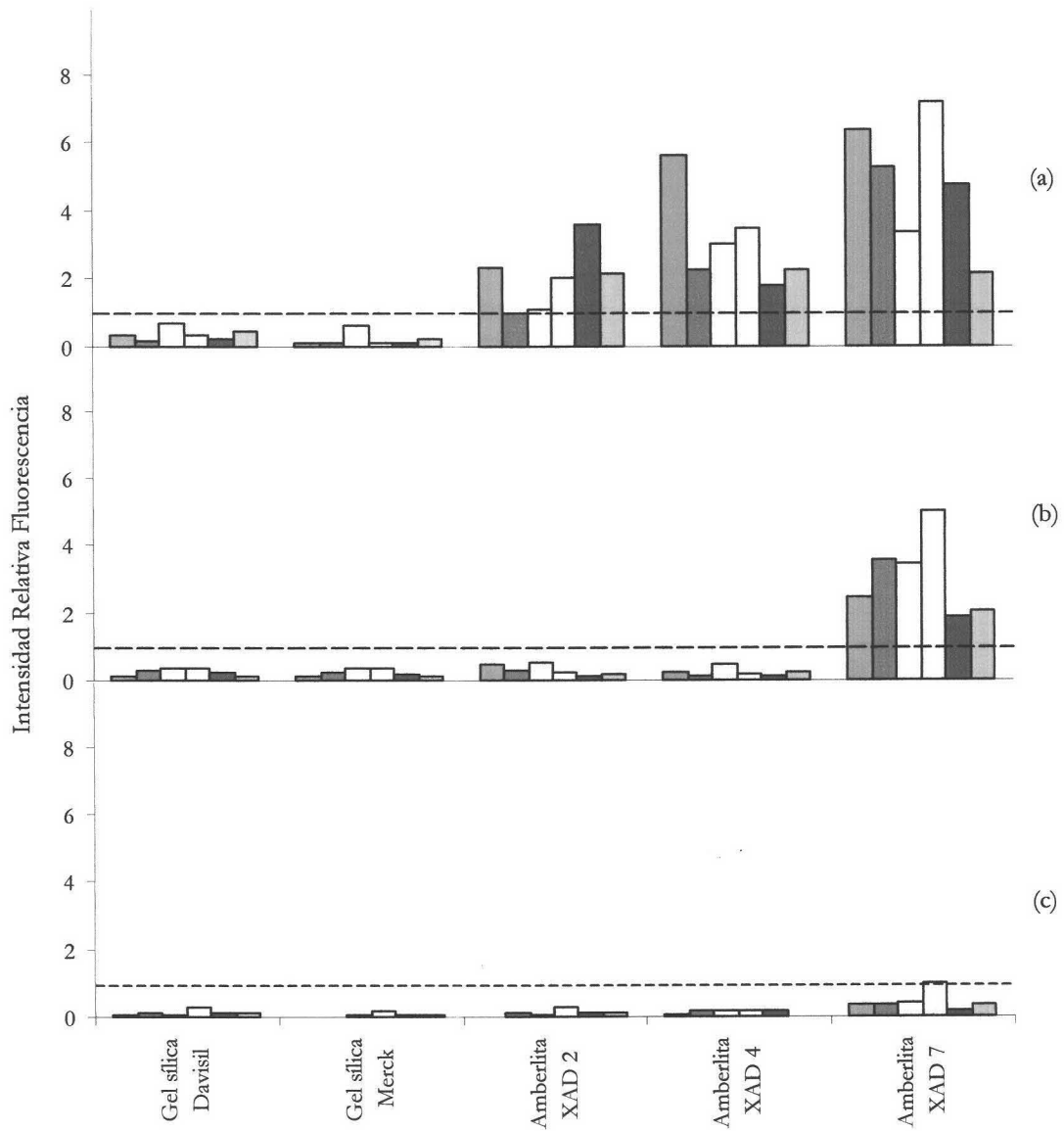


Figura V-9. Caracterización fluorescente en fase sólida del a)FLT, b)PYR y c)CHRY. [HAP] = 600 $\mu\text{g/L}$, pH = 7, ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

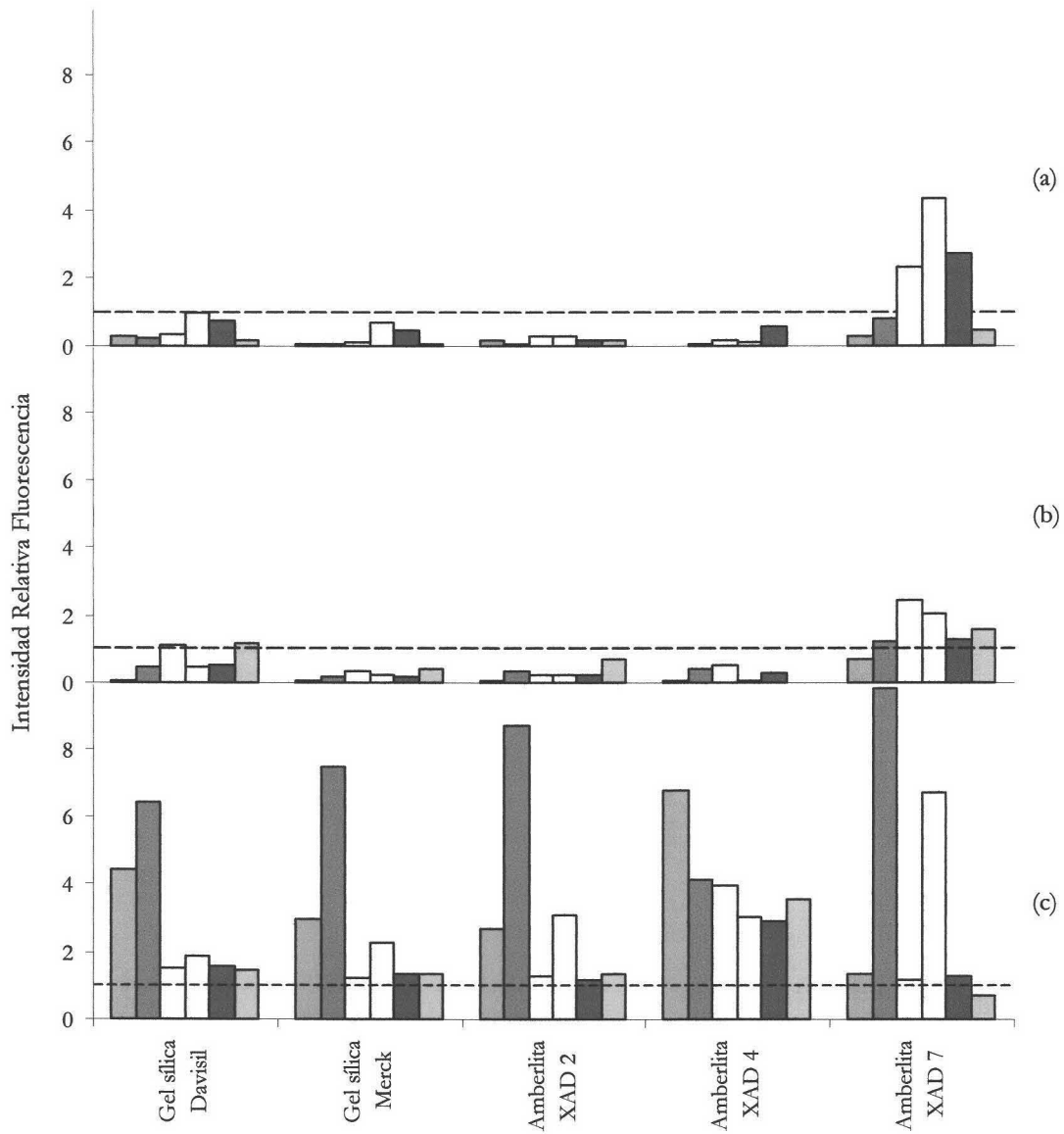


Figura V-10. Caracterización fluorescente en fase sólida del a)BaA, b)BkF y c)BbF. [HAP] = 600 µg/L, pH = 7, ■ etanol, ■ acetona, □ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

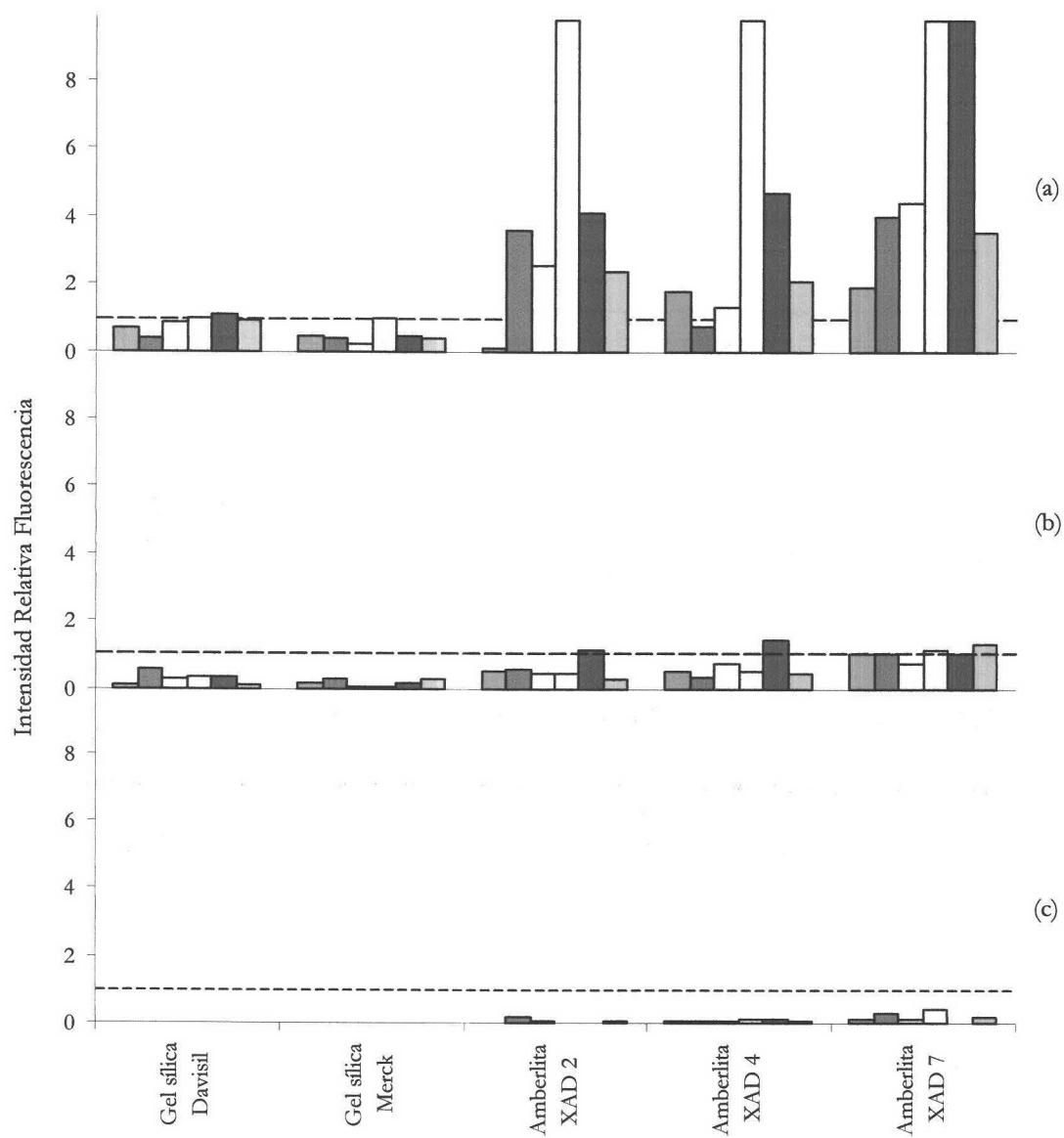


Figura V-11. Caracterización fluorescente en fase sólida del a)BaP, b)IcdP y c)BghiP. [HAP] = 600 µg/L, pH = 7, ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

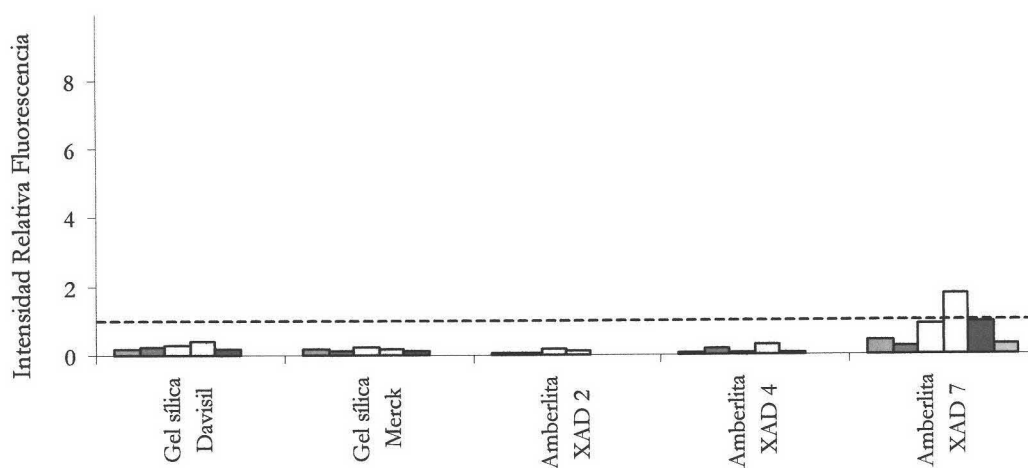


Figura V-12. Caracterización fluorescente en fase sólida del DBahA. [DBahA] = 600 µg/L, pH = 7, ■ etanol, ■ acetona, ■ acetonitrilo, ■ dimetilformamida, ■ 1,4-dioxano y ■ metanol.

Tabla V-5. Caracterización de los HAPs mediante fluorescencia en fase sólida

	Gel de Sílica Davisil	Gel de Sílica Merck	Amberlita XAD 2	Amberlita XAD 4	Amberlita XAD 7
NAPH	-	-	-	-	-
ACEN	-	-	-	-	-
ACE	-	-	-	-	✓
FLU	-	-	-	-	✓
PHE	-	-	-	-	✓
ANT	-	-	✓	✓	✓
FLT	-	-	✓	✓	✓
PYR	-	-	-	-	✓
CHRY	-	-	-	-	-
BaA	-	-	-	-	✓
BkF	-	-	-	-	✓
BbF	✓	✓	✓	✓	✓
BaP	-	-	✓	✓	✓
IcdP	-	-	-	-	-
BghiP	-	-	-	-	-
DBahA	-	-	-	-	✓

(✓) Interacción efectiva. (-) Interacción no efectiva.

Como se puede deducir de los resultados experimentales, NAPH, ACEN, CHRY, IcdP y BghiP no interaccionan de forma efectiva con ninguna de las resinas ensayadas. ACE, FLU, PHE, PYR, BaA, BkF y DbahA interaccionan de forma efectiva solamente con la resina Amberlita XAD 7. ANT, FLT y BAP interaccionan únicamente con las resinas Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7, y el BbF interacciona de forma efectiva con todas las resinas ensayadas.

Además, de este trabajo experimental se puede deducir, que cuando un analito interacciona con la Amberlita XAD 2 lo hace además con la Amberlita XAD 4, presentando diferencias señal-ruido muy semejantes en ambas resinas. Sin embargo, la interacción efectiva entre el analito y los soportes sólidos Amberlita XAD 2 y Amberlita XAD 4 no suponen una interacción efectiva con la Amberlita XAD 7.

Esto se debe a que la Amberlita XAD 2 y la Amberlita XAD 4 están formadas bajo una misma matriz de estireno y divinilbenceno pero con distinto grado de entrecruzamiento. Sin embargo, la Amberlita XAD 7 (con un nombre comercial parecido) posee una matriz de polimetacrilato¹⁴¹ (véase Figura V-13). Esto hace que la Amberlita XAD 7 sea capaz de interaccionar con la mayoría de los HAPs y la Amberlita XAD 2 y la Amberlita XAD 4 sólo interaccionen con 4 de los 16 HAPs evaluados, y que todos los analitos que interaccionan con la Amberlita XAD 2 lo hagan también con la Amberlita XAD 4 y viceversa.

Por tanto y a raíz de los resultados experimentales obtenidos, se podría desarrollar un sensor selectivo para la determinación de BbF usando como fase sensora Gel de Sílica Davisil o Gel de Sílica Merck. Además se podría desarrollar un sensor para el screening de cuatro de los 16 HAPs de la EPA (ANT, FLT, BaP y BbF) usando como fase sensora las resinas Amberlita XAD 2 o Amberlita XAD 4. También se podría abordar el desarrollo de un sensor para el screening de once de los 16 HAPs (ACE, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BkF, BbF, BaP y DbahA) usando como fase sensora la resina Amberlita XAD 7. Combinando las características de selectividad intrínseca de la fluorescencia con las características de selectividad que nos impone el uso de un soporte sólido (estudiado en este capítulo) se podría desarrollar un sensor selectivo para BaP.

141. J. Paleos, "Adsorption from aqueous and noaqueous solutions on hydrophobic and hydrophilic high surface-area copolymers". *Journal of Colloid and Interface Science* 31 (1969) 7.

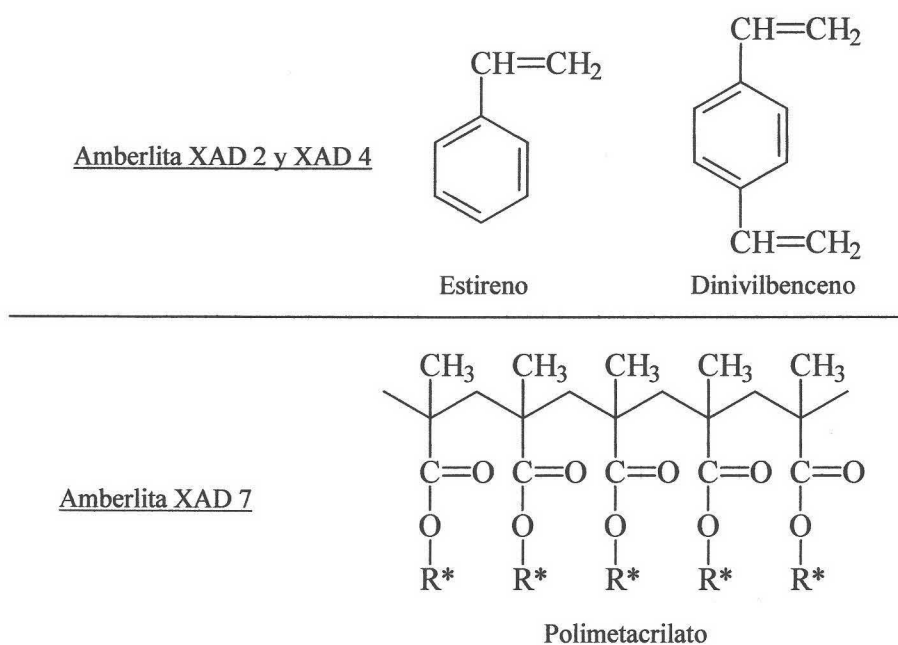


Figura V-13. Composición química de las resinas neutras Amberlita XAD 2, XAD 4 y XAD 7. R* residuo alifático polifuncional.

2.5 Conclusiones derivadas del anterior estudio experimental

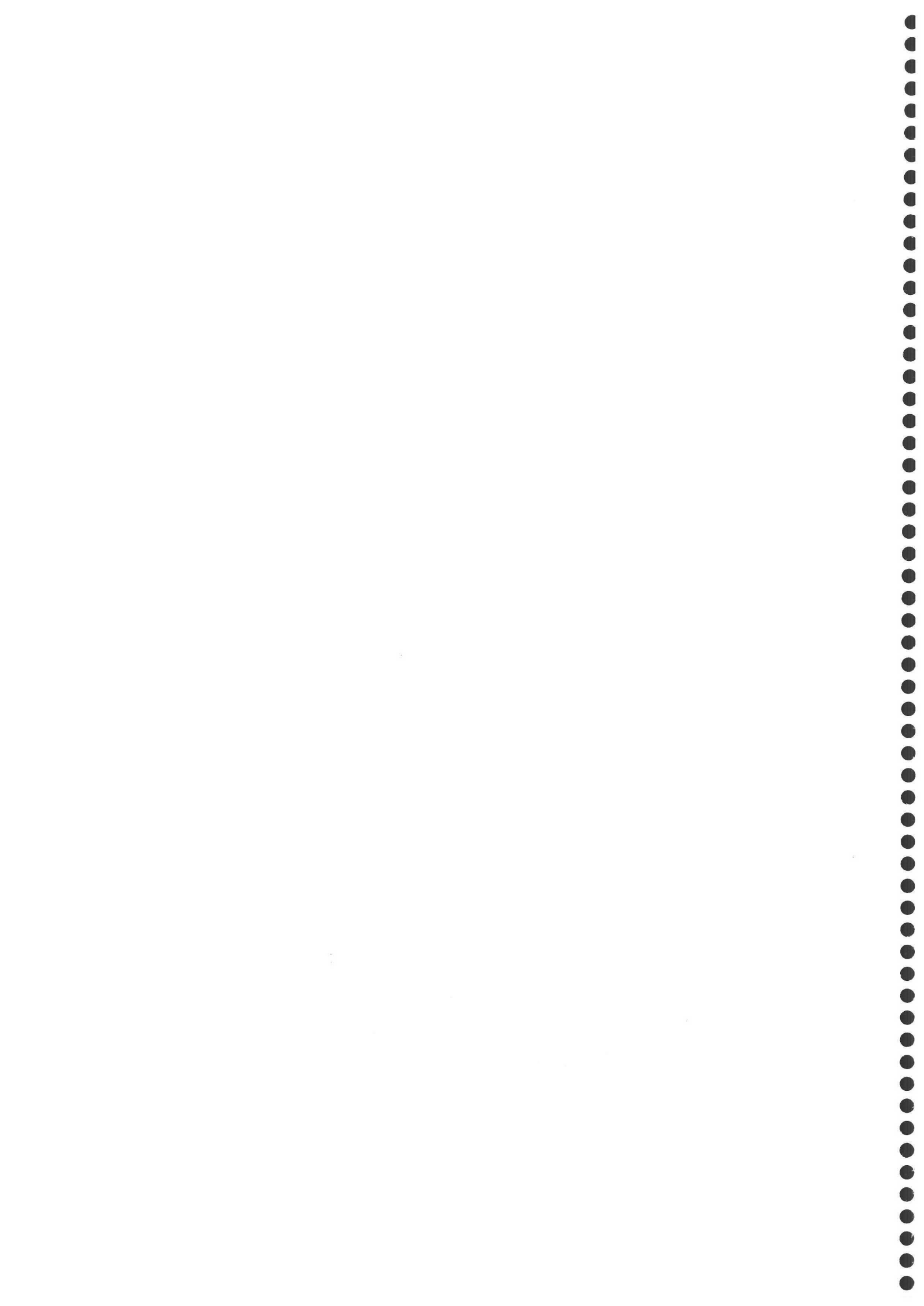
Las conclusiones obtenidas con las experiencias realizadas en este capítulo se pueden resumir en:

1. El pH no afecta a la interacción analito-soporte sólido a pesar de ser una variable importante en el desarrollo de futuros sensores fluorescentes.
2. Los HAPs, debido a su estructura apolar, interaccionan de forma efectiva únicamente cuando se usan soportes sólidos de carácter no iónico.
3. El disolvente orgánico presente en la muestra es una variable experimental que necesita un minucioso estudio, pues las diferencias señal-ruido dependen en gran medida del disolvente orgánico adicionado.

Este minucioso estudio ha allanado el campo de los dos siguientes capítulos de esta Memoria. Así, debido a la selectividad que nos ofrece de un lado la fluorescencia y de otro el uso de soportes sólidos, es por lo que creemos muy interesante desarrollar un optosensor selectivo para BaP en aguas de consumo humano. Debido a las interacciones efectivas que tienen lugar entre los HAPs y la Amberlita XAD 4 se desarrollará, igualmente, un optosensor para el screening de ANT, FLT, BaP y BbF.



CAPÍTULO VI
Desarrollo de un optosensor
fluorimétrico para la determinación de
benzo[a]pireno en aguas de consumo
humano



**CAPÍTULO VI. DESARROLLO DE UN OPTOSENSOR FLUORIMÉTRICO
PARA LA DETERMINACIÓN DE BENZO[A]PIRENO EN AGUAS DE
CONSUMO HUMANO**

1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas	329
1.1 Espectros del benzo[a]pireno en disolución.....	329
1.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina.....	329
1.3 Espectros en fase sólida.....	331
1.4 Diseño del sistema de flujo	334
1.5 Elección de la disolución regenerante	335
1.6 Optimización de los parámetros instrumentales.....	337
1.6.1 Voltaje del detector.....	337
1.6.2 Ancho de rendija.....	338
1.6.3 Resolución	339
1.7 Optimización de las variables experimentales	340
1.7.1 Influencia del pH.....	341
1.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora	342
1.7.3 Tipo y porcentaje de disolvente orgánico	343
1.8 Optimización de las variables de flujo.....	345
1.8.1 Efecto de la velocidad de flujo	345
1.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra	347
2 Características analíticas del método	347
2.1 Procedimiento operatorio.....	348
2.2 Recta de calibrado.....	348
2.3 Parámetros de fiabilidad	349

3 Selectividad del optosensor propuesto	351
4 Aplicación del método propuesto	354
4.1 Determinación de BaP en aguas potables.....	355
4.1.1 Estudios de recuperación	355

1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

1.1 Espectros del benzo[a]pireno en disolución

Las características espectroscópicas del BaP en disolución, han sido nuevamente establecidas. Para ello, se preparó una disolución de 100 $\mu\text{g/L}$ de BaP en agua bidestilada y se registraron los espectros de excitación y emisión fluorescente (véase la Figura VI-1). Se puede observar que posee fluorescencia intrínseca, con tres máximos de excitación a 350, 366 y 386 nm y tres máximos de emisión a 406, 430 y 456 nm, presentando la máxima excitación y emisión fluorescente a 386/406 nm, respectivamente.

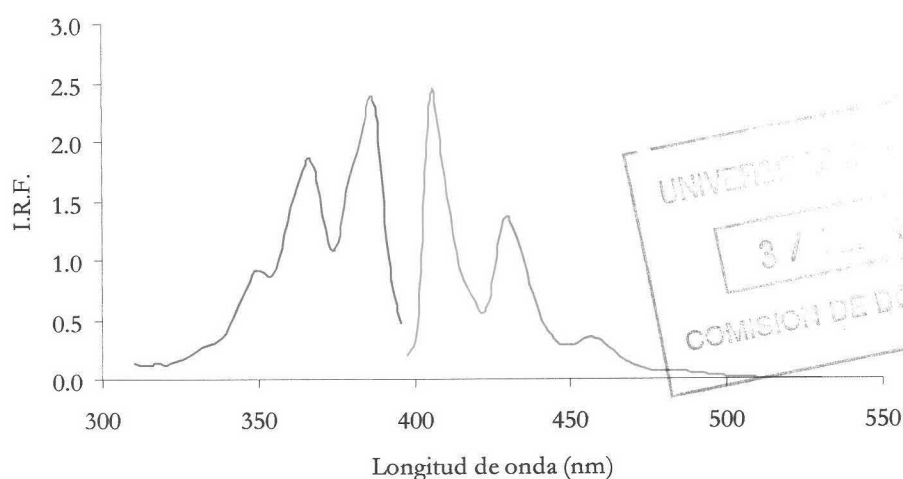


Figura VI-1. *Espectros de fluorescencia del BaP en disolución.*

1.2 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina

La fase sensora es un elemento imprescindible en el diseño de un sensor de flujo. En concreto, para desarrollar un optosensor selectivo de BaP, uno de los parámetros más críticos, debido al solapamiento espectral de los HAPs y a que en muestras reales siempre se encuentra acompañado de otros HAPs, es precisamente, su correcta selección.

Basándonos en los resultados experimentales obtenidos en el Capítulo V, se puede deducir que, para desarrollar un optosensor de BaP se pueden usar las resinas Amberlita XAD 2, Amberlita XAD 4 y Amberlita XAD 7.

Atendiendo a razones de selectividad se descartó la resina Amberlita XAD 7, pues con este soporte sólido interaccionan además del BaP 10 HAPs más. Con los soportes Amberlita XAD 2 y Amberlita XAD 4 interaccionan el mismo número de compuestos, concretamente tres, ANT, FLT y BbF, además del BaP, por lo que para seleccionar la fase sensora adecuada para el diseño del optosensor selectivo de BaP se evaluó la reproducibilidad de la señal sobre ambos soportes sólidos, observándose que la Amberlita XAD 4 proporcionaba señales más reproducibles, y por lo que fue ésta la seleccionada como fase sensora (véase Figura VI-2).

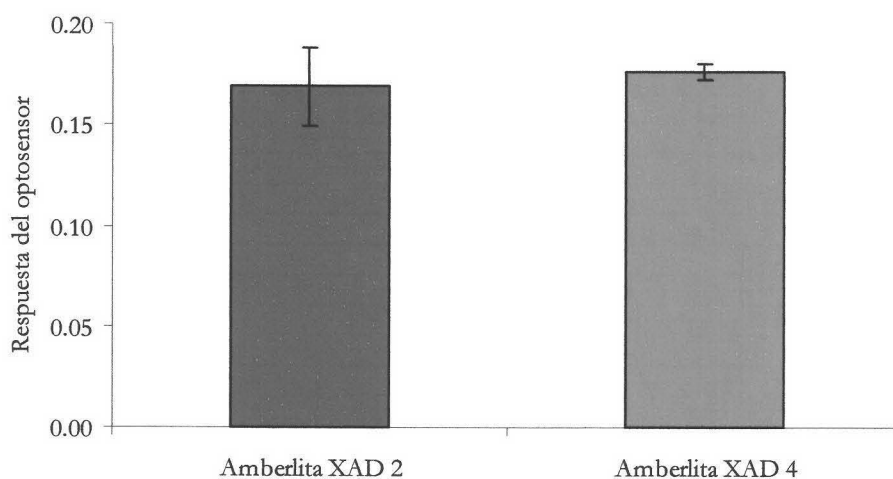


Figura VI-2. Influencia del tipo de resina en la respuesta del optosensor.

Tras la selección de la resina, también se llevó a cabo un estudio del tamaño de partícula más apropiado para la obtención de una buena fase sensora para el BaP. Para ello, la resina seleccionada se trituroó en un mortero de ágata y se tamizó, obteniendo tres tamaños: entre 80 y 120, 120 y 160 μm y 160 y 200 μm . Tamaños inferiores a 80 μm no se probaron ya que producen una gran presión en el sistema de flujo. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura VI-3.

Como se observa en esta figura, la mejor diferencia entre la señal y el ruido se obtiene con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm , observándose diferencias significativas entre los distintos tamaños de partícula ensayados.

Por lo tanto, la fase sensora seleccionada para el desarrollo del optosensor selectivo de BaP ha sido Amberlita XAD 4 con un tamaño de partícula entre 80 y 120 μm .

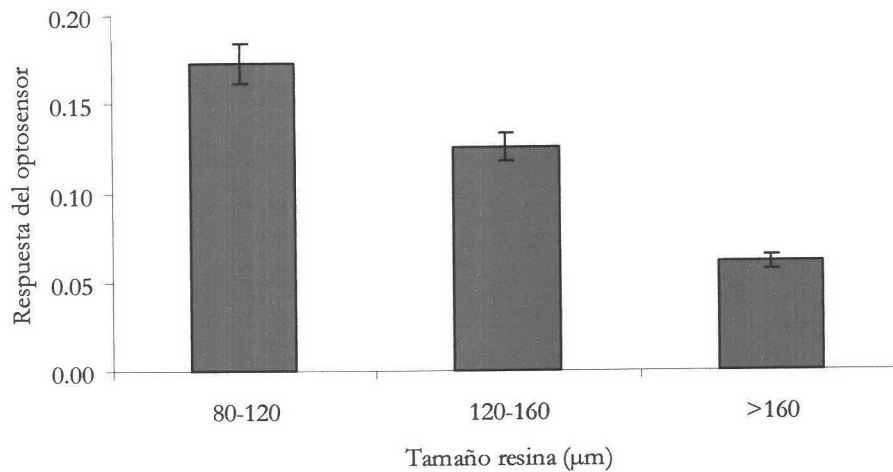


Figura VI-3. Efecto del tamaño de partícula de la Amberlita XAD 4 en el BaP. [BaP]=150 ng/L, pH=7 fijado con HCl y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm.

Fase sensora: Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 µm.

1.3 Espectros en fase sólida

Para el buen desarrollo de todo optosensor, es necesario conocer las características espectroscópicas del analito soportado sobre la fase sensora seleccionada.

Para ello, se preparó una suspensión de la resina elegida en una disolución de 150 ng/L de BaP a pH 7 y un 25% de 1,4-dioxano, se empaquetó en la cubeta de flujo convencional, la cual, a su vez, fue colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas de la fase sensora cuando está retenido el BaP. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda del BaP, obteniendo las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión del analito en estudio (véase la Figura VI-4).

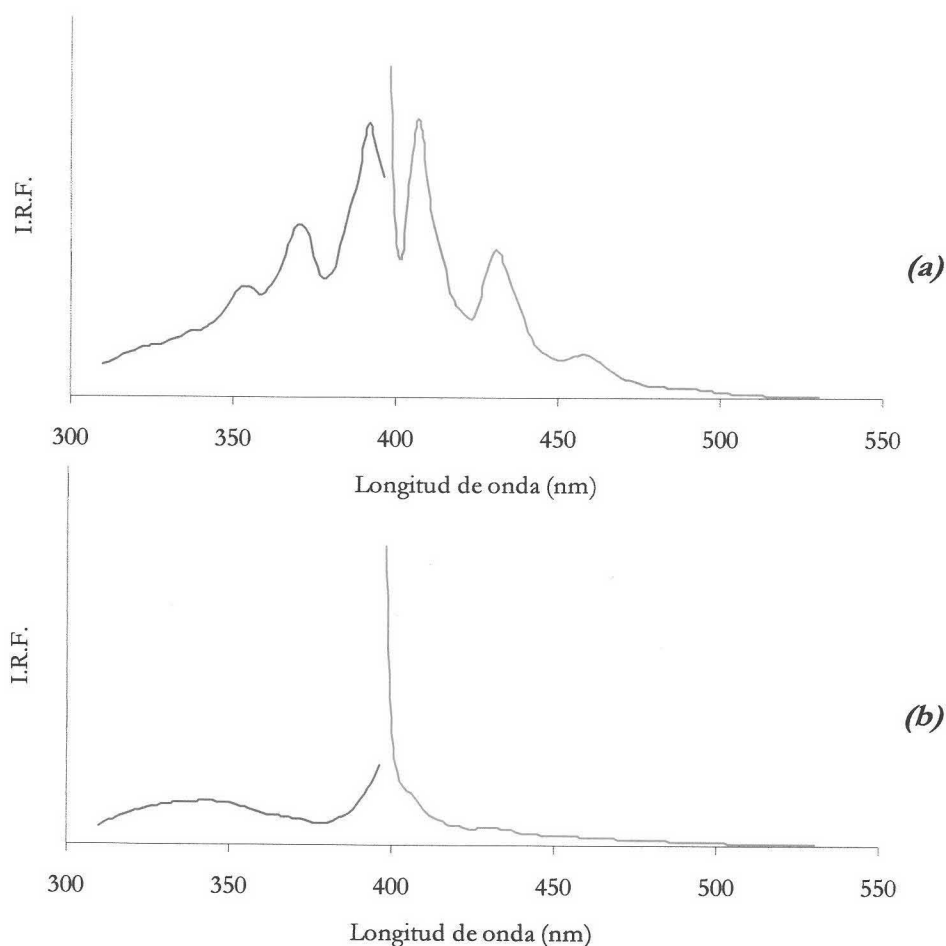


Figura VI-4. Espectros de excitación y emisión de a) BaP fijado en Amberlita XAD 4 y b) fase sensora. [BaP]=150 ng/L, pH=7 (fijado con HCl) y 25% de 1,4-dioxano. Voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm. $\lambda_{exc/em}=392/406$ nm

En esta figura se observa que cuando el BaP está retenido hay un aumento de la emisión fluorescente de la fase sensora. Para determinar cuales son las longitudes de onda más apropiadas para la medida de fluorescencia se procedió a la eliminación de la contribución de la fase sensora en los espectros obtenidos cuando el BaP estaba fijado mediante una substracción. El resultado obtenido se muestra en la Figura VI-5.

Se puede observar que presenta tres máximos de excitación a 354, 370 y 392 nm y tres máximos de emisión a 406, 430 y 458 nm en fase sólida, siendo similares a las longitudes de onda en disolución.

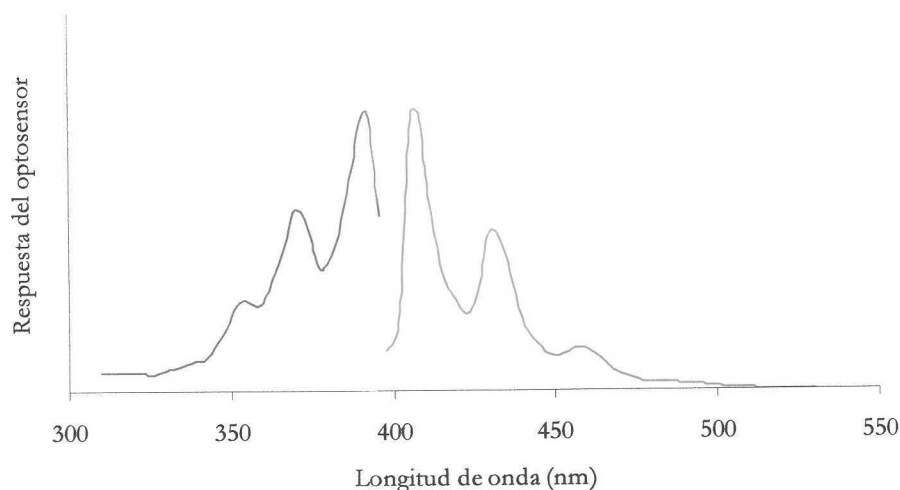


Figura VI-5. Características espectroscópicas del BaP fijado en Amberlita XAD 4.

Para seleccionar las longitudes de onda de medida del optosensor selectivo de BaP, se procedió a registrar un espectro de fluorescencia total de los 4 HAPs que interactúan con la fase sensora seleccionada, siguiendo el procedimiento indicado anteriormente, para poder así seleccionar una pareja de longitudes de onda en la que se elimine o minimice la contribución de los otros HAPs y que la respuesta del optosensor sea únicamente proporcional a la concentración de BaP presente en la muestra (véase Figura VI-6).

Como se puede ver en la Figura VI-5, se puede seleccionar una longitud de onda de excitación de 392 nm y una longitud de onda de emisión de 406 nm para la determinación selectiva de BaP, que además de proporcionar selectividad al optosensor coinciden con las que proporcionan una mayor excitación y emisión fluorescente de éste en fase sólida.

$$\lambda_{\text{exc/em}} = 392/406 \text{ nm}$$

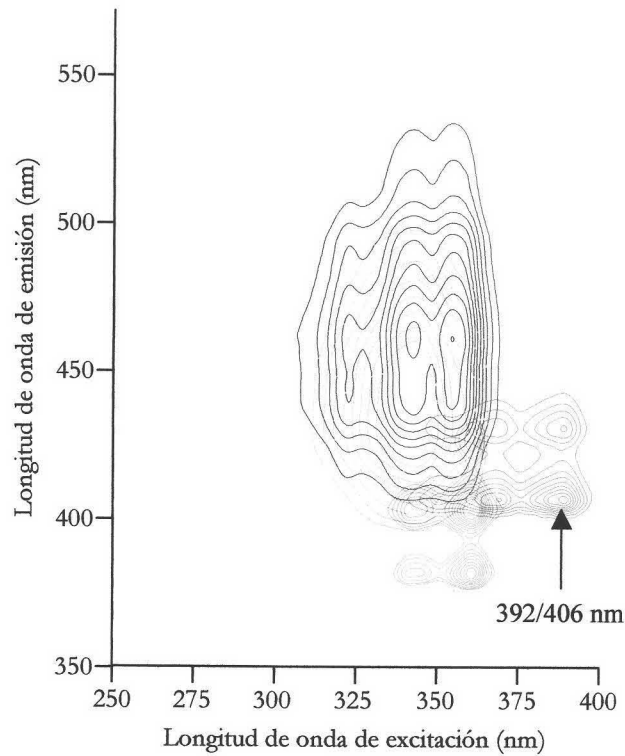


Figura VI-6. Curvas de nivel de los espectros tridimensionales de fluorescencia soportados en Amberlita XAD 4 de — ANT ([ANT]=100 $\mu\text{g/L}$, 600 V), — BaP, ([BaP]=100 $\mu\text{g/L}$, 500 V), — FLT ([FLT]=100 $\mu\text{g/L}$, 600 V) y — BbF ([BbF]=100 $\mu\text{g/L}$, 600 V).

1.4 Diseño del sistema de flujo

Para desarrollar un optosensor es necesario acoplar la fase sensora a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

El sistema FIA propuesto es análogo al convencional descrito en la introducción y a los utilizados en los capítulos anteriores (véase Figura VI-7) y consta de:

- Un sistema de propulsión consistente en una bomba peristáltica que arrastra a una disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvula A), que consta de una válvula de inyección y un bucle de volumen definido.
- Un sistema de regeneración que consta de una válvula (válvula B) y un bucle.

- Una zona de medida, que al tratarse de un optosensor convencional es una cubeta de flujo convencional en la que se empaqueta la fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 4) y colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro.

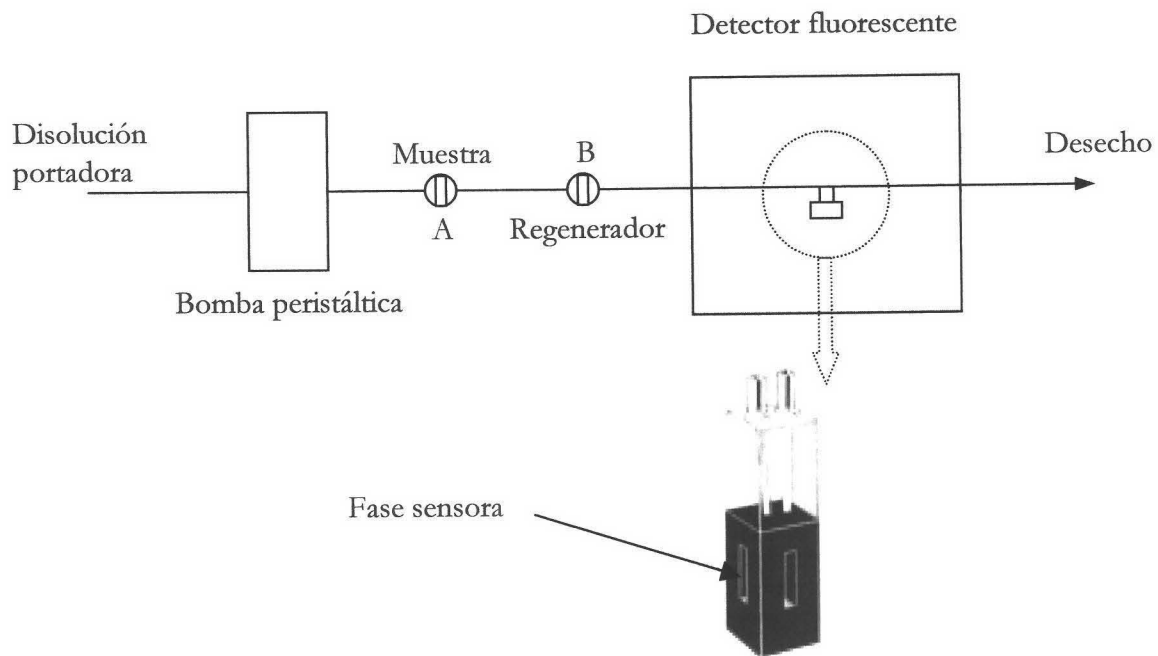


Figura VI-7. Sistema de flujo utilizado.

1.5 Elección de la disolución regenerante

La interacción entre el BaP y la fase sensora es irreversible en las condiciones de trabajo anteriormente mencionadas y, por tanto, es necesario el uso de una disolución regenerante que permita la reutilización del optosensor.

Se ha demostrado experimentalmente en el Capítulo V de esta Memoria, que el pH no afecta a la interacción entre el BaP y la Amberlita XAD 4 debido a que no poseen grupos ionizables. Por tanto, no se pueden utilizar como sistemas de regeneración ni ácidos ni bases.

Debido al carácter de la interacción que se produce entre el BaP y la Amberlita XAD 4, para producir la elución del analito es necesario el empleo de disolventes

orgánicos. Se estudió el efecto de seis disolventes orgánicos miscibles con agua (metanol, etanol, dimetilformamida, acetonitrilo, acetona y 1,4-dioxano) sobre el BaP retenido en la fase sensora.

Para ello, se llevaron a cabo 3 réplicas para cada uno de los regeneradores, inyectando 4 mL de una disolución de 150 ng/L de BaP a pH 7 y 25% de 1,4-dioxano (véase Figura VI-8), observándose, en todos los casos, que un cambio brusco de la constante dieléctrica produce una elución del BaP, pero esta elución es completa únicamente cuando se usa acetona como regenerante.

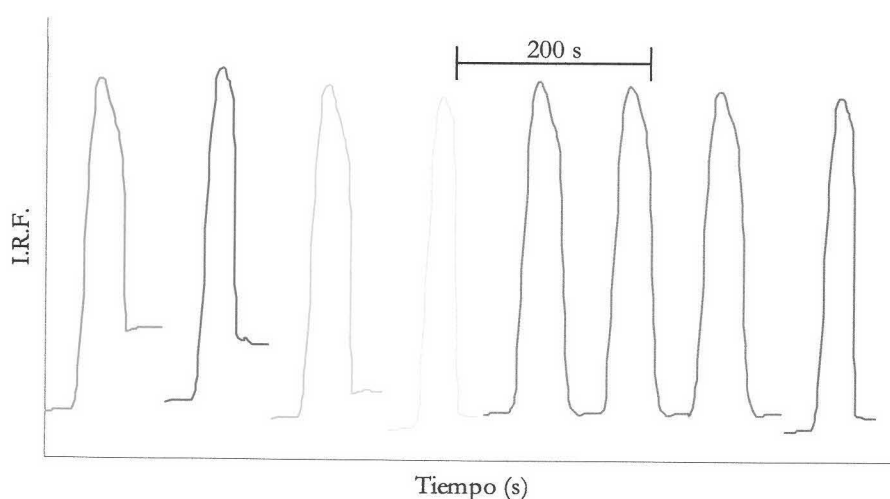


Figura VI-8. Regeneración de la fase sensora con — metanol, — etanol, — dimetilformamida, — acetonitrilo, — acetona y — 1,4-dioxano. [BaP]=150 ng/L, 25% 1,4-dioxano. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4 mL.

Además, se llevó a cabo un estudio del porcentaje mínimo de acetona que era necesario utilizar en la disolución regenerante, comprobando que sólo usando acetona pura se regeneraba eficientemente el sistema (véase Figura VI-9).

Regenerador: Acetona pura

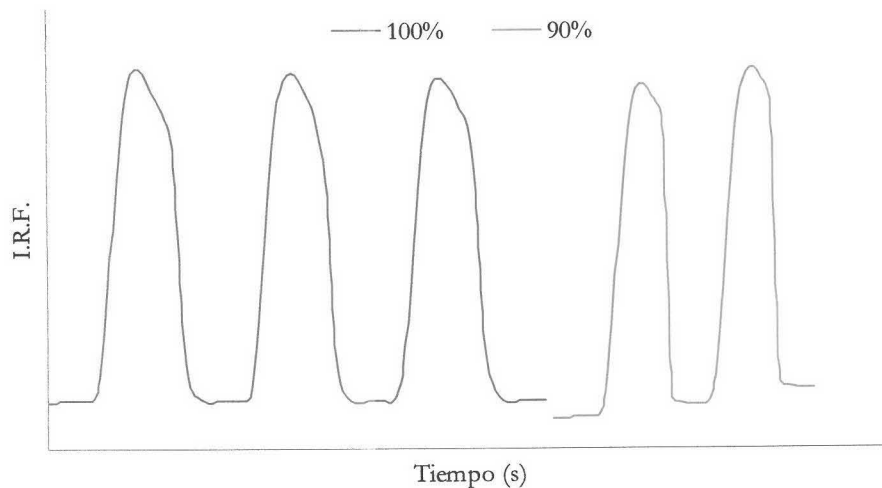


Figura VI-9. Porcentaje de acetona en la disolución regenerante. [BaP]=150 ng/L, 25% 1,4-dioxano . Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4 mL.

1.6 Optimización de los parámetros instrumentales

Seleccionada la fase sensora, las longitudes de onda de trabajo y el sistema de regeneración se procedió a estudiar los parámetros instrumentales con objeto de mejorar la diferencia señal-ruido y por tanto, las características analíticas del optosensor propuesto. Los parámetros instrumentales estudiados han sido: voltaje aplicado al detector, rendijas de los monocromadores de excitación y emisión y la resolución del instrumento.

1.6.1 Voltaje del detector

El primer parámetro instrumental estudiado fue el voltaje aplicado al fotomultiplicador, el cual afecta tanto al valor de la señal analítica como a la repetibilidad de la misma.

Para optimizar el voltaje del detector se inyectó una muestra de 150 ng/L de BaP a pH 7 y con un 25% de 1,4-dioxano obteniéndose la diferencia señal-ruido conforme se variaba el voltaje del detector realizando, en todos los casos, 3 réplicas a las condiciones instrumentales: $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm; rendijas de excitación y emisión de 4 nm; resolución 5 s; velocidad de flujo 2.0 mL/min y volumen de muestra inyectado 4 mL. Los resultados obtenidos se muestran en las Figura VI-10.

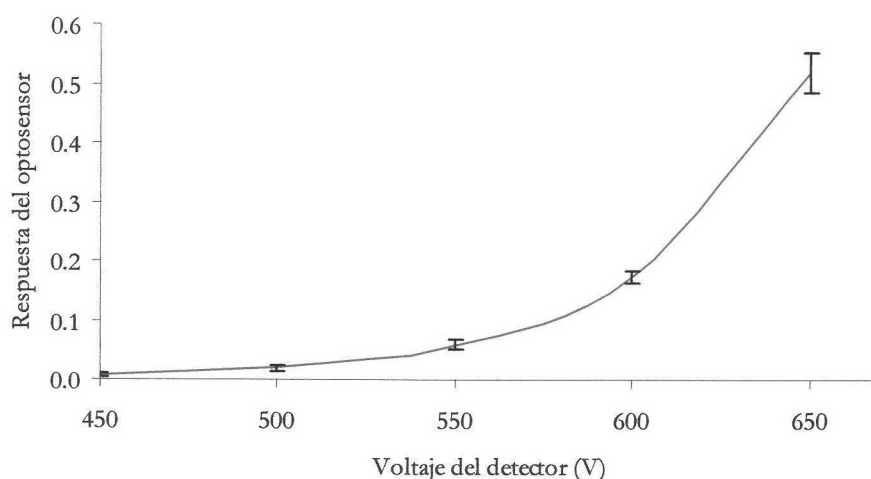


Figura VI-10. Influencia de la sensibilidad del detector sobre la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L, 25% 1,4-dioxano. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4 mL.

Como se observa en esta figura, un aumento el voltaje del detector produce un aumento de la respuesta del optosensor, pero también un aumento del error de la medida. Por tanto, y tratando de obtener la mayor diferencia entre la señal analítica y el ruido con el menor error posible, se seleccionó un voltaje de 600 V para el resto de trabajo experimental. Voltajes superiores a 650 VI no se pueden usar ya que se satura el detector.

Voltaje del detector: 600 V

1.6.2 Ancho de rendija

La apertura de las rendijas de excitación influye sobre la cantidad de luz que incide sobre la muestra y por tanto, sobre la luz que ésta emite. La apertura de la rendija de emisión influye sobre la cantidad de luz que llega al detector. Los valores de ambas rendijas pueden oscilar entre 0.5 y 16 nm.

Para comprobar el efecto que produce la anchura de las rendijas sobre la señal analítica se inyectó en el sistema una muestra de 150 ng/L de BaP a pH 7 y con un 25% de 1,4-dioxano y se fijaron los parámetros instrumentales a los valores óptimos establecidos

variando la anchura de las rendijas. Se realizaron tres réplicas para cada una de las rendijas ensayadas y el estudio se encuentra reflejado en la Figura VI-11.

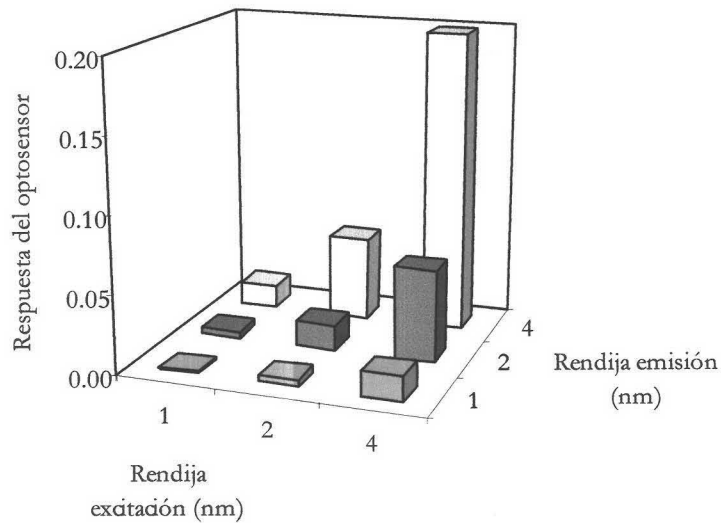


Figura VI-11. Influencia del ancho de rendija sobre la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L. pH=7 y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4 mL.

Como se puede observar, un aumento de la anchura de las rendijas provoca un aumento en la diferencia señal-ruido obteniéndose la mayor diferencia cuando la anchura de las rendijas es de 4 nm, tanto para la excitación como para la emisión. Aperturas de rendijas mayores a las seleccionadas no se pueden usar porque saturan la respuesta del detector.

Ancho de rendijas: 4/4 nm

1.6.3 Resolución

La resolución es el tiempo que transcurre entre las medidas realizadas por el instrumento y afecta a la forma y definición de los diagramas. Para ver el efecto que produce la resolución sobre estos parámetros se inyectó en el sistema una muestra de 150 ng/L de BaP a pH 7 y un 25% de 1,4-dioxano y se fijaron los parámetros instrumentales a

las condiciones óptimas establecidas variando la resolución del equipo. El estudio se encuentra reflejado en la Figura VI-12.

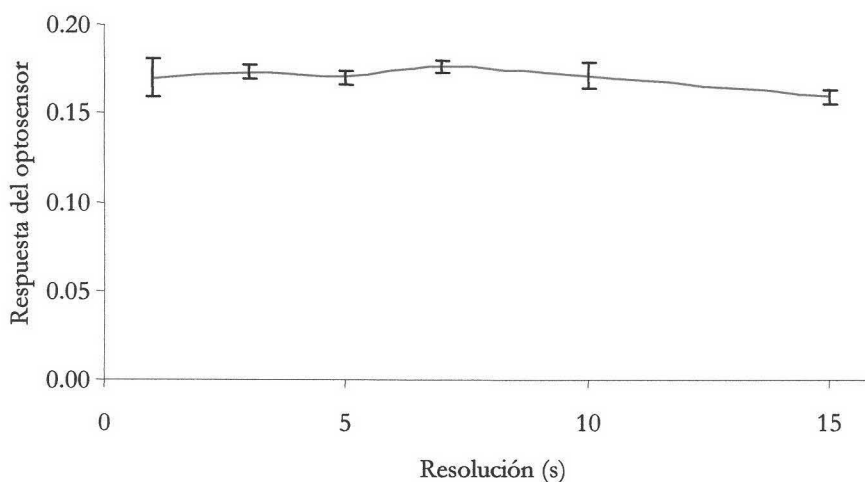


Figura VI-12. Influencia de la resolución del equipo en la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L. pH=7 y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4 mL.

Como se observa en la figura, la resolución no afecta ni a la respuesta del optosensor ni al error cometido en las medidas, por lo que para tener un número significativo de puntos y definir adecuadamente los picos de los diagramas se fijó una resolución de 5 s.

Resolución: 5 s

1.7 Optimización de las variables experimentales

Establecidos los parámetros instrumentales se procedió a estudiar la influencia de las variables experimentales para establecer sus valores óptimos. Las variables estudiadas han sido: pH, tipo y concentración de disolución reguladora y tipo y porcentaje de disolvente orgánico.

1.7.1 Influencia del pH

Como se demostró en el Capítulo V de esta Memoria, el pH no afecta a la fluorescencia intrínseca del BaP, pues éste no posee grupos ionizables, pero sí afecta a la interacción de éste con el soporte sólido seleccionado. Por tanto, como parámetro importante que debe ser establecido en el desarrollo de un optosensor, se procedió a su optimización.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones portadoras y de muestras de 150 ng/L de BaP, con pHs comprendidos entre 2 y 13 ajustados con HCl o NaOH y con un 25% de 1,4-dioxano en las muestras. Se realizaron 3 réplicas para cada experiencia y los resultados obtenidos se muestran en la Figura VI-13.

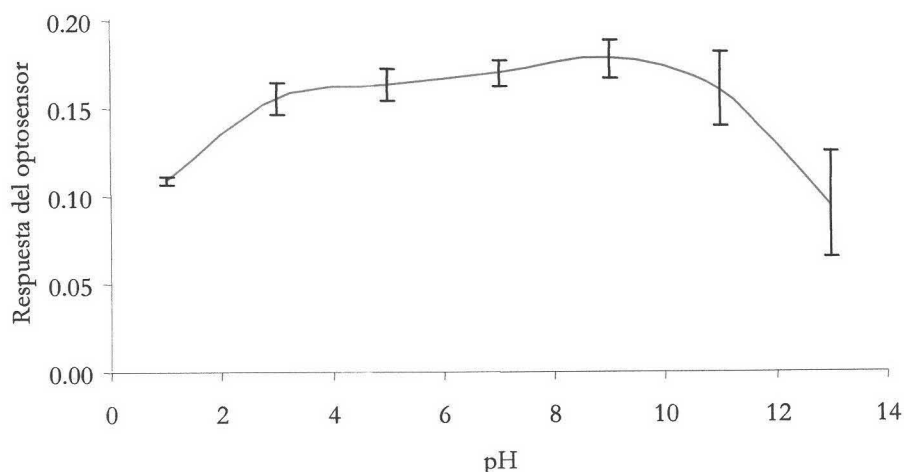


Figura VI-13. Influencia del pH en la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 4mL.

Se observa en dicha figura que la mayor diferencia señal-ruido se obtiene en el intervalo de pHs comprendido entre 4 y 10, pHs inferiores a 4 o superiores a 10 producen una disminución de la respuesta del optosensor, seleccionando un valor de 7 como pH de trabajo.

pH: 7.0

1.7.2 Tipo y concentración de disolución reguladora

Como en cualquier método, es necesario elegir una disolución reguladora que fije tanto el pH como la fuerza iónica del medio. Por ello, se estudió el efecto que producían sobre la diferencia señal-ruido el uso de las disoluciones reguladoras habituales disponibles que actuarán adecuadamente al pH de trabajo. Las disoluciones ensayadas fueron: citrato sódico/ HPO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones portadoras y muestras de 150 ng/L de BaP a pH 7 a una concentración de 5 mM de las dos disoluciones reguladoras estudiadas y se registró la variación de la señal y el ruido a las condiciones instrumentales óptimas. Se observó que cuando se utilizaba la disolución reguladora citrato sódico/ HPO_4^{2-} se producía un apelmazamiento e inutilización de la fase sensora, por lo que se seleccionó la disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ por no disponer de otra que pueda actuar a este pH y que sea de uso habitual en un laboratorio.

Disolución reguladora: $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$

Además, es necesario fijar una concentración de disolución reguladora para que la fuerza iónica de la disolución portadora y las muestras sea la misma.

Fueron ensayadas diferentes concentraciones de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ entre 0 y 30 mM, registrando tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas y los resultados alcanzados se muestran en la Figura VI-14.

Como se puede observar en esta figura, la concentración de la disolución reguladora no afecta significativamente a la intensidad de fluorescencia pero sí a la repetibilidad de las medidas, de modo que un aumento de la fuerza iónica del medio disminuye el error. Se seleccionó una concentración de disolución reguladora de 15 mM ya que el error obtenido es bastante bajo.

$[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}]$: 15 mM

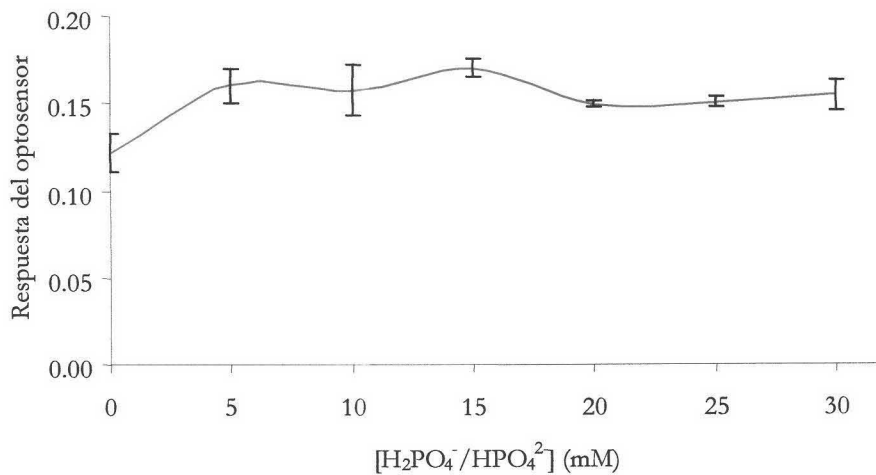


Figura VI-14. Influencia de la concentración de disolución reguladora en la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L, disolución reguladora empleada $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$ a pH 7 y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2.0 mL/min.

1.7.3 Tipo y porcentaje de disolvente orgánico

El disolvente orgánico se utiliza para ayudar a solubilizar al BaP e impedir que quede retenido en las tuberías del sistema de flujo.

Para llevar a cabo este estudio, a una serie de disoluciones de 150 ng/L de BaP en las condiciones experimentales óptimas anteriormente comentadas ($[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}]$ 15 mM a pH 7) se le adicionaron cantidades variables (entre un 0 y un 60 % v/v) de seis disolventes orgánicos miscibles con agua (acetonitrilo, acetona, 1,4-dioxano, etanol, metanol y dimetilformamida) y se registró la respuesta del optosensor en las condiciones instrumentales óptimas ($\lambda_{exc/em}$ =392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s) mientras la disolución portadora circulaba con una velocidad de flujo de 2.0 mL/min inyectando 3 réplicas de 4 mL de muestra. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura VI-15 (en esta figura se han eliminado los intervalos de error para mejorar su visualización).

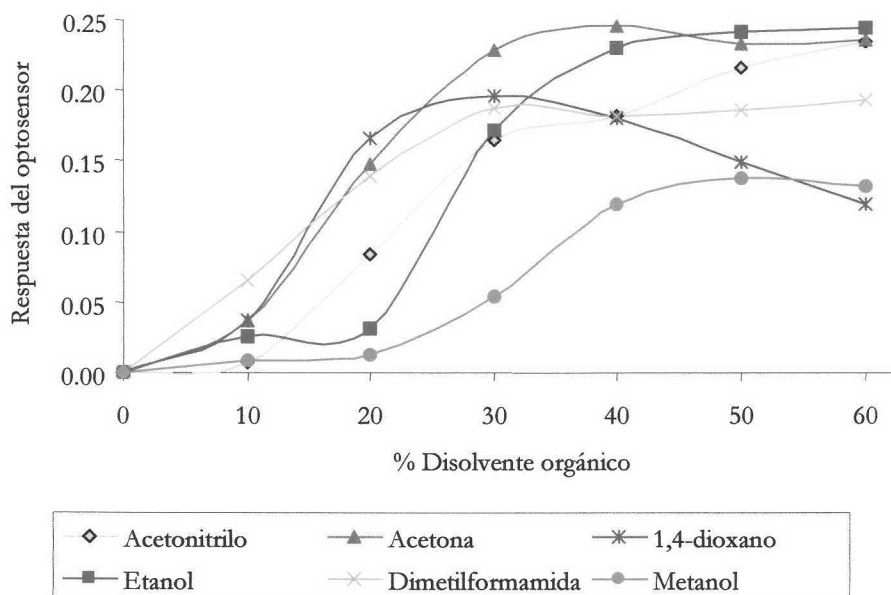


Figura VI-15. Influencia del tipo y porcentaje de disolvente orgánico presente en la muestra en la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L, [H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻] 15 mM a pH 7. λ_{exc/em} 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2.0 mL/min.

Como se puede observar en esta figura, el disolvente orgánico con el que se obtiene la mayor diferencia señal-ruído es la acetona, sin embargo, habría que usar porcentajes superiores a un 30% de acetona para solubilizar totalmente el BaP. El 1,4-dioxano proporciona señales del optosensor menores pero presenta una meseta a porcentajes comprendidos entre el 20 y el 40%. Por tanto, se seleccionó éste como disolvente orgánico y se fijó un 25 % v/v como porcentaje óptimo que debe adicionarse para asegurarse de que el BaP está disuelto y no queda retenido en las tuberías del sistema FIA.

Disolvente orgánico en las muestras: 1,4-dioxano al 25%

Además, también se llevó a cabo un estudio del porcentaje de 1,4-dioxano que era necesario adicionar al portador. Para ello, se prepararon una serie de disoluciones acuosas 15 mM de disolución reguladora H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻ a pH 7, se le adicionaron cantidades variables (entre un 0 y un 60 % v/v) de 1,4-dioxano y se utilizaron como disoluciones portadoras de una disolución de 150 ng/L de BaP en las condiciones experimentales óptimas anteriormente comentadas ([H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻] 15 mM a pH 7 y 25% de 1,4-

dioxano), registrándose la respuesta del optosensor en función del porcentaje de 1,4-dioxano que contenía la disolución portadora. Los resultados se muestran en la Figura VI-16.

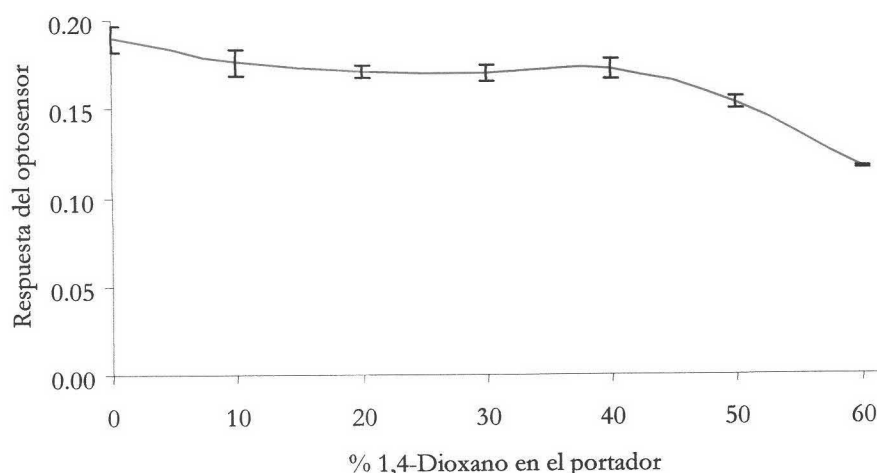


Figura VI-16. Influencia del porcentaje de 1,4-dioxano presente en el portador en la respuesta del optosensor. [BaP]=150 ng/L, $[H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}]$ 15 mM a pH 7 y 25% de 1,4-dioxano. $\lambda_{exc/em}$ 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Velocidad de flujo 2.0 mL/min, 3 inyecciones de muestra de volumen 4 mL.

Se puede observar que la presencia de disolvente orgánico en el portador no afecta significativamente a la respuesta del optosensor disminuyéndola, levemente, con porcentajes superiores al 50%. Además, aunque sea en pequeñas cantidades deteriora las gomas usadas en la bomba peristáltica, por lo que se optó por no adicionar disolvente orgánico al portador.

1.8 Optimización de las variables de flujo

Estudiados los parámetros instrumentales y variables experimentales se procedió al estudio de las variables que afectan al sistema de flujo. Entre éstas destacan: velocidad de flujo y volumen de inyección de muestra.

1.8.1 Efecto de la velocidad de flujo

Para que tenga lugar la emisión fluorescente del BaP en fase sólida es necesario que el analito que pasa a través de la resina quede retenido durante un cierto tiempo. Este proceso, al ser de naturaleza cinética, determina que la velocidad a la que pasa el portador y

con él el analito tenga una enorme importancia en la respuesta final del optosensor. Además también influye sobre el tiempo de respuesta del mismo.

Para evaluar dicha influencia, en las condiciones óptimas anteriormente establecidas, se varió la velocidad de flujo del portador realizando sucesivas inyecciones de una disolución de 150 ng/L de BaP y registrando la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor para cada flujo. Los resultados obtenidos se pueden observar en la Figura VI-17.

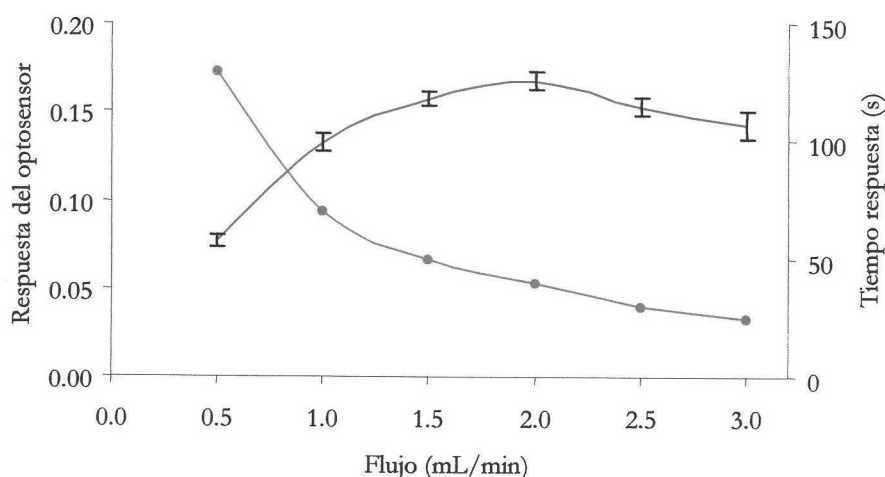


Figura VI-17. Influencia de la velocidad de flujo en la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor (● tiempo de respuesta). [BaP]=150 ng/L. [H₂PO₄⁻/HPO₄²⁻] 15 mM a pH 7, 25% de 1,4-dioxano. λ_{exc/em} 392/406 nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm, resolución 5 s. Volumen de muestra inyectado 4 mL.

Como se observa en esta figura un aumento de la velocidad de flujo implica un aumento de la señal del optosensor hasta velocidades de 2 mL/min, a partir de este valor un aumento de la velocidad de flujo no implica un aumento en la señal analítica. Además, un aumento de la velocidad de flujo conlleva también una disminución de los tiempos de respuesta del optosensor. Por tanto, para tener la mayor diferencia señal-ruido y un tiempo de respuesta adecuado se seleccionó una velocidad de flujo de 2 mL/min.

Velocidad de flujo: 2.0 mL/min

1.8.2 Influencia del volumen de inyección de muestra

El volumen de inyección de muestra influye en la sensibilidad del optosensor y también afecta al tiempo de respuesta. Para investigar dicha influencia, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección del analito (válvula A) de 0.5 a 4 mL y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 150 ng/L de BaP, registrándose la respuesta y el tiempo de respuesta del optosensor para cada bucle.

Un aumento del volumen de inyección de muestra provoca un aumento considerable de la señal analítica aunque también provoca un aumento del error del optosensor y un aumento del tiempo de respuesta. Pero debido a que los incrementos en el error y en el tiempo de respuesta no eran significativamente acusados y a que en muestras reales la concentración de BaP es muy baja, se seleccionó el mayor volumen de inyección posible para así conseguir la mayor diferencia señal-ruido y obtener el menor límite de detección posible.

Por otra parte, bucles superiores a 4 mL no se pueden usar ya que se crean sobrepresiones en el sistema y además es bastante difícil el llenado del bucle sin que aparezcan burbujas de aire en su interior, por lo que se fijó un volumen de inyección de muestra de 4 mL.

Volumen de inyección de muestra: 4 mL

2 Características analíticas del método

Una vez seccionada la fase sensora y la disolución regeneradora, optimizados los parámetros instrumentales y variables experimentales y FIA, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, la recta

de calibrado y los parámetros de fiabilidad, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*¹.

2.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de BaP en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 en una concentración de 15 mM y un 25% de 1,4-dioxano). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2.0 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: $\lambda_{\text{exc/em}}=392/406$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s y se registró la señal analítica para cada una de las disoluciones de BaP preparadas.

2.2 Recta de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para el método propuesto variando la concentración de BaP, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tabla VI-1 se muestran los datos obtenidos y en la Figura VI-18 se muestra la influencia de la concentración de BaP sobre la respuesta del optosensor.

Tabla VI-1. Réplicas obtenidas del calibrado

Concentración (ng/L)	Respuesta del optosensor		
50	0.067	0.072	0.069
100	0.121	0.115	0.119
150	0.174	0.170	0.164
200	0.226	0.223	0.227
250	0.274	0.268	0.271

1. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.

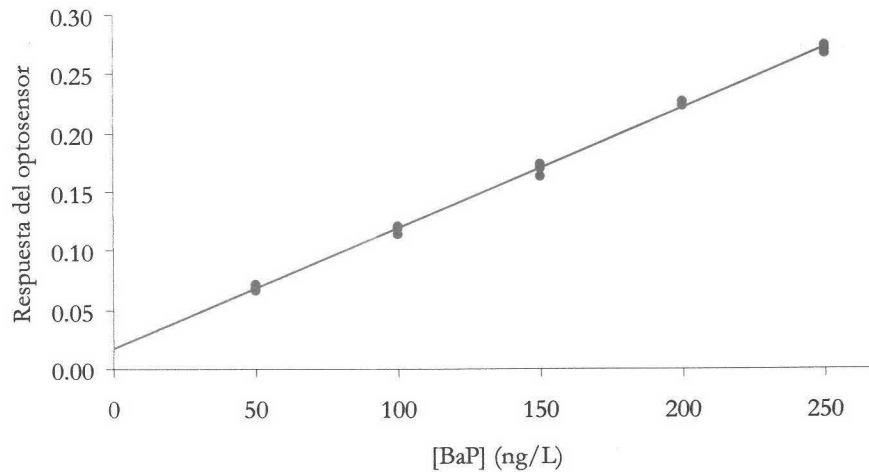


Figura VI-18. Curva de calibrado del optosensor de BaP.

2.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ La Tabla VI-2 muestra los resultados obtenidos.

Tabla VI-2. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC

Parámetros	Valor estimado
s_0	0.0010
Límite de detección (ng/L)	3.0
Límite de cuantificación (ng/L)	10.0
Rango dinámico lineal (ng/L)	3.0-250.0

Los parámetros de fiabilidad, según el método propuesto por Cuadros *y col.*, han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en la Tabla VI-3.

Tabla VI-3. Datos estadísticos de la recta

Datos estadísticos	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0176
Desviación estándar (s_a)	0.0022
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	12.4
Pendiente (b)	0.0010
Desviación estándar (s_b)	0.0000
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	1.3
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0036
Coefficiente de correlación (r)	0.9989
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.78

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en la Tabla VI-4.

Tabla VI-4. Desviaciones estándar

Concentraciones (ng/L)	s
50	2.6
100	2.3
150	2.2
200	2.3
250	2.6

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en la Tabla VI-5.

Tabla VI-5. Parámetros de fiabilidad

Parámetros	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	98.7	
Sensibilidad analítica (ng/L)	3.5	
Límite de detección aproximado (ng/L)	10.2	
Límite de cuantificación aproximado (ng/L)	34.1	
Intervalo dinámico lineal (ng/L)	10.2-250	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/L	5.1
	100 ng/L	2.4
	150 ng/L	1.5
	200 ng/L	1.2
	250 ng/L	1.0

3 Selectividad del optosensor propuesto

Dado que un optosensor se debe considerar como un dispositivo para solucionar un problema analítico determinado, el estudio de sustancias que puedan interferir en la respuesta del optosensor propuesto deberá realizarse en base a los posibles interferentes que puedan ser encontrados en la matriz donde se va a llevar a cabo la determinación.

El optosensor desarrollado se pretende aplicar al análisis de aguas de consumo humano. Por tanto, las especies que pueden interferir son especies iónicas y otros HAPs que puedan estar presentes en las aguas y que puedan interferir en la medida de la concentración de BaP. Por ello, se llevó a cabo un estudio sistemático del efecto de la presencia de iones potencialmente presentes en agua y otros HAPs que interaccionan con la resina seleccionada en la determinación de BaP.

Para llevar a cabo el estudio de la interferencia de especies iónicas se prepararon diferentes disoluciones de 150 ng/L de BaP a las condiciones experimentales anteriormente comentadas y se le adicionó diferentes cantidades de los iones que se encuentran en mayor

concentración en las aguas de consumo humano (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cl^- , SO_4^{2-} , NO_3^- y HCO_3^-) hasta una concentración 10^6 veces la concentración de BaP para todas las especies salvo para el HCO_3^- que fue 10^7 . En la Tabla VI-6 se muestran los valores “normales” de las especies iónicas estudiadas y los valores tolerados por el optosensor y en las Figuras VI-19 y VI-20 se muestran los resultados experimentales obtenidos.

Tabla VI-6. Interferencia de especies iónicas

Especie	Valores normales (mg/L) ²	Nivel de tolerancia (mg/L)
Aniones	Cl^-	8.0
	SO_4^{2-}	24.0
	NO_3^-	2.4
	HCO_3^-	185.0
Cationes	Na^+	< 2
	K^+	< 2
	Ca^{2+}	40
	Mg^{2+}	16

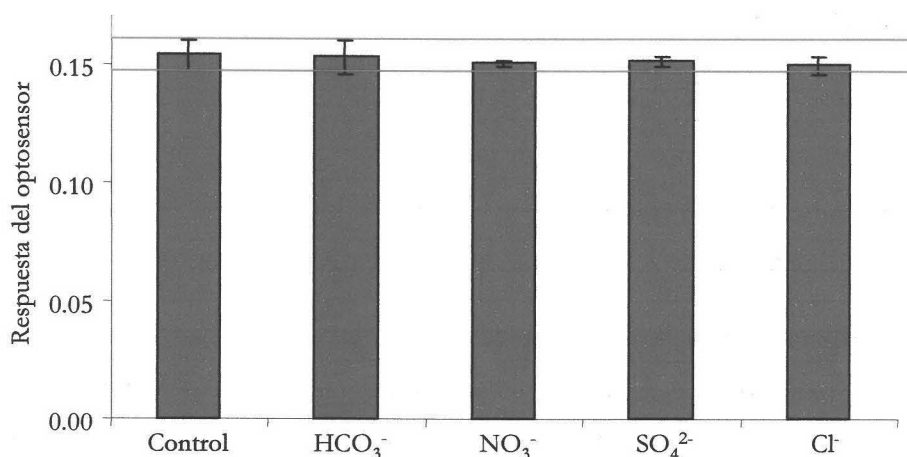


Figura VI-19. Estudio de interferencia de las especies aniónicas.

2. J. Catalán Lafuente. “Química del Agua”. Libería Editorial Bellisco, 1981, Madrid.

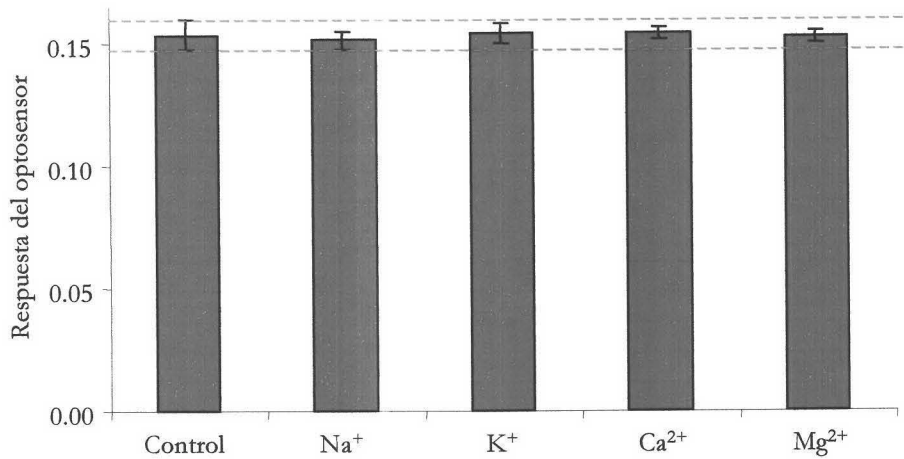


Figura VI-20. Estudio de interferencia de las especies catiónicas.

Para llevar a cabo el estudio de la interferencia de los tres HAPs (ANT, FLT y BbF) se prepararon diferentes disoluciones de 150 ng/L de BaP a las condiciones experimentales anteriormente comentadas y se le adicionó diferentes cantidades de los tres HAPs que interaccionan con la fase sensora seleccionada (ANT, FLT y BbF) pues el resto de los HAPs no se retienen en el soporte sólido utilizado y, por tanto, no interfieren en la respuesta del optosensor. El estudio sistemático se comenzó estudiando relaciones 1:1000 y si se producía interferencia de la especie estudiada se disminuía la relación progresivamente hasta que ésta cesara. En la Tabla VI-7 se muestran los valores tolerados por el optosensor de otros HAPs y en la Figura VI-21 se muestran los resultados experimentales obtenidos.

Tabla VI-7. Interferencia de otros HAPs

HAP	Nivel de tolerancia (ng/L)	Relación
ANT	37500	1:250
FLT	75000	1:500
BbF	75000	1:500

Como se puede ver en la Figura VI-21, las especies FLT y BbF no causan interferencia cuando la relación es igual o menor de 1:500, mientras que en el caso de ANT la relación debe ser 1:250 como máximo para que no interfiera.

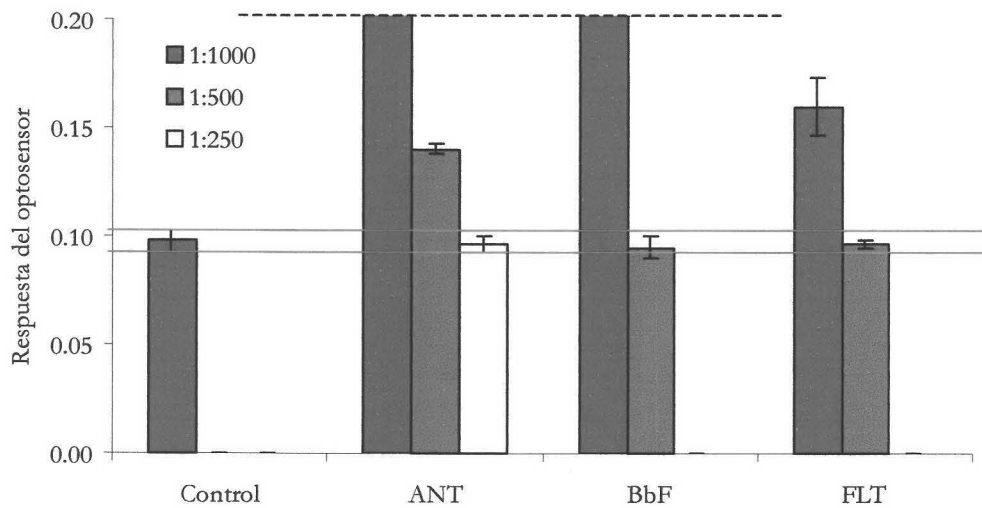


Figura VI-21. Estudio de interferencia de los HAPs ANT, BbF y FLT.

Como se puede deducir de este estudio, la presencia de altas concentraciones de especies iónicas no interfiere en la respuesta del optosensor y sólo la presencia de altas concentraciones de otros HAPs lo hace, por lo que aunque nos esté aportando datos erróneos, en referencia a la concentración de BaP, nos puede informar de altas concentraciones de otros HAPs, que aun no teniendo un elevado poder cancerígeno, a esas concentraciones son potentes contaminantes de las aguas.

4 Aplicación del método propuesto

El BaP es uno de los HAPs con una mayor actividad cancerígena y ha sido elegido por la nueva normativa de agua de la Unión Europea como uno de los indicadores más importantes de los HAPs en agua. Como se ha comentado en el Capítulo V, a temperatura ambiente los HAPs están principalmente asociados a partículas en aerosoles y de esta manera pueden ser aerotransportados a largas distancias por la acción de los vientos. Así, presentes en los humos y gases de combustión, los HAPs llegan a la superficie terrestre a través de la lluvia, alcanzándose de esta manera las aguas superficiales y subterráneas y, por último, la cadena alimenticia.

Por tanto, el BaP puede estar presente en las aguas de consumo humano. Por ello y debido al interés que en los últimos años están tomando las autoridades sanitarias en la zona de la Unión Europea y Estados Unidos, la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Unión Europea (UE) han dictado una serie de normas de calidad, en referencia a la presencia de HAPs y, en concreto, a la presencia de BaP y a las características de los métodos de análisis de estas sustancias, para las aguas potables³.

Así, la OMS y la UE han dictado que la concentración total máxima permitida de 6 HAPs (fluoranteno, benzo[b]fluoranteno, benzo[k]fluoranteno, benzo[a]pireno, benzo[ghi]perileno e indeno[123cd]pireno) en aguas potables no debe ser superior a 200 ng/L, y la concentración máxima de BaP no puede exceder de 10 ng/L. Además, también se contempla que los métodos de análisis de BaP en aguas de consumo humano deben poseer como mínimo un límite de cuantificación de 10 ng/L con una desviación estándar relativa del 25% como máximo³.

4.1 Determinación de BaP en aguas potables

Las muestras de agua analizadas provienen de la red de abastecimiento de 5 pueblos de la Comarca de Granada (Las Gabias, Atarfe, Gójar, Albolote y Ogíjares) y de Granada capital y fueron recogidas en recipientes de vidrio y conservadas a 4°C hasta el momento de su análisis.

4.1.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto, se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para dos niveles de concentración del BaP 150 y 10 ng/L, valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto y son superiores al límite de cuantificación del mismo. Previamente al análisis se comprobó que ninguna de las muestras de agua tomadas poseían BaP, por lo menos, a los niveles de detección del método y por tanto, para llevar a acabo este estudio hubo que fortificar las muestras.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomó el agua, se le adicionó la cantidad necesaria de BaP para que su concentración final fuera de 10 ó 150 ng/L y se le añadió la

3. Directiva Europea 98/83/EC

cantidad adecuada de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 y 1,4-dioxano para que tuviese una concentración de 15 mM y un porcentaje del 25 %, respectivamente.

Se realizaron 7 réplicas llevando a cabo el registro de la respuesta del optosensor a las condiciones instrumentales óptimas: $\lambda_{\text{exc/em}}=392/406$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; con una velocidad de flujo de 2.0 mL/min e inyectando 4 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la Tablas VI-8 a VI-13.

Tabla VI-8. Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Granada capital

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	156.6	104.4
2	150	157.2	101.8
7	150	166.5	111.0
4	150	150.6	100.4
5	150	148.7	99.1
6	150	152.7	101.8
7	150	152.7	101.8
Media	150	154.4	102.9
D.E.R. (%)	-	-	3.8
1	10	10.2	102.0
2	10	9.6	96.0
7	10	8.1	81.0
4	10	8.7	87.0
5	10	9.9	99.0
6	10	10.2	102.0
7	10	10.5	105.0
Media	10	9.6	96.0
D.E.R. (%)	-	-	9.2

Tabla VI-9 Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Las Gabias.

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	153.6	102.4
2	150	152.7	101.8
7	150	151.7	101.1
4	150	147.8	98.5
5	150	145.7	97.1
6	150	150.6	100.4
7	150	158.6	105.7
Media	150	151.5	101.0
D.E.R. (%)	-	-	2.8
1	10	10.2	102.0
2	10	9.9	99.0
7	10	9.9	99.0
4	10	10.2	102.0
5	10	9.9	99.0
6	10	9.9	99.0
7	10	11.7	117.0
Media	10	10.2	102.4
D.E.R. (%)	-	-	6.4

Tabla VI-10. Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Atarfe.

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	151.1	100.7
2	150	148.1	98.7
7	150	153.0	102.0
4	150	151.5	101.0
5	150	148.1	98.7
6	150	151.1	100.7
7	150	148.1	98.7
Media	150	150.3	100.2
D.E.R. (%)	-	-	1.5
1	10	10.0	100.0
2	10	9.7	97.0
7	10	9.7	97.0
4	10	10.0	100.0
5	10	10.3	103.0
6	10	10.0	100.0
7	10	9.1	90.9
Media	10	9.8	98.3
D.E.R. (%)	-	-	3.9

Tabla VI-11. Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Gójar.

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	149.0	99.3
2	150	155.0	103.3
7	150	151.1	100.7
4	150	153.0	102.0
5	150	147.0	98.0
6	150	148.1	98.7
7	150	153.0	102.0
Media	150	150.9	100.6
D.E.R. (%)	-	-	2.0
1	10	9.7	97.0
2	10	10.0	100.0
7	10	9.1	90.9
4	10	8.5	84.9
5	10	10.3	103.0
6	10	11.5	115.2
7	10	9.7	97.0
Media	10	9.8	98.3
D.E.R. (%)	-	-	9.7

Tabla VI-12. Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Albolote.

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	153.0	102.0
2	150	155.0	103.3
7	150	152.0	101.3
4	150	149.0	99.3
5	150	146.1	97.4
6	150	154.1	102.7
7	150	151.1	100.7
Media	150	151.4	100.9
D.E.R. (%)	-	-	2.0
1	10	10.3	103.0
2	10	10.3	103.0
7	10	9.7	97.0
4	10	10.9	109.1
5	10	10.0	100.0
6	10	10.3	103.0
7	10	9.7	97.0
Media	10	10.2	101.7
D.E.R. (%)	-	-	4.2

Tabla VI-13. Datos de recuperación de las réplicas del análisis de BaP en agua de la red de abastecimiento de Ogijares.

Muestra	Valor añadido (ng/L)	Valor encontrado (ng/L)	% Recuperación
1	150	152.0	101.3
2	150	150.0	100.0
7	150	152.0	101.3
4	150	143.1	95.4
5	150	152.0	101.3
6	150	154.1	102.7
7	150	155.0	103.3
Media	150	151.2	100.8
D.E.R. (%)	-	-	2.6
1	10	10.0	100.0
2	10	9.4	93.9
7	10	10.3	103.0
4	10	9.4	93.9
5	10	10.3	103.0
6	10	11.5	115.2
7	10	9.1	90.9
Media	10	10.0	100.0
D.E.R. (%)	-	-	8.2

Como se demuestra de los resultados obtenidos, el optosensor propuesto es una potente herramienta para el control de BaP en muestras de agua potable, ya que es capaz de detectar y cuantificar bajos niveles de BaP en muestras de aguas de consumo humano con desviaciones estándares relativas adecuadas, cumpliendo la normativa de la UE y la OMS sin necesidad de llevar a cabo ningún tratamiento previo de la muestra y proporcionando datos de forma rápida y sencilla.

En la Figura VI-22 se muestra la señal que proporciona el optosensor cuando se inyectan 3 muestras de agua que contienen 10 ng/L de BaP y dos que no han sido fortificadas con BaP.

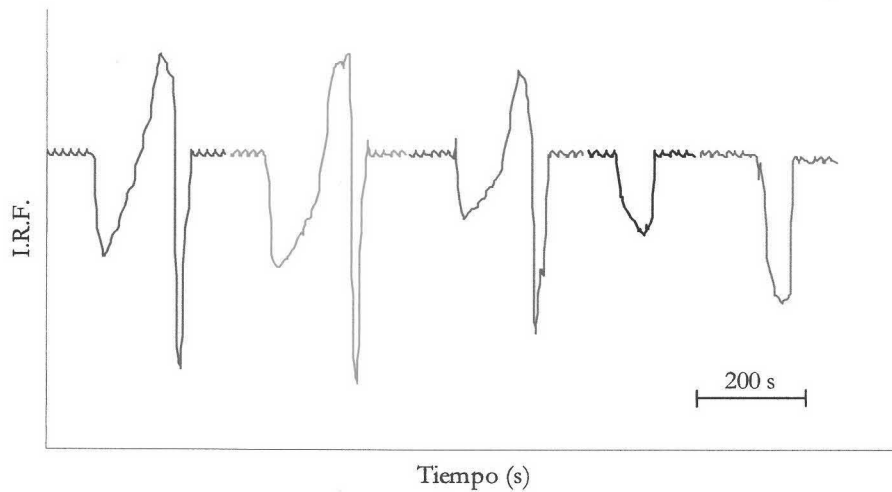


Figura VI-22. *Respuesta del optosensor propuesto del estándar de 10 ng/L (—), dos muestras de agua fortificadas con 10 ng/L de BaP (— Atarfe y — Gójar) y dos sin fortificar (— Atarfe y — Gójar).*

Como se observa en esta figura, hay una diferencia significativa entre la señal producida por el agua fortificada y sin fortificar, por lo que puede ser usado además de para cuantificar la cantidad de BaP presente en un agua, como sensor tipo alarma para el control de rutina en los laboratorios de las empresas suministradoras de agua potable.



CAPÍTULO VII

Desarrollo y comparación de un optosensor fluorimétrico convencional, un optosensor de fibra óptica usando como detector una CCD y el uso de redes neuronales para la determinación de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno en agua

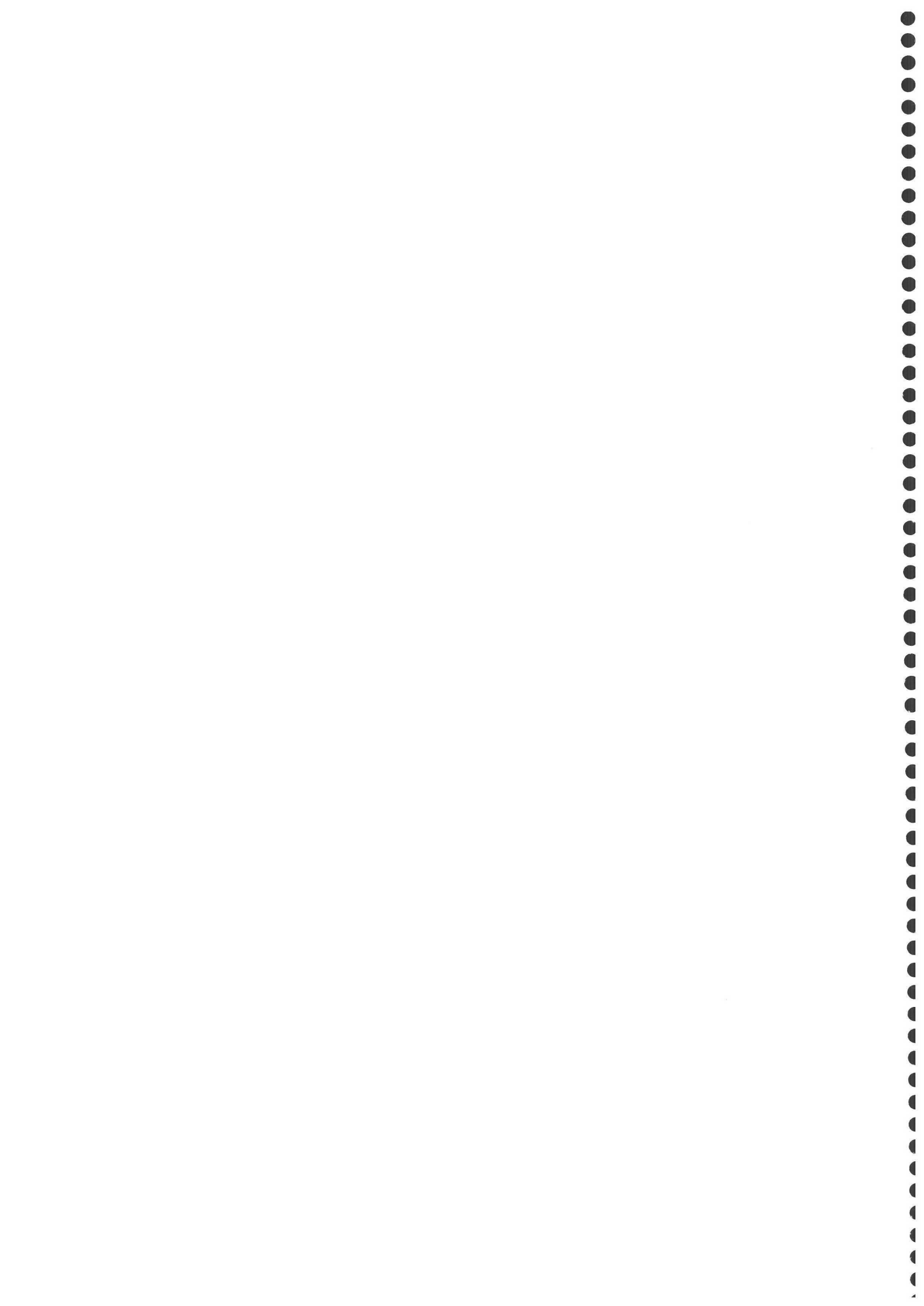


**CAPÍTULO VII. DESARROLLO Y COMPARACIÓN DE UN OPTOSENSOR
FLUORIMÉTRICO CONVENCIONAL, UN OPTOSENSOR DE FIBRA
ÓPTICA USANDO COMO DETECTOR UNA CCD Y EL USO DE REDES
NEURONALES PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTRACENO,
BENZO[A]PIRENO, FLUORANTENO Y BENZO[B]FLUORANTENO EN
AGUA**

1 Desarrollo de un optosensor fluorescente para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un fluorímetro convencional.....	369
1.1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas.....	369
1.1.1 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina.....	369
1.1.2 Diseño del sistema de flujo	370
1.1.3 Elección de la disolución regenerante	371
1.1.4 Selección de la longitud de onda del antraceno, fluoranteno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno en fase sólida para su determinación individual.....	372
1.1.5 Tipo y porcentaje de disolvente orgánico	374
1.1.6 Efecto del pH.....	377
1.1.7 Tipo y concentración de disolución reguladora	379
1.1.8 Efecto de la velocidad de flujo	381
1.1.9 Influencia del volumen de inyección de muestra.....	383
1.2 Establecimiento de las condiciones óptimas para la determinación conjunta de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno	384
1.2.1 Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.....	384
1.2.2 Estudio de la aditividad de las señales	390
1.3 Características analíticas del método.....	391
1.3.1 Procedimiento operatorio.....	392

1.3.2 Rectas de calibrado	392
1.3.3 Parámetros de fiabilidad	395
1.4 Aplicaciones del optosensor de screening de ANT, BaP, FLT y BbF	402
1.4.1 Estudios de recuperación	402
2 Desarrollo de un optosensor fluorescente de fibra óptica para la determinación simultánea de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un equipo modular equipado con una CCD	406
2.1 Desarrollo instrumental	406
2.2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas	409
2.2.1 Diseño del sistema de flujo	409
2.3 Establecimiento de las condiciones óptimas para la determinación conjunta de los cuatro HAPs.....	410
2.3.1 Distribución de la longitud de onda en la CCD.....	410
2.3.2 Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.....	411
2.3.3 Estudio de la aditividad de las señales	416
2.3.4 Estudio del tiempo de respuesta del optosensor	417
2.4 Características analíticas del método.....	418
2.4.1 Procedimiento operatorio.....	419
2.4.2 Rectas de calibrado	419
2.4.3 Parámetros de fiabilidad	422
2.5 Aplicaciones del optosensor de fibra óptica para la determinación conjunta de ANT, BaP, FLT y BbF	429
2.5.1 Estudios de recuperación	429

3 Desarrollo de un optosensor fluorescente para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un fluorímetro convencional y redes neuronales.....	433
3.1 Procedimiento operatorio.....	433
3.2 Tipo y estructura de la red neuronal.....	434
3.3 Aprendizaje de la red neuronal.....	436
3.3.1 Parámetros de aprendizaje.....	441
3.4 Generalización de la red neuronal.....	447
3.3.1 Estudio de recuperación.....	448
4 Comparación de los sensores para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno propuestos.....	451
4.1 Simultaneidad de las medidas.....	451
4.2 Límites de detección	451
4.3 Precio.....	452
4.4 Portabilidad y miniaturización.....	452
4.5 Tiempo de respuesta	453
4.6 Aplicaciones prácticas	453
4.7 Conclusiones experimentales.....	454



1 Desarrollo de un optosensor fluorescente para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un fluorímetro convencional

Según se ha demostrado en el capítulo V, se puede desarrollar un optosensor fluorescente para ANT, BaP, FLT y BbF sin que interfieran el resto de HAPs de la EPA usando como fases sensoras las Amberlitas XAD 2 o XAD 4.

Para ello, en primer lugar se llevó a cabo una optimización de las variables experimentales que afectan al optosensor para cada uno de los analitos en estudio de forma independiente, para conseguir posteriormente, establecer las condiciones óptimas para la determinación de los cuatro conjuntamente. En un segundo paso se procedió a establecer las condiciones instrumentales de medida para la resolución y determinación de los cuatro analitos de forma simultánea, establecer el método analítico y aplicarlo a muestras reales.

1.1 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

1.1.1 Selección de la fase sensora: tipo y tamaño de resina

La elección de la fase sensora afecta a la selectividad, característica imprescindible para llevar a cabo las determinaciones conjuntas.

Partiendo de las observaciones experimentales recogidas en el capítulo V, es posible llevar a cabo una determinación de ANT, BaP, FLT y BbF sin que interfieran los restantes HAPs de la EPA usando como fases sensoras dos resinas no iónicas tipo Amberlita denominadas Amberlita XAD 2 y Amberlita XAD 4. Debido a su mayor reproducibilidad y sobre todo a su fácil regeneración se seleccionó como fase sensora la Amberlita XAD 4 (véase la Figura VII-1).

También se llevó a cabo un estudio del tamaño de partícula más apropiado para obtener la mayor diferencia señal-ruido. Para ello, la resina seleccionada se trituró en un mortero de ágata y se tamizó a tres intervalos de tamaño: entre 80 y 120, 120 y 160 y 160 y 200 μm , obteniendo la mejor diferencia entre la señal y el ruido con un tamaño de partícula en el intervalo de 80 a 120 μm . Tamaños inferiores a 80 μm no se pueden emplear ya que producen sobrepresiones en el sistema de flujo (véase la Figura VII-2).

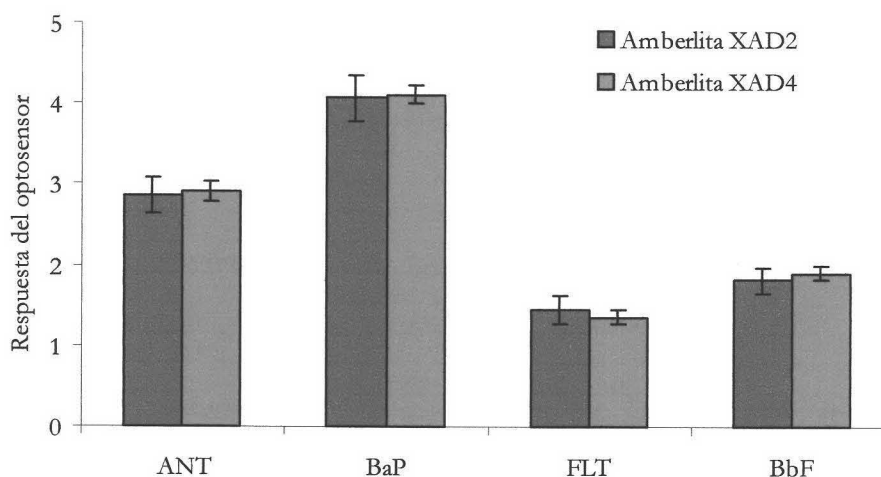


Figura VII-1. Influencia del tipo de resina sobre la respuesta del optosensor.

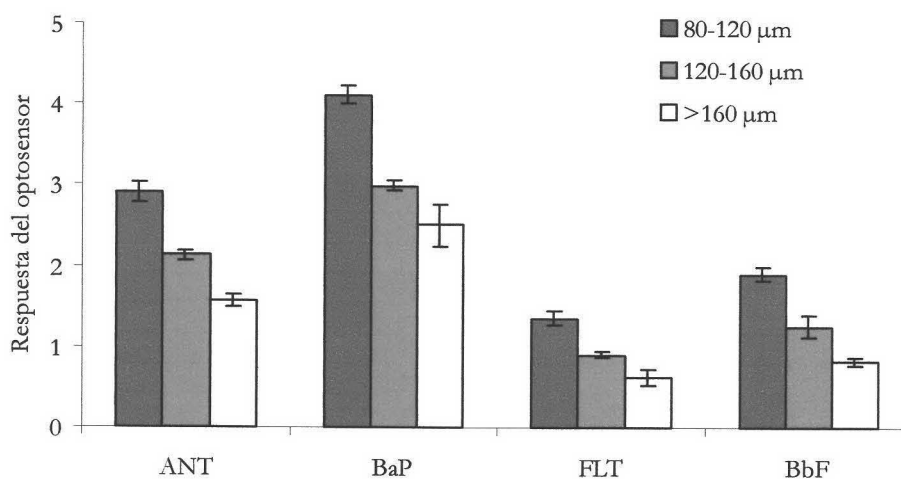


Figura VII-2. Influencia del tamaño de resina sobre la respuesta del optosensor.

Por lo tanto, la fase sensora seleccionada ha sido Amberlita XAD 4 con un tamaño de partícula entre 80 y 120 µm.

Fase sensora: Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 µm.

1.1.2 Diseño del sistema de flujo

El sistema de flujo utilizado para el desarrollo del optosensor de screening de cuatro HAPs usando como transductor un fluorímetro convencional es el mismo sistema

de flujo que se ha usado en los capítulos anteriores y explicado en la parte experimental (véase Figura VII-3).

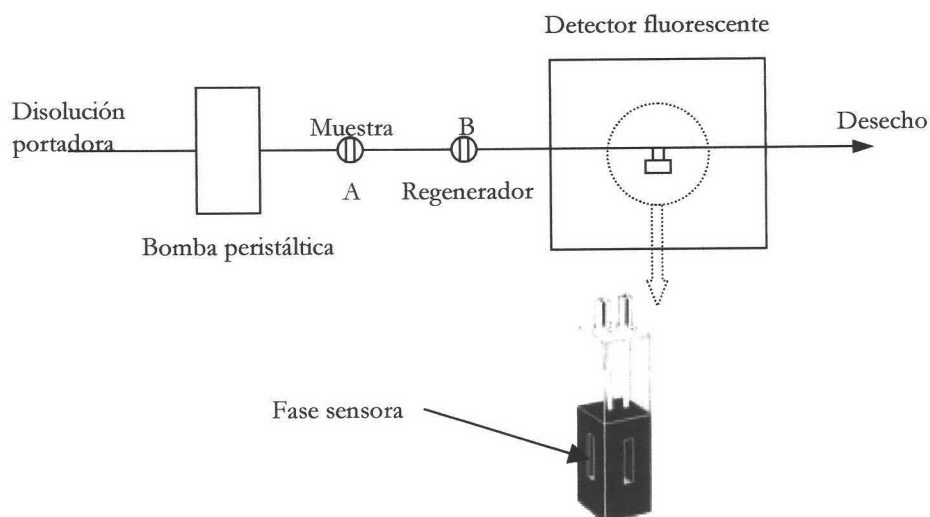


Figura VII-3. Sistema de flujo utilizado.

1.1.3 Elección de la disolución regenerante

La interacción entre cada uno de los cuatro HAPs en estudio y la fase sensora Amberlita XAD 4 es irreversible en las condiciones experimentales y los analitos no se desorben con el portador, por tanto, es necesario el uso de una disolución regenerante que permita reutilizar el optosensor.

Como se ha demostrado en el capítulo V, de todas las disoluciones regenerantes ensayadas (ácidos y bases concentradas y disolventes orgánicos puros miscibles con agua: metanol, etanol, dimetilformamida, acetonitrilo y acetona) el BaP retenido sobre Amberlita XAD 4 sólo se regeneraba eficientemente con acetona pura. Por ende, y debido a que la finalidad de este capítulo es la resolución conjunta de 4 HAPs, sólo se comprobó si se podía usar acetona pura para la efectiva regeneración de los tres analitos restantes. La Figura VII-4 muestra el fiagrama obtenido en esta experiencia, observándose que la regeneración es efectiva y repetitiva. Por lo que se eligió acetona pura como disolución regenerante.

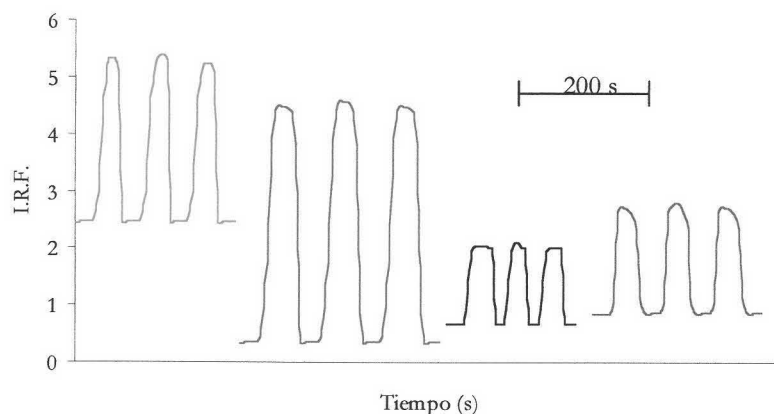


Figura VII-4. Estudio para la regeneración de ANT, BaP, FLT y BbF con acetona pura.

Regenerador: Acetona pura

1.1.4 Selección de la longitud de onda del antraceno, fluoranteno, benzo(b)fluoranteno y benzo(a)pireno en fase sólida para su determinación individual

Para poder llevar a cabo una buena optimización de cada uno de los parámetros que afectan a la diferencia señal-ruido del optosensor en estudio, para cada uno de los analitos seleccionados, se procedió a obtener las longitudes de onda de máxima excitación y emisión fluorescente cuando los analitos estaban retenidos en la fase sensora seleccionada.

Para ello, una suspensión de la resina elegida en una disolución de 100 ng/mL de cada uno de los HAPs en estudio fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se registraron los espectros de emisión y excitación, obteniéndose las características espectroscópicas de los cuatros HAPs soportados en la fase sensora. Posteriormente, una suspensión de la resina seleccionada a pH 7 fue empaquetada en una cubeta de flujo convencional y se volvieron a registrar los espectros de excitación y emisión fluorescente a las longitudes de onda de cada HAP en estudio, obteniéndose las características espectroscópicas de la resina a los máximos de excitación y emisión de cada analito. La diferencia entre ambas señales constituye los espectros de excitación y emisión de los analitos soportados en la fase sensora (véase Figura VII-5).

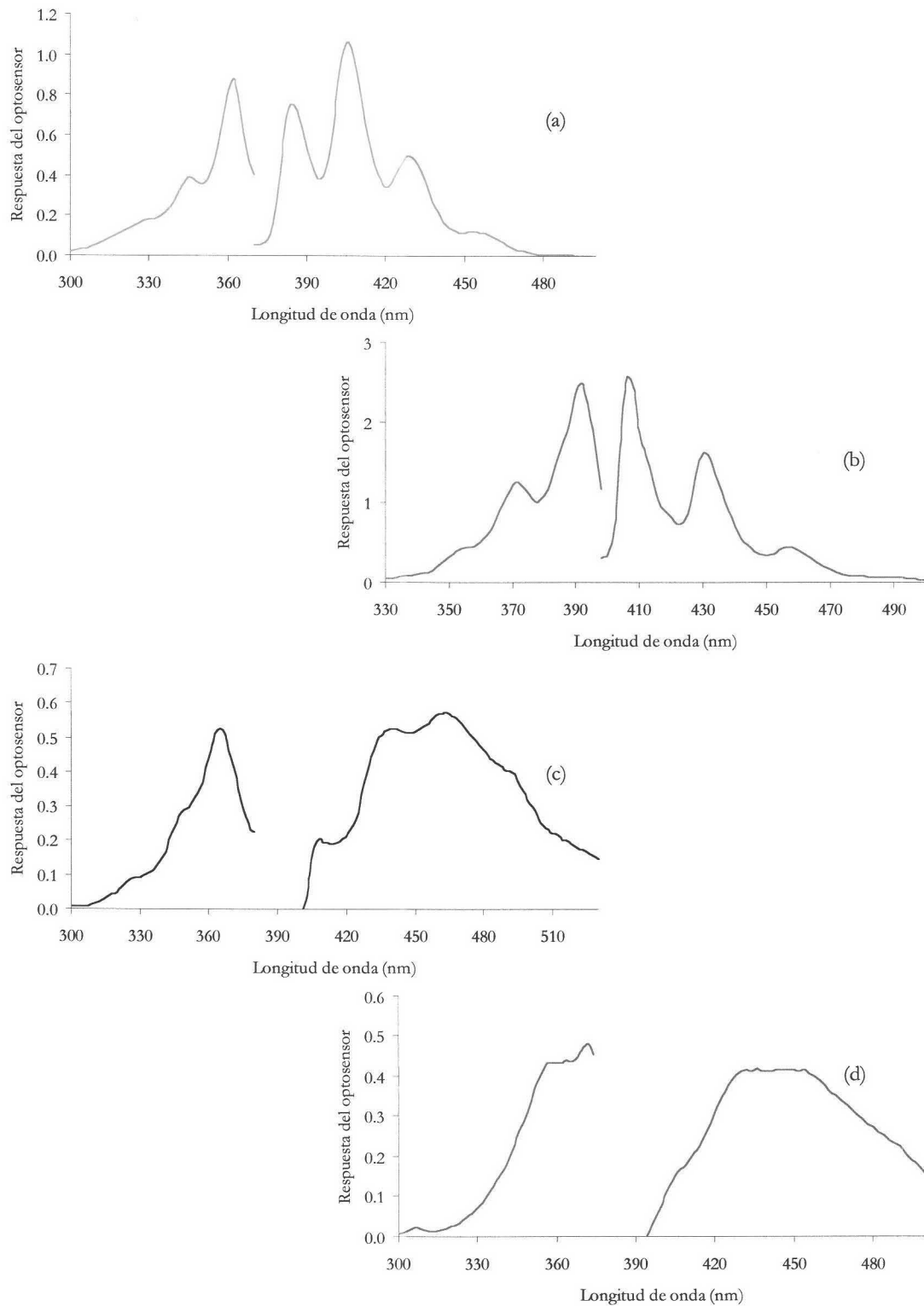


Figura VII-5. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del a) ANT, b) BaP, c) FLT y d) BbF soportados en Amberlita XAD 4 y esta fase sensora a los máximos de cada analito.

En la Tabla VII-1 se muestran las longitudes de onda máximas de excitación y emisión fluorescente en disolución y en fase sólida de cada uno de los analitos seleccionados.

Tabla VII-1. Características espectroscópicas en disolución y fase sólida

	$\lambda_{exc/em}$ (nm) en disolución	$\lambda_{exc/em}$ (nm) en fase sólida
ANT	358/402	362/406
BaP	386/406	392/406
FLT	358/460	372/446
BbF	358/446	366/462

1.1.5 Tipo y porcentaje de disolvente orgánico

Es necesaria la adición de un tanto por ciento de disolvente orgánico en las muestras y en el portador para así disminuir la constante dieléctrica del medio y favorecer la solubilidad de los HAPs estudiados. De esta forma se evitan, además, retenciones en las paredes de los recipientes y tuberías del sistema FIA.

En primer lugar, se estudió el efecto de la presencia de diferentes porcentajes de disolventes orgánicos miscibles con agua (metanol, etanol, dimetilformamida, acetonitrilo, 1,4-dioxano y acetona) en las muestras. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones de muestras de 100 ng/mL de ANT, BaP, FLT y BbF con un porcentaje de cada uno de los disolventes orgánicos evaluados comprendidos entre 0 y 60. Como portador se usó agua bidestilada a pH 7. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VII-6. Los errores no se recogen en dicha gráfica por no complicarla, si bien fueron del mismo orden en todos los casos.

Como solución de compromiso se seleccionó 1,4-dioxano, debido a que es necesario un menor porcentaje para solubilizar los analitos y a que permite obtener en todos los casos, a excepción del BaP, una diferencia señal-ruido similar para los cuatro HAPs. Como porcentaje óptimo se seleccionó un 25%, el menor porcentaje posible ya que sólo a partir de un 20% la diferencia señal-ruido está estabilizada.

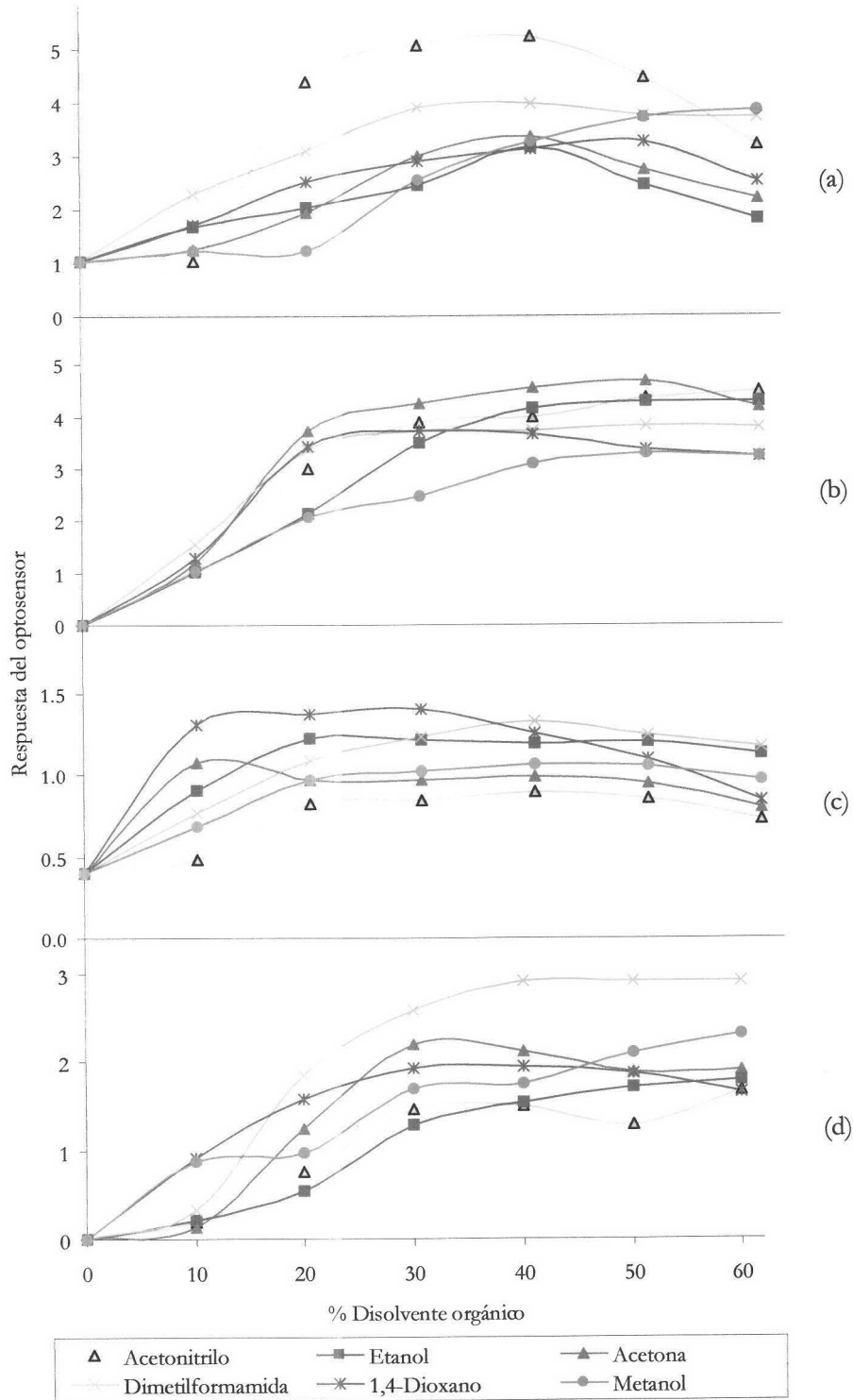


Figura VII-6. Influencia del porcentaje de disolvente orgánico en las muestras sobre ANT (a), BaP (b), FLT (c) y BbF (d).

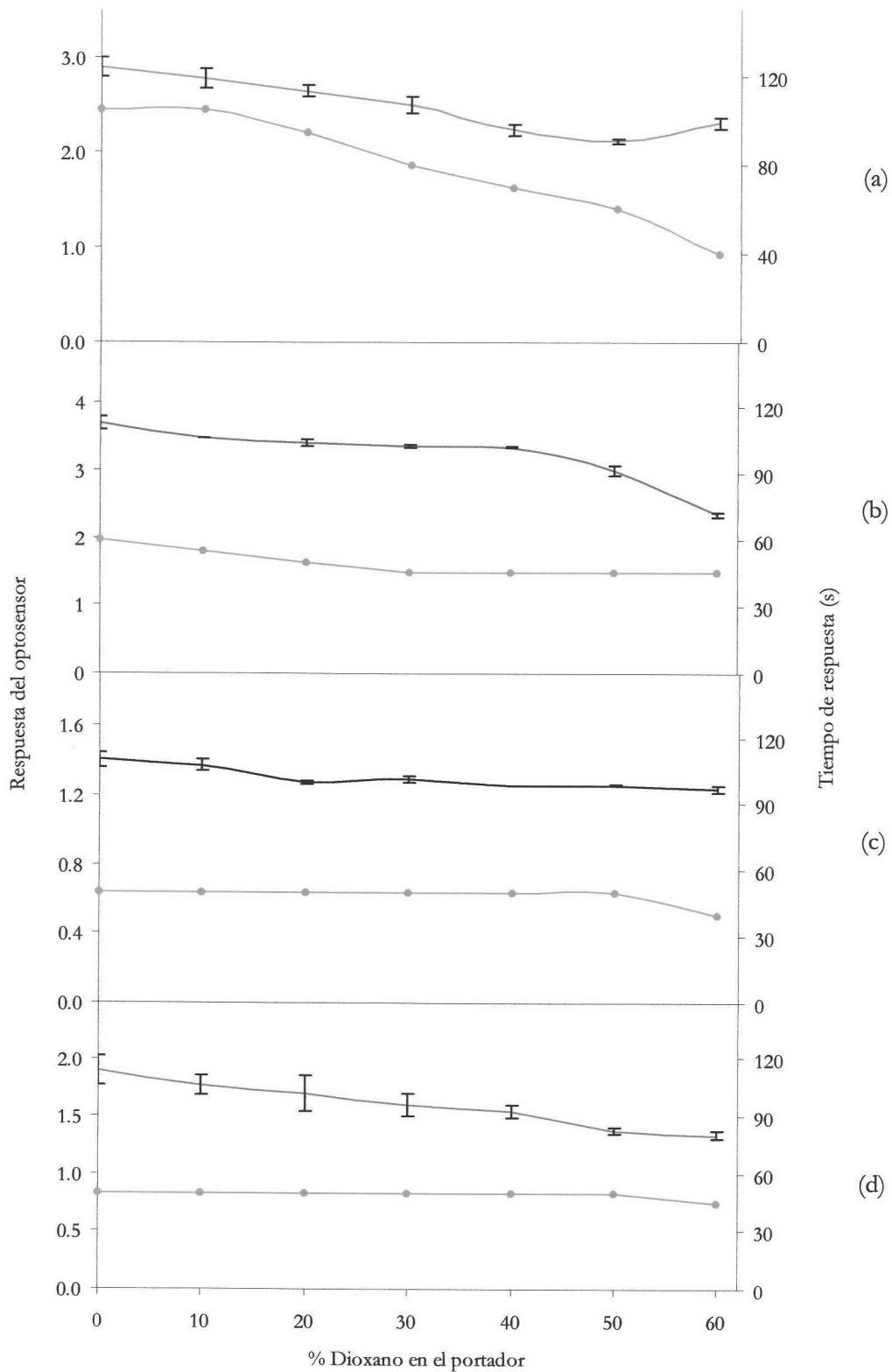


Figura VII-7. Influencia del porcentaje de 1-4,dioxano en el portador sobre la diferencia señal-ruido y el tiempo de respuesta del optosensor para ANT (a), BaP (b), FLT (c), BbF (d). ● Tiempo de respuesta.

Disolvente orgánico en las muestras: 25% 1,4-dioxano

En segundo lugar, se estudió el efecto de la presencia de diferentes porcentajes de 1,4-dioxano en el portador.

Para llevar a cabo este estudio se prepararon una serie de disoluciones de 100 ng/mL de ANT, BaP, FLT y BbF al 25% en 1,4-dioxano y diferentes disoluciones de portador con un porcentaje de 1-4-dioxano comprendidos entre 0 y 60%. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura VII-7.

Como se observa en esta figura, la adición del disolvente orgánico en el portador no mejora la diferencia señal-ruido e incluso en todos los casos la disminuye. Además la inclusión de un disolvente orgánico en el portador deteriora los tubos de bombas y hace necesario el uso de una tubería especial para disolventes orgánicos. Por tanto se decidió no incluir el disolvente en el portador.

Indicar que se observó una disminución del tiempo de respuesta del optosensor y una disminución del error cuando se aumentaba el porcentaje de disolvente orgánico en el portador, aunque estos factores fueron considerablemente mejorados en los siguientes apartados, principalmente cuando se optimizan las variables FIA.

Disolvente orgánico en el portador: ninguno

1.1.6 Efecto del pH

En este caso, el pH afecta únicamente a la interacción de los analitos con la fase sensora. Para llevar a cabo este estudio, se prepararon una serie de disoluciones portadoras (agua bidestilada) y de muestras (100 ng/mL de cada uno de los HAPs en estudio con un 25% de 1,4-dioxano) con pHs comprendidos entre 2.0 y 13.0 ajustados con HCl o NaOH. Se realizaron 3 réplicas para cada experiencia y los resultados obtenidos se muestran en la Figura VII-8.

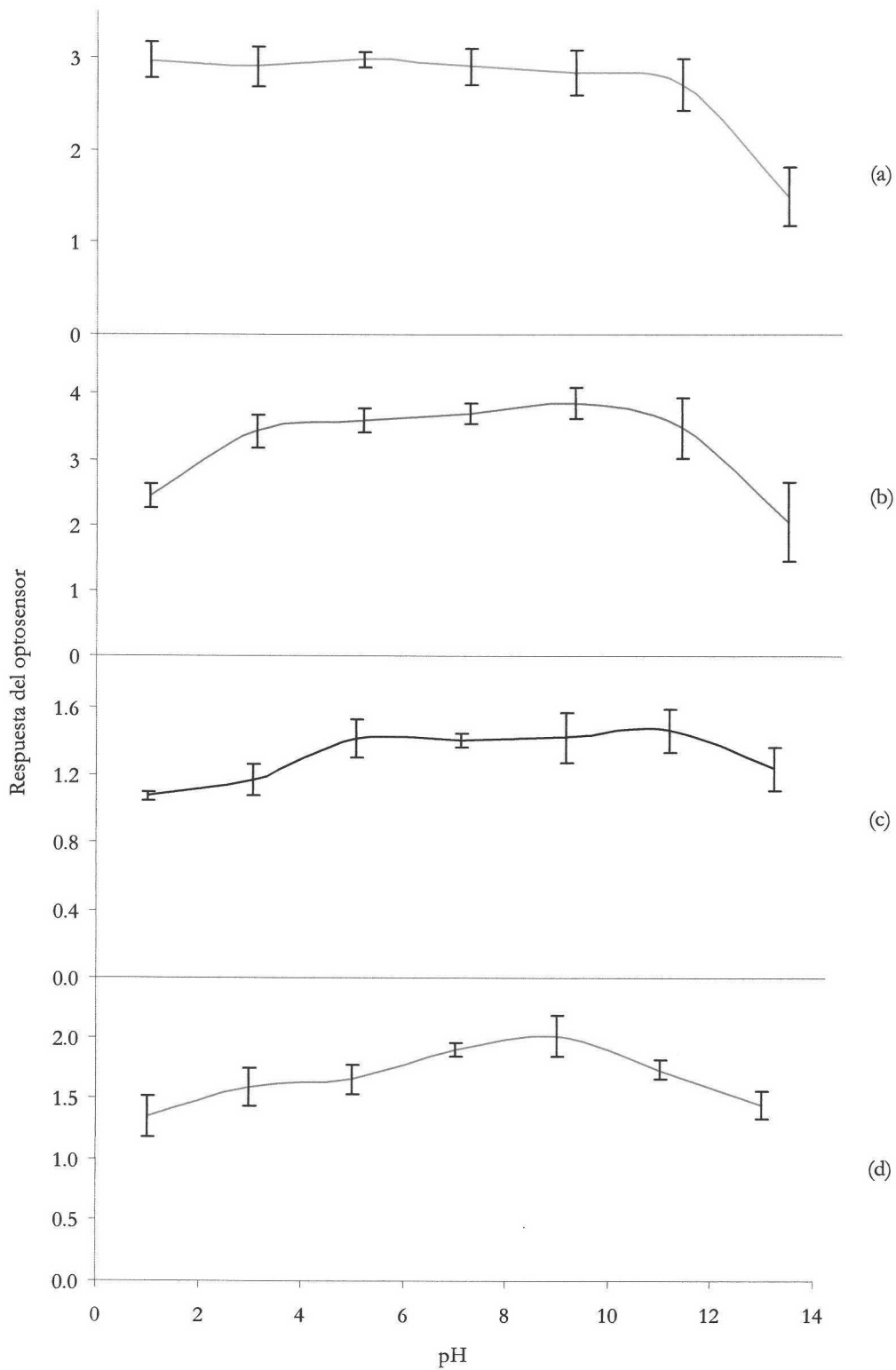


Figura VII-8. Influencia del pH sobre la respuesta del optosensor para ANT (a), BaP (b), FLT (c) y BbF (d). [Analito]=100 ng/mL. $\lambda_{exc/em}$ (ver Tabla VI-1). Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 0.5 mL.

Se observa en dicha figura que la mejor diferencia señal-ruido para todos los analitos se obtiene en el intervalo de pHs comprendido entre 5.5 y 9.5, pHs inferiores a 5.5 o superiores a 9.5 provocan una disminución de la respuesta del optosensor, seleccionando 7 como pH de trabajo.

pH: 7.0

1.1.7 Tipo y concentración de disolución reguladora

Es necesario elegir una disolución reguladora que fije tanto el pH como la fuerza iónica del medio. Por ello, se estudió el efecto que producían sobre la diferencia señal-ruido el uso de las disoluciones reguladoras habituales disponibles que actuaran adecuadamente al pH de trabajo. Las disoluciones ensayadas fueron: Ácido cítrico/ HPO_4^{2-} y $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$.

Para llevar a cabo este estudio, se prepararon disoluciones portadoras y muestras de 100 ng/mL de cada HAP con un 25% de 1,4-dioxano a pH 7 a una concentración de 5 mM de cada una de las disoluciones reguladoras estudiadas y se inyectaron en el sistema de flujo para registrar la variación de la señal y el ruido. Se observó que las muestras a las que se adicionó la disolución reguladora ácido cítrico/ HPO_4^{2-} producían un apelmazamiento de la fase sensora que impedía que el flujo líquido la atravesase, por lo que se eligió como disolución reguladora la disolución $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ y se procedió al estudio de la concentración óptima de la misma.

Disolución reguladora: $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$

Diferentes concentraciones de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ fueron ensayadas, registrando tres réplicas para cada una de las concentraciones estudiadas y cada uno de los analitos seleccionados. Los resultados alcanzados se muestran en la Figura VII-9.

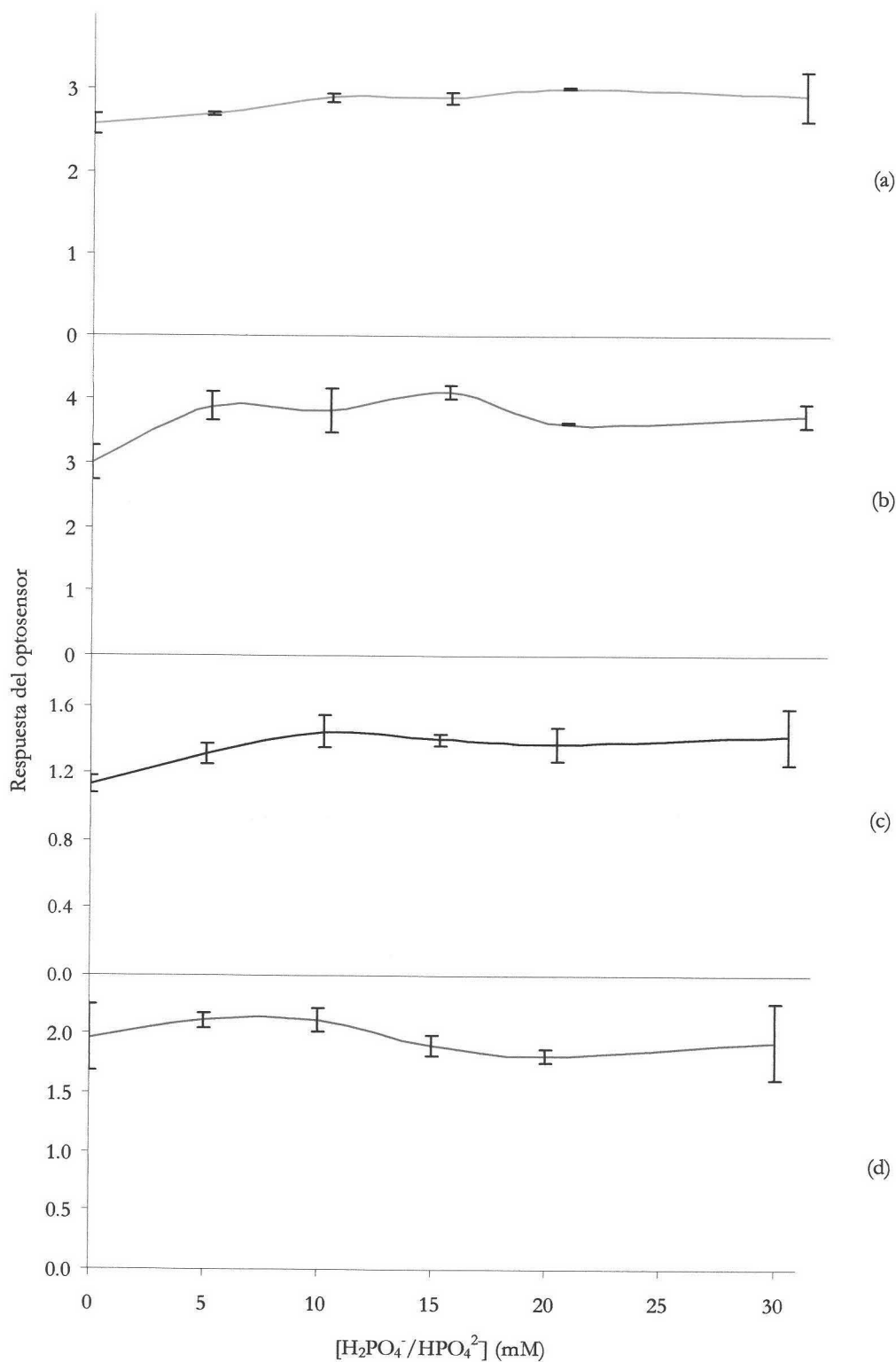


Figura VII-9. Influencia de la concentración de disolución reguladora sobre la respuesta del optosensor para ANT (a), BaP (b), FLT (c) y BbF (d). $[Analito]=100$. $\lambda_{exc/em}$ (ver Tabla VI-1). Velocidad de flujo 2.0 mL/min, volumen de muestra inyectado 0.5 mL.

Como se puede observar en la Figura VII-9 la adición de una mínima cantidad de disolución reguladora provoca un aumento en la diferencia señal-ruido en todos los casos. Si se sigue aumentando la concentración esta diferencia permanece prácticamente constante, para los cuatro analitos, disminuyéndose considerablemente el error del optosensor propuesto. Ahora bien, si la concentración sobrepasa de 25 mM se produce una gran irrepetibilidad de las medidas dando lugar a un aumento del error. Por tanto, se eligió una concentración 15 mM como concentración de disolución reguladora para que fije el pH y la fuerza iónica tanto del portador como de las muestras.



1.1.8 Efecto de la velocidad de flujo

Para que tenga lugar la emisión fluorescente de los HAPs en fase sólida es necesario que los analitos que pasan a través de la resina queden retenidos durante un tiempo. Este proceso, al ser de naturaleza cinética, determina que la velocidad a la que pasa el portador y con él los analitos tenga una enorme importancia en la respuesta final del optosensor.

Además la velocidad de flujo también influye sobre el tiempo de respuesta del mismo. Así, un aumento de la velocidad de flujo provoca una disminución del tiempo de respuesta del optosensor, por lo que es necesario tener en cuenta estos dos aspectos para seleccionar el flujo más adecuado en función de las características que se le quieran confiar al optosensor.

Para evaluar dicha influencia, en las condiciones óptimas anteriormente fijadas, se varió la velocidad de flujo del portador, realizando sucesivas inyecciones de cada una de las disoluciones de 100 ng/mL de los analitos en estudio y registrando la diferencia señal-ruido y el tiempo de respuesta para cada flujo. Los resultados obtenidos se pueden visualizar en la Figura VII-10.

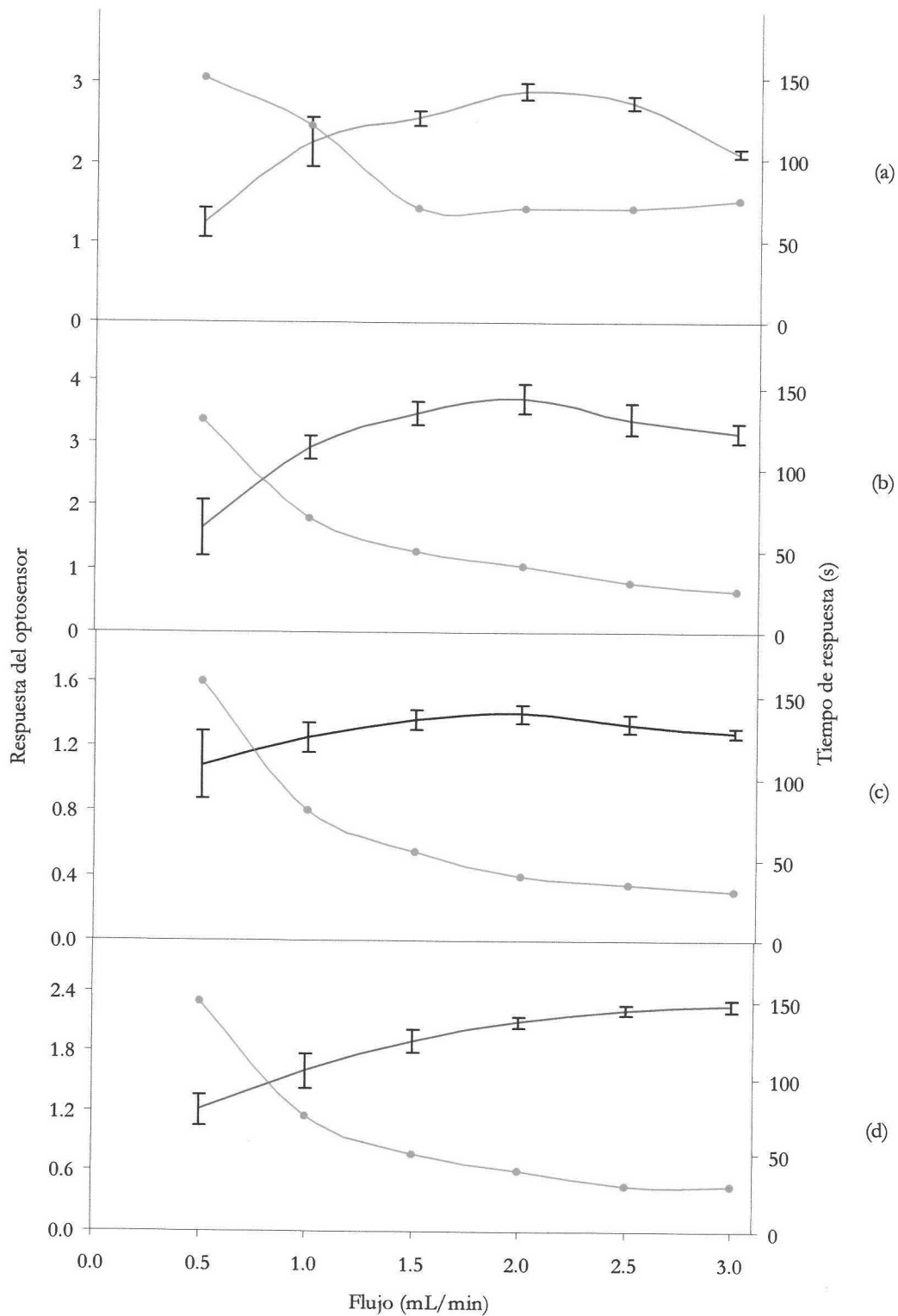


Figura VII-10. Influencia de la velocidad de flujo sobre la diferencia señal-ruído y el tiempo de respuesta del optosensor para ANT (a), BaP (b), FLT (c) y BbF (d), ● tiempo de respuesta.

Como se observa en dicha figura un aumento del flujo provoca un aumento de la diferencia señal-ruido hasta que, a una velocidad de flujo determinada, la respuesta del optosensor prácticamente permanece invariable. Esto se debe a que la velocidad del flujo afecta a la interacción-retención que se produce entre los analitos y la fase sensora. Además, un aumento de la velocidad de flujo provoca una disminución drástica del tiempo de respuesta del optosensor. Para hacer que el tiempo de respuesta del optosensor sea lo menor posible y que se trabajara con la mayor diferencia señal-ruido se eligió una velocidad de flujo de 2.0 mL/min.

Velocidad de flujo: 2.0 mL/min

1.1.9 Influencia del volumen de inyección de muestra

El volumen de inyección de muestra afecta tanto a la diferencia señal-ruido como al tiempo de respuesta del optosensor.

Además hay que comentar que es un parámetro muy importante a tener en cuenta en la determinación de trazas, pues un aumento del volumen de inyección de muestra hace que se pueda disminuir el límite de detección del método propuesto ya que las fases sensoras actúan como zona de reconocimiento y como fase de preconcentración de los analitos.

Para establecer dicha influencia, en las condiciones óptimas establecidas, se varió el volumen del bucle de la válvula de inyección del analito (válvula A) y se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 100 ng/mL de cada uno de los HAPs en estudio, registrándose la diferencia señal-ruido y el tiempo de respuesta para cada bucle.

Bucles superiores a 1 mL saturan la respuesta del detector para ANT y BaP a las concentraciones ensayadas. Por tanto, se seleccionó un volumen de inyección de 0.5 mL para que en el estudio de mezclas no se sature el detector.

Hacer notar que este volumen de inyección se puede aumentar en el momento en el que se trabaje con disoluciones más diluidas y así se conseguirá disminuir el límite de detección del optosensor.

Volumen de inyección de muestra: 0.5 mL

1.2 Establecimiento de las condiciones óptimas para la determinación conjunta de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno

1.2.1 Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión

Para poder desarrollar un sensor capaz de detectar y/o cuantificar los cuatro HAPs en estudio de forma simultánea, es necesario llevar a cabo una buena selección de las longitudes de onda de excitación y emisión.

Para ello, una suspensión en una disolución de 100 ng/mL de cada uno de los HAPs en estudio de la resina elegida se empaquetó en la cubeta de flujo convencional, la cual, a su vez, fue colocada en el paso óptico del espectrofluorímetro y se registraron los espectros tridimensionales. Posteriormente se eluyeron los HAPs y se volvieron a registrar los espectros tridimensionales de la fase sensora. Mediante una substracción se procedió a la eliminación de la contribución de la fase sensora en los espectros obtenidos cuando cada uno de los HAPs estaba fijado en la fase sensora. El resultado obtenido se muestra en la Figura VII-11. Para que se pudieran observar todos los HAPs con una cierta nitidez, y teniendo en cuenta que el BaP en fase sólida emite una intensidad de fluorescencia muy elevada con respecto a la de los demás analitos en estudio, los espectros tridimensionales del ANT, FLT y BbF se registraron fijando un voltaje del detector de 600 V y de 500 V para el BaP.

Como se puede observar en esta figura, existen dos regiones espectral donde se puede determinar de forma independiente el ANT (zona 1) y BaP (zona 4). Además hay dos zonas en la que se pueden determinar ANT, BAP y BbF de forma conjunta (zona 2) y FLT y BbF de forma conjunta (zona 3).

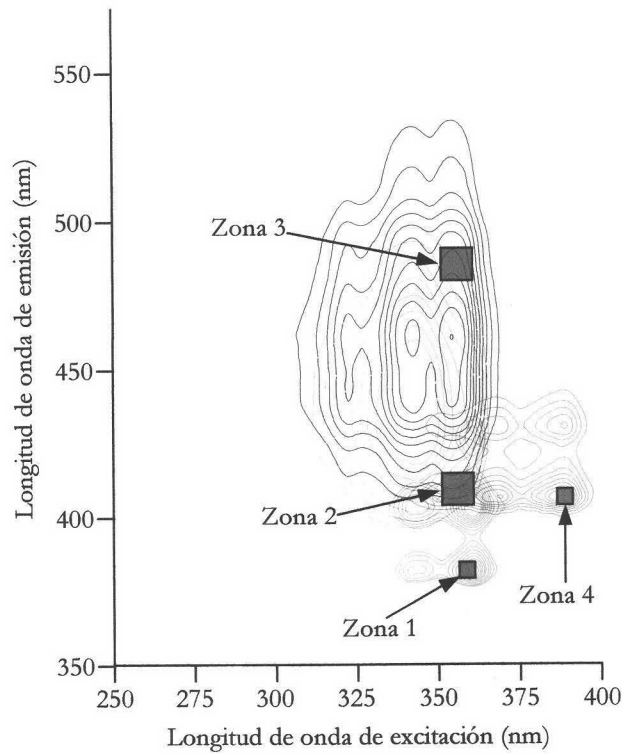


Figura VII-11. Curvas de nivel de los espectros tridimensionales de fluorescencia soportados en Amberlita XAD 4 de — ANT ($[ANT]=100 \mu\text{g/L}$, 600 V), — BaP, ($[BaP]=100 \mu\text{g/L}$, 500 V), — FLT ($[FLT]=100 \mu\text{g/L}$, 600 V) y — BbF ($[BbF]=100 \mu\text{g/L}$, 600 V).

De esta forma se plantearía un sistema de 4 ecuaciones con cuatro incógnitas y se podrían detectar y cuantificar la cantidad de cada uno de los HAPs en estudio en una muestra contaminada por ellos. Estas ecuaciones serían:

$$\begin{aligned}
 I_1 &= k_1 \cdot [ANT] \\
 I_2 &= k_2 \cdot [ANT] + k_3 \cdot [BaP] + k_4 \cdot [BbF] \\
 I_3 &= k_5 \cdot [FLT] + k_6 \cdot [BbF] \\
 I_4 &= k_7 \cdot [BaP]
 \end{aligned}$$

donde I_1 , I_2 , I_3 e I_4 sería la respuesta del optosensor registrada en las zonas 1, 2, 3 y 4, respectivamente; k_1 sería la pendiente de la recta de calibrado del ANT en la zona 1; k_2 , k_3 y k_4 sería la contribución del ANT, BaP y BbF, respectivamente, a la pendiente de la recta de calibrado conjunta de los tres analitos en la zona 2; k_5 y k_6 sería la contribución del FLT y BbF, respectivamente, a la pendiente de la recta de calibrado conjunta de los dos analitos en la zona 3; y k_7 sería la pendiente de la recta de calibrado del BaP en la zona 4.

Como se deduce de estas ecuaciones son demasiadas incógnitas, por lo que es aconsejable simplificar estas expresiones. Para ello, se debería establecer un par de longitudes de onda en las zonas espectrales donde emiten más de un analito, consiguiendo que todos ellos emitan con la misma intensidad (isoemisivos) y así contribuyan en el mismo orden de magnitud a la respuesta del optosensor. Si esto se consigue, se podría decir que $k_2=k_3=k_4$ y que $k_5=k_6$, quedando las expresiones:

$$\begin{aligned} I_1 &= k_1 \cdot [ANT] \\ I_2 &= k_8 \cdot ([ANT] + [BaP] + [BbF]) \\ I_3 &= k_9 \cdot ([FLT] + [BbF]) \\ I_4 &= k_7 \cdot [BaP] \end{aligned}$$

donde k_8 sería la pendiente de la recta de calibrado de ANT+BaP+BbF y k_9 sería la pendiente de la recta de calibrado de FLT+BbF.

Así los factores k_1 y k_7 se establecen registrando la variación de la respuesta del optosensor con la concentración de ANT o BaP a unos pares de longitudes de onda en los que emita sólo el analito deseado. Y los factores k_8 y k_9 se establecen registrando la variación de la respuesta del optosensor con la suma de las concentraciones de ANT, BaP y BbF o FLT y BbF, respectivamente, a unos pares de longitudes de onda en los que sean isoemisivos.

Además de tener en cuenta estas consideraciones, hay que tener en cuenta que se quiere llevar a cabo una determinación simultánea y por tanto, será necesario establecer el menor número posible de longitudes de onda de excitación para así registrando pocos espectros de emisión obtener todos los pares de longitudes de onda necesario y en pocas medidas obtener la determinación de los cuatro HAPs.

Para ello, se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 100 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano de cada uno de los HAPs en estudio, registrándose los espectros de emisión de 350 a 600 nm a diferentes λ_{exc} (340, 345, 350, 355 y 390 nm) (véase Figura VII-12).

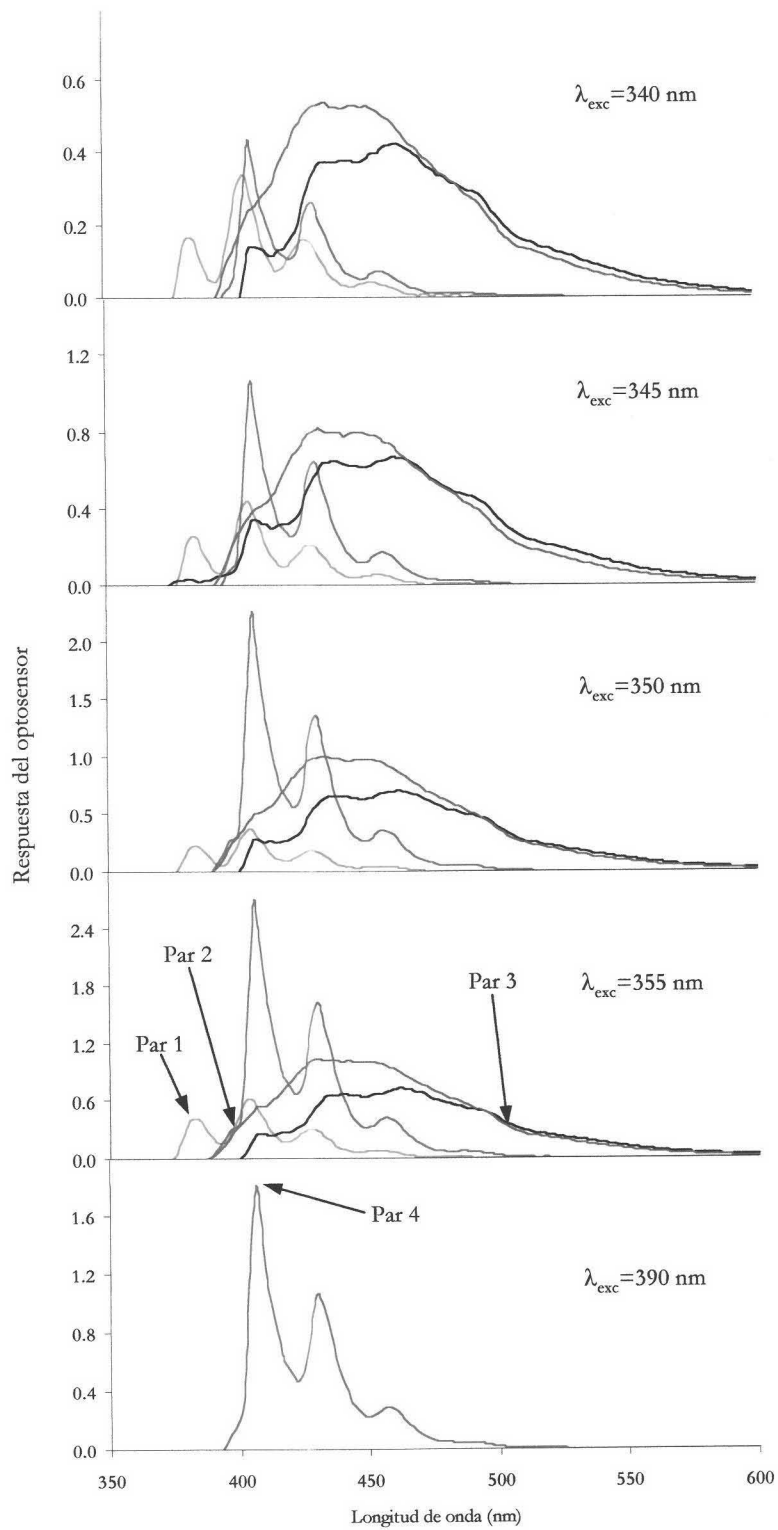


Figura VII-12. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del ANT, BaP, FLT y BbF soportados en Amberlita XAD 4 y ésta fase sensora diferentes longitudes de onda de excitación.

Como se puede observar, cuando se usa una $\lambda_{exc}=355\text{nm}$ tenemos un par de longitudes de onda (par 1, 355/382 nm) donde emite únicamente el antraceno, un par de longitudes de onda (par 2, 355/397 nm) donde son isoemisivos el ANT, BaP y BbF y un par 3, donde son isoemisivos FLT y BbF. Y cuando se excita a 390 nm, obtenemos un par de longitudes de onda (par 4, 390/406 nm) donde emite exclusivamente el BaP.

Por tanto en el par 1 se puede calcular k_1 , en el par 2 k_2 , en el par 3 k_3 y en el par 4 k_4 . De forma, que una vez conocidos estos factores, registrando la respuesta del optosensor en cada par de longitudes de onda y resolviendo el sistema de ecuaciones se puede conocer la concentración de los 4 HAPs.

Una vez seleccionadas los pares de $\lambda_{exc/em}$ se procedió a comprobar los requisitos anteriormente mencionados (en el par 1 y par 4 deben emitir sólo el ANT y el BaP, respectivamente, en el par 2 tienen que emitir con la misma intensidad ANT, BaP y BbF y no emitir el FLT y en el par 3 deben emitir con la misma intensidad FLT y BbF y no emitir el resto). Para ello, se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 100 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano de cada uno de los HAPs en estudio, registrándose la señal independiente de cada uno de ellos a los cuatro valores de las parejas de $\lambda_{exc/em}$ seleccionadas (véase Figura VII-13).

Como se puede observar en esta figura en el par 1 ($\lambda_{exc/em}=355/382\text{ nm}$) se puede cuantificar ANT sin la influencia de los otros tres analitos, en el par 2 ($\lambda_{exc/em}=355/397\text{ nm}$) se puede cuantificar ANT+BaP+BbF sin la influencia del FLT y además los tres emiten con similar intensidad, en el par 3 ($\lambda_{exc/em}=355/540\text{ nm}$) se puede cuantificar FLT+BbF sin la influencia de los otros dos analitos y ambos emiten intensidades similares y en el par 4 ($\lambda_{exc/em}=390/406\text{ nm}$) se puede cuantificar el BaP sin ninguna interferencia.

Además se cumple otro de los requisitos comentados y es que se trabaja con pocas longitudes de onda de excitación (355 y 390 nm) lo que facilita la simultaneidad de las medidas al trabajar sólo con dos espectros de emisión.

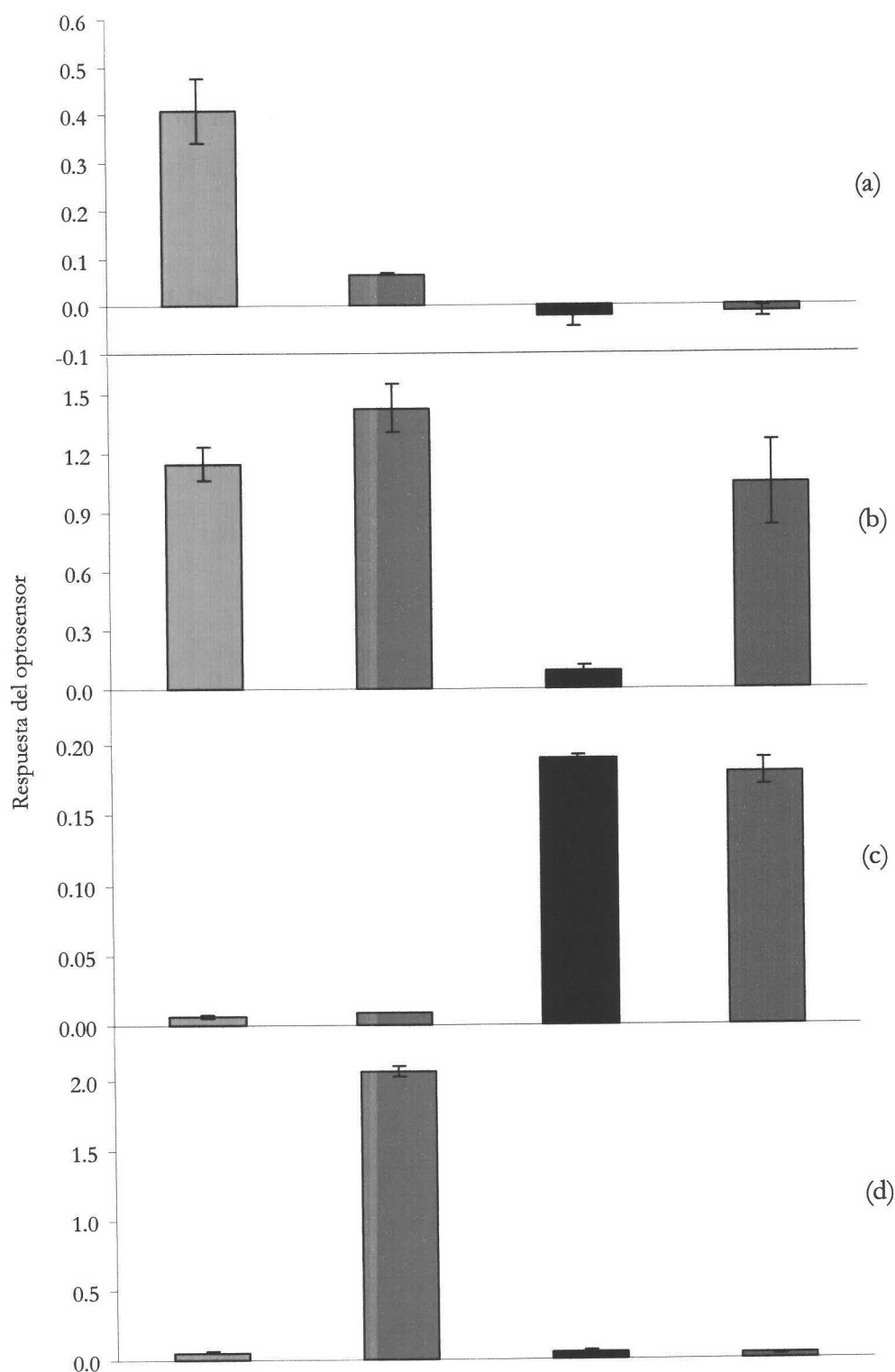


Figura VII-13. Diferencia señal-ruido obtenida por el optosensor propuesto a las $\lambda_{exc/em}$ a) 355/382 nm, b) 355/397 nm, c) 355/540 nm y d) 390/406 nm (■ ANT, ■ BaP, ■ FLT y ■ BbF).

1.2.2 Estudio de la aditividad de las señales

Para poder establecer una recta de calibrado usando los pares de longitudes de onda 2 y 3, en los que se evalúa una mezcla de analitos, es necesario comprobar previamente que las señales son aditivas, para así, poder establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de la mezcla.

Por tanto, para comprobar la aditividad de las señales en el par 2 se hicieron sucesivas inyecciones de disoluciones de ANT, BaP y BbF de 50 ng/mL y las distintas combinaciones de dos (de concentración total 100 ng/mL) y tres compuestos (de concentración final 150 ng/mL) posibles, registrándose la diferencia señal-ruido a $\lambda_{exc/em}=355/382$ nm (véase Figura VII-14).

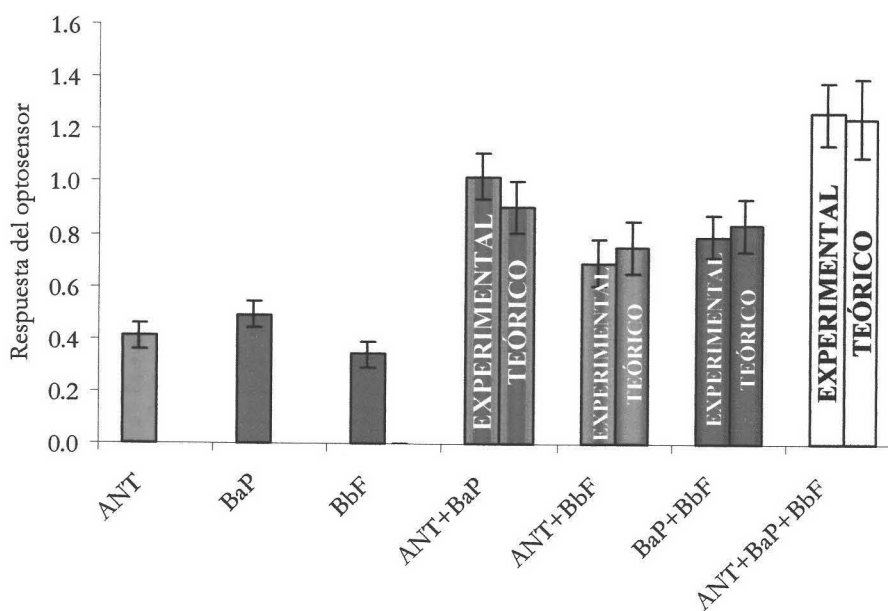


Figura VII-14. Estudio de la aditividad en el par de longitudes de onda 2 ($\lambda_{exc/em}=355/382$ nm) (■ ANT, ■ BaP y ■ BbF).

Para comprobar la aditividad de las señales en el par 3 se hicieron sucesivas inyecciones de disoluciones de FLT y BbF de 50 ng/mL y la combinación binaria posible (de concentración total 100 ng/mL), registrándose la diferencia señal-ruido a $\lambda_{exc/em}=355/540$ nm (véase Figura VII-15).

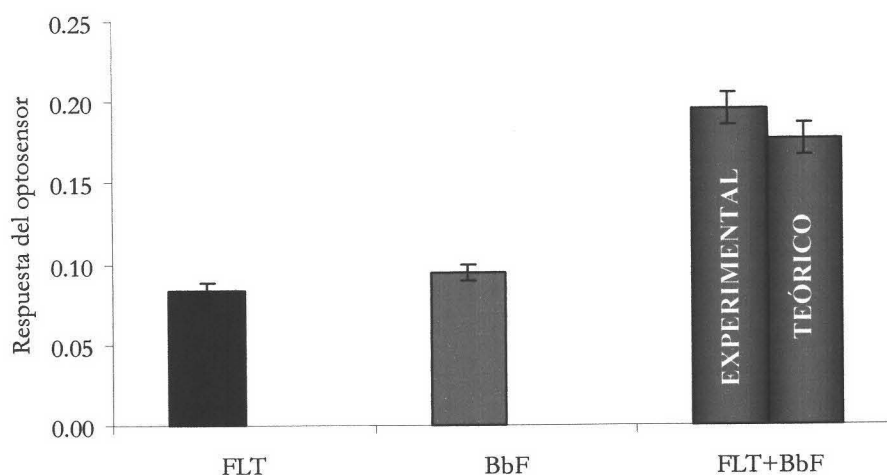


Figura VII-15. Estudio de la aditividad en el par de longitudes de onda 3
($\lambda_{exc/em} = 355/540 \text{ nm}$) (■ FLT y ■ BbF).

Como se puede observar en ambas figuras, tanto las señales del par de longitudes de onda 2 como las del par 3 son aditivas, pues los valores experimentales son prácticamente iguales a los teóricos (obtenidos al sumar las respuestas de optosensor de cada uno de los analitos independientes) por lo que se puede establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de HAPs presentes en la mezcla.

1.3 Características analíticas del método

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas y las condiciones de medida para la determinación conjunta usando el optosensor fluorescente y de transductor un fluorímetro convencional, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado para cada uno de los pares de longitudes de onda previamente seleccionados y los parámetros de fiabilidad de cada una de las curvas, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*¹.

1. L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba. "Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibrations experiment". *Anal. Lett.*, 26 (1993) 1243.

1.3.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se prepararon una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de ANT (para llevar a cabo la curva usando el par de longitudes de onda 1), ANT+BaP+BbF (para llevar a cabo la curva usando el par 2), FLT+BbF (usando el par 3) y BaP (usando el par 4) en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 en una concentración de 15 mM y un 25% de 1,4-dioxano). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2.0 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo: par 1 $\lambda_{\text{exc/em}}=355/382$ nm, par 2 $\lambda_{\text{exc/em}}=355/397$ nm, par 3 $\lambda_{\text{exc/em}}=355/540$ nm y par 4 $\lambda_{\text{exc/em}}=390/406$ nm. Voltaje del detector: para los pares 1 y 2, 600 V, para el par 3, 650 V y para el par 4, 500 V. Rendijas 4/4 nm y resolución 5 s.

1.3.2 Rectas de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para cada uno de los pares de medida seleccionados variando la concentración de los analitos o mezclas de ellos, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tablas VII-2 a VII-5 se muestran los datos obtenidos y en la figuras VII-16 a VII-19 se muestran las influencias de la concentración sobre la señal fluorescente en los diferentes pares de longitudes de onda de medida.

Tabla VII-2. Réplicas obtenidas del calibrado usando el par 1

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	0.695	0.689	0.665
100	1.129	1.186	1.230
150	1.690	1.726	1.732
200	2.431	2.487	2.505
250	3.047	3.016	3.011

Tabla VII-3. Réplicas obtenidas del calibrado usando el par 2

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
60	0.605	0.573	0.600
120	1.024	1.050	1.062
180	1.445	1.494	1.490
240	1.884	1.904	1.898

Tabla VII-4. Réplicas obtenidas del calibrado usando el par 3

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	0.306	0.294	0.293
100	0.507	0.217	0.523
150	0.750	0.774	0.767
200	0.987	0.999	1.002
250	1.225	1.250	1.256

Tabla VII-5. Réplicas obtenidas del calibrado usando el par 4

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	1.734	1.780	1.720
100	3.015	3.046	3.143
150	4.015	4.076	4.066
200	5.112	5.185	5.128
250	6.167	6.155	6.254

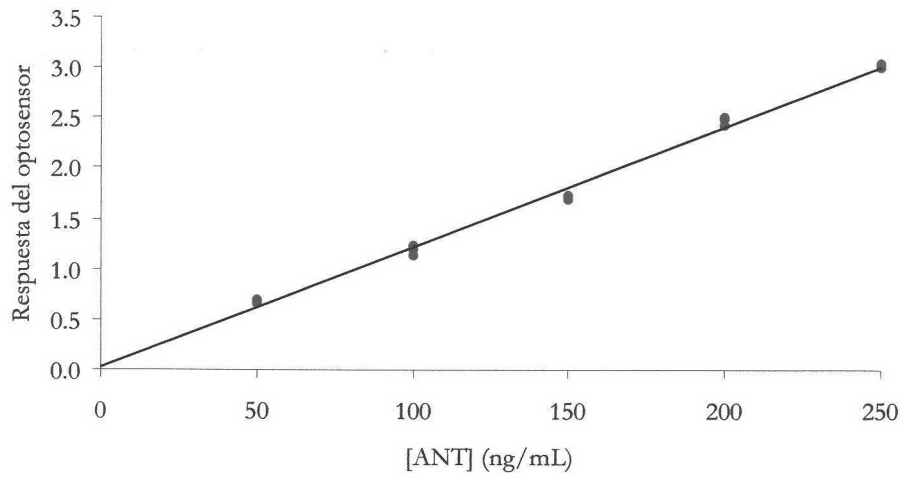


Figura VII-16. Curva de calibrado usando el par 1.

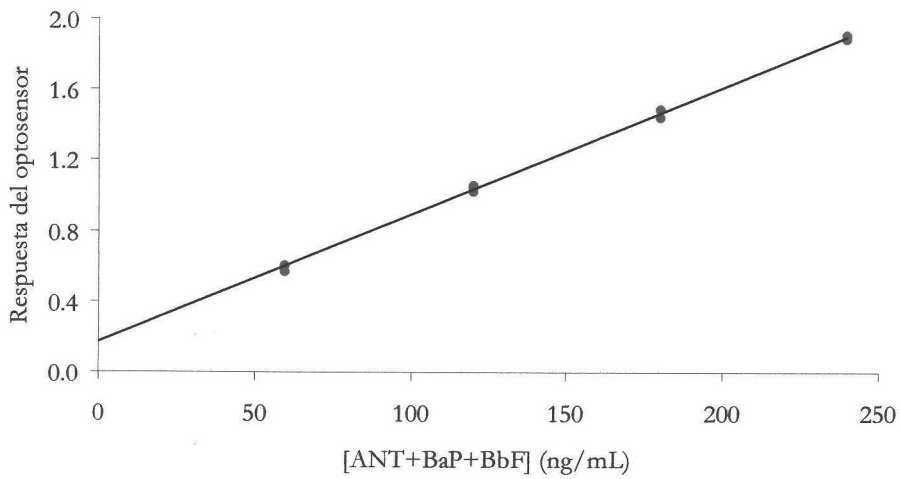


Figura VII-17. Curva de calibrado usando el par 2.

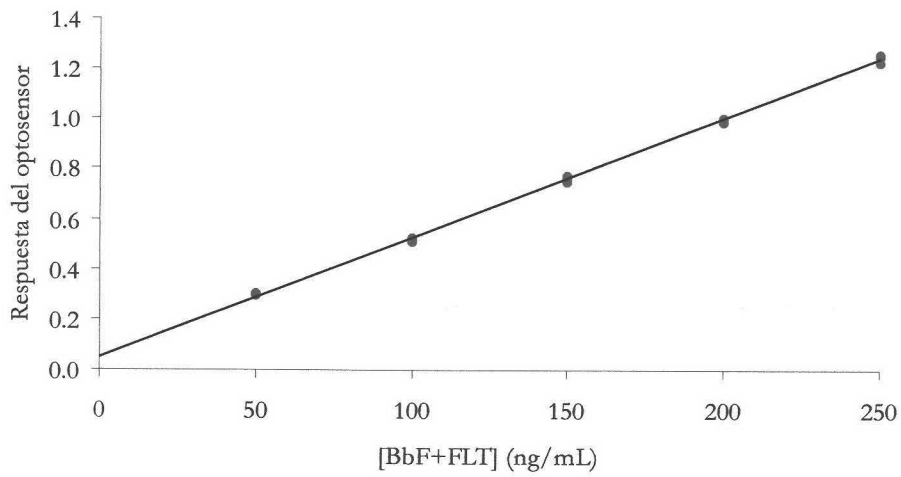


Figura VII-18. Curva de calibrado usando el par 3.

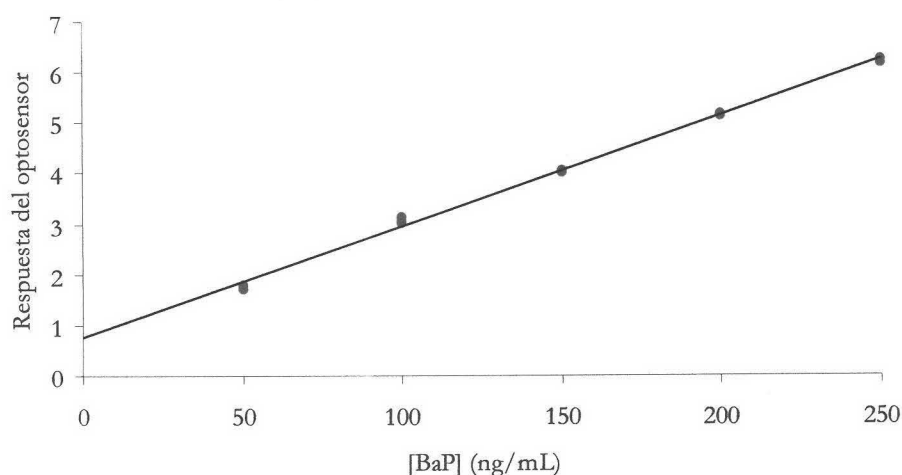


Figura VII-19. Curva de calibrado usando el par 4.

1.3.3. Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ La Tablas VII-6 a VII-9 muestran los resultados obtenidos.

Tabla V-6. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 1

Dato	Valor estimado
s_0	0.0218
Límite de detección (ng/mL)	5.4
Límite de cuantificación (ng/mL)	18.0
Rango dinámico lineal (ng/mL)	5.4-250.0

Tabla V-7. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 2

Dato	Valor estimado
s_0	0.0108
Límite de detección (ng/mL)	2.7
Límite de cuantificación (ng/mL)	9.0
Rango dinámico lineal (ng/mL)	2.7-240.0

Tabla V-8. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 3

Dato	Valor estimado
s_0	0.0046
Límite de detección (ng/mL)	1.2
Límite de cuantificación (ng/mL)	4.0
Rango dinámico lineal (ng/mL)	1.2-250.0

Tabla V-9. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 4

Dato	Valor estimado
s_0	0.0057
Límite de detección (ng/mL)	1.4
Límite de cuantificación (ng/mL)	4.7
Rango dinámico lineal (ng/mL)	1.4-250.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en las Tablas VII-10 a VII-13.

Tabla VII-10. Datos estadísticos para la recta 1

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0231
Desviación estándar (s_a)	0.0437
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	188.9
Pendiente (b)	0.0120
Desviación estándar (s_b)	0.0003
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	2.2
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0721
Coefficiente de correlación (r)	0.9969
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.37

Tabla VII-11. Datos estadísticos para la recta 2

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.1677
Desviación estándar (s_a)	0.0140
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	8.3
Pendiente (b)	0.0072
Desviación estándar (s_b)	0.0001
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	1.2
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0198
Coefficiente de correlación (r)	0.9993
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.86

Tabla VII-12. Datos estadísticos para la recta 3

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.0516
Desviación estándar (s_a)	0.0074
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	14.3
Pendiente (b)	0.0047
Desviación estándar (s_b)	0.0000
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	0.9
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0122
Coefficiente de correlación (r)	0.9994
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.89

Tabla VII-13. Datos estadísticos para la recta 4

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	0.7492
Desviación estándar (s_a)	0.0545
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	7.3
Pendiente (b)	0.0219
Desviación estándar (s_b)	0.0003
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	1.5
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	0.0900
Coefficiente de correlación (r)	0.9985
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.71

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de la recta de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en las Tablas VII-14 a VII-17.

Tabla VII-14. Desviaciones estándar de los datos de la recta 1

Concentraciones (ng/mL)	s
50	4.4
100	4.0
150	3.8
200	4.0
250	4.4

Tabla VII-15. Desviaciones estándar de los datos de la recta 2

Concentraciones (ng/mL)	s
60	2.06
120	1.80
180	1.80
240	2.05

Tabla VII-16. Desviaciones estándar de los datos de la recta 3

Concentraciones (ng/mL)	s
50	1.9
100	1.7
150	1.6
200	1.7
250	1.9

Tabla VII-17. Desviaciones estándar de los datos de la recta 4

Concentraciones (ng/mL)	s
50	3.0
100	2.7
150	2.6
200	2.7
250	3.0

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en las Tablas VII-18 a VII-21.

Tabla VII-18. Parámetros de fiabilidad para la curva 1

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	97.8	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	6.0	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	17.5	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	58.2	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	17.5-250	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	7.9
	100 ng/mL	4.1
	150 ng/mL	2.7
	200 ng/mL	2.0
	250 ng/mL	1.8

Tabla VII-19. Parámetros de fiabilidad para la curva 2

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	98.8	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	2.7	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	7.8	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	26.1	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	7.8-240.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	60 ng/mL	3.5
	120 ng/mL	1.5
	180 ng/mL	1.0
	240 ng/mL	0.9

Tabla VII-20. Parámetros de fiabilidad para la curva 3

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	99.1	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	2.6	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	7.4	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	24.6	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	7.4-250.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	3.6
	100 ng/mL	1.7
	150 ng/mL	1.1
	200 ng/mL	0.9
	250 ng/mL	0.8

Tabla VII-21. Parámetros de fiabilidad para la curva 4

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	98.5	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	4.1	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	11.9	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	39.5	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	11.9-250.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	6.7
	100 ng/mL	2.5
	150 ng/mL	1.7
	200 ng/mL	1.4
	250 ng/mL	1.2

1.4 Aplicaciones del optosensor de screening de ANT, BaP, FLT y BbF

1.4.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para distintas mezclas aleatorias de los cuatro HAPs en estudio, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua subterránea de un manantial) se enriquecieron a distintos niveles de concentración de los analitos en estudio (véase Tablas VII-22 y VII-23). Se tomó la cantidad adecuada de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 para que tuviese una concentración 15 mM y la cantidad adecuada de 1,4-dioxano para que estuviese presente en un 25% y se enrasó con la muestra de agua a analizar.

Se realizaron 3 réplicas para cada una de las muestra analizadas, a cada nivel de concentración, llevando a cabo el registro de la intensidad de fluorescencia a las condiciones instrumentales óptimas de cada uno de los pares de medida seleccionados

anteriormente: par 1, $\lambda_{exc/em}=355/382$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; par 2, $\lambda_{exc/em}=355/397$ nm, voltaje del detector 600 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; par 3, $\lambda_{exc/em}=355/540$ nm, voltaje del detector 650 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; par 4, $\lambda_{exc/em}=390/406$ nm, voltaje del detector 500 V, rendijas 4/4 nm y resolución 5 s; con una velocidad de flujo de 2.0 mL/min e inyectando 0.5 mL de muestra. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas VII-22 y VII-23.

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto que usa como transductor un fluorímetro convencional puede usarse de forma simple, selectiva y sensible para la resolución de mezclas de ANT, BaP, FLT y BbF en muestras de agua.

Tabla VII-22. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua superficial de consumo humano

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
A11	-	100	-	-	1.7	98.7	-0.2	-0.2	-	98.7	-	-
A12	-	100	-	-	1.2	100.7	4.1	-1.02	-	100.7	-	-
A13	-	100	-	-	-0.0	101.5	2.6	-0.8	-	101.5	-	-
Media	-	100	-	-	1.0	100.3	2.2	0.45	-	100.3	-	-
D.E.R.					90.0	1.5	100.1	68.0	-	1.5	-	-
A21	75	75	75	-	76.2	76.7	75.6	-1.5	101.7	102.2	100.8	-
A22	75	75	75	-	78.7	76.3	81.7	-7.5	104.9	101.8	108.9	-
A23	75	75	75	-	79.5	77.9	79.5	-6.7	106.0	103.9	106.1	-
Media	75	75	75	-	78.1	77.0	78.9	-4.9	104.2	102.6	105.3	-
D.E.R.					2.2	1.1	3.9	60.6	2.2	1.1	3.9	-
A31	50	50	100	50	51.0	50.4	100.9	48.8	102.0	100.8	100.9	99.6
A32	50	50	100	50	50.6	50.3	99.6	50.0	101.2	100.5	99.6	100.1
A33	50	50	100	50	50.4	51.1	104.2	47.9	100.8	102.2	104.2	95.7
Media	50	50	100	50	50.7	50.6	101.6	48.9	101.3	101.2	101.6	97.8
D.E.R.					0.6	0.9	2.3	2.2	0.6	0.9	2.3	2.2

Tabla VII-23. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua subterránea de manantial

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
B11	75	75	-	-	73.3	75.6	-6.7	-0.2	97.8	100.8	-	-
B12	75	75	-	-	77.3	75.6	-1.2	-5.3	103.1	100.8	-	-
B13	75	75	-	-	76.6	76.1	-6.6	-3.9	102.1	101.5	-	-
Media	75	75	-	-	75.7	75.8	-4.8	-3.2	101.0	101.0	-	-
D.E.R.					2.8	0.5	65.7	83.2	2.8	0.5	-	-
B21	-	75	100	75	2.5	75.7	104.2	71.9	-	100.9	104.2	95.8
B22	-	75	100	75	0.7	75.5	99.6	77.1	-	100.7	99.6	102.8
B23	-	75	100	75	1.2	75.5	102.6	73.9	-	100.7	102.6	98.6
Media	-	75	100	75	0.9	75.6	102.1	74.3	-	100.8	102.1	99.1
D.E.R.					62.5	0.1	2.3	3.6	-	0.2	2.3	3.6
B31	100	25	75	75	98.3	24.4	74.6	78.0	98.3	97.5	99.5	104.1
B32	100	25	75	75	99.8	23.1	72.1	78.9	99.8	92.6	96.1	105.2
B33	100	25	75	75	100.0	24.5	71.8	77.2	100.0	98.1	95.8	102.9
Media	100	25	75	75	99.4	24.0	72.8	78.0	99.4	96.4	97.1	104.1
D.E.R.					0.9	3.1	2.1	1.1	0.9	3.1	2.1	1.1

2 Desarrollo de un optosensor fluorescente de fibra óptica para la determinación simultánea de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un equipo modular equipado con una CCD

Para poder suplir las deficiencias del optosensor propuesto para la determinación conjunta de ANT, BaP, FLT y BbF, en el que se usaba como transductor un fluorímetro convencional y para comprobar la fiabilidad y versatilidad de la fase sensora seleccionada se procedió a optimizar y evaluar las características de ésta cuando se implementaba en un equipo modular.

El equipo modular utilizado consta de una red de difracción, una CCD (1024x256 píxeles) intensificada y refrigerada con nitrógeno líquido y un ordenador que controla el instrumento y registra la señal lumínica que llega a la CCD (véase Figura VII-20).

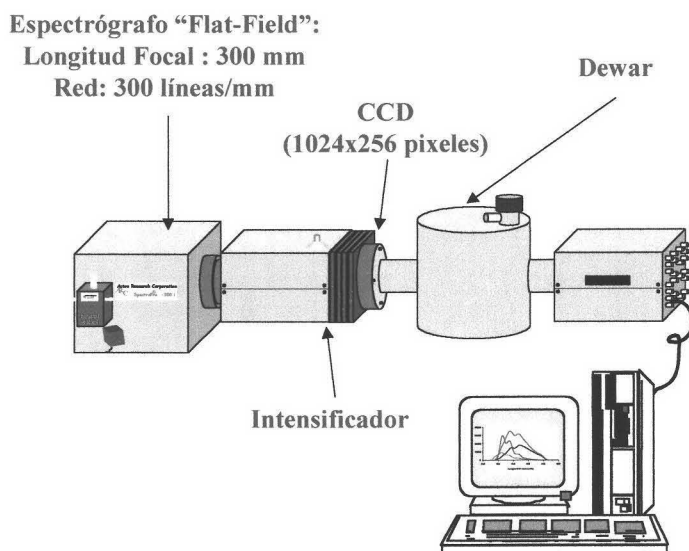


Figura VII-20. Esquema del instrumento modular usado.

2.1 Desarrollo instrumental

Para el desarrollo del optosensor fue necesario llevar a cabo un desarrollo instrumental basado en el acoplamiento a este equipo modular de un sistema de excitación y un compartimento de muestra adecuados para la determinación conjunta de los cuatro HAPs en estudio.

Como fuente de excitación se usó una lámpara continua de Xe y como son necesarias dos longitudes de onda para la medida de las cuatros especies, se usó un monocromador y un filtro de interferencia. Además se usó fibra óptica para transportar la luz desde la lámpara de excitación a los selectores de longitud de onda y de éstos al compartimento de muestra y al equipo modular (véase Figura VII-21).

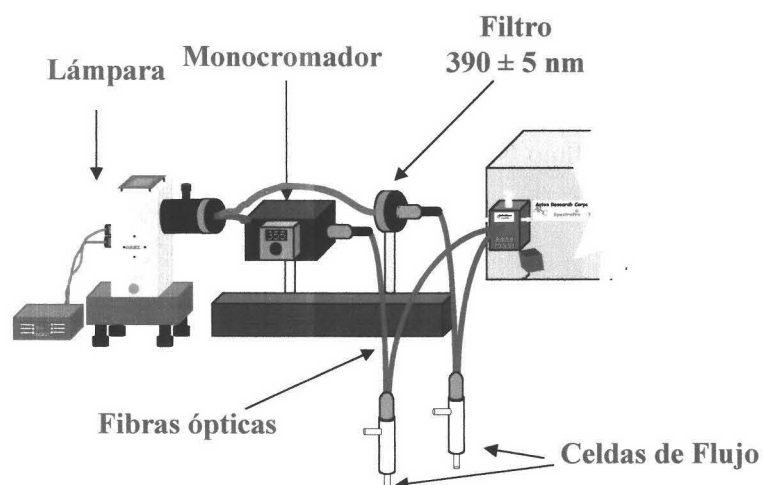


Figura VII-21. *Desarrollo instrumental implementado en el equipo modular.*

Como compartimento de muestra se usaron dos celdas de flujo diseñadas especialmente para este optosensor (véase Figura VII-22).

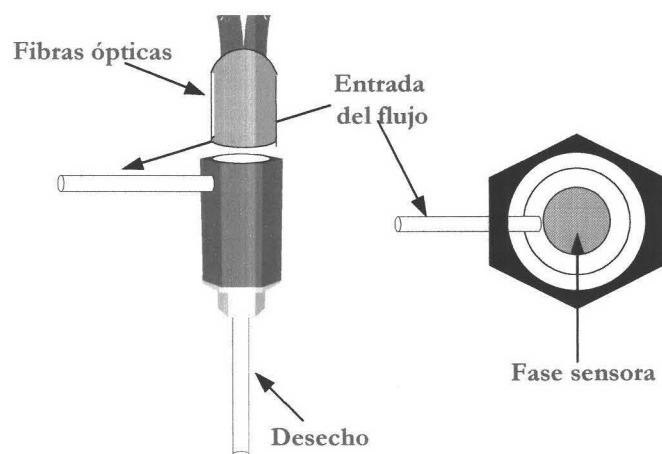


Figura VII-22. *Esquema de la celda de flujo diseñada.*

Como se observa en la Figura VII-21, la luz proveniente de la lámpara es recogida por dos haces de fibras ópticas, uno de ellos se enfoca sobre un monocromador y el otro sobre un filtro de interferencia. De esta forma, y en similitud al apartado anterior, se pueden seleccionar las dos longitudes de onda de excitación necesarias para la determinación conjunta de los HAPs en estudio. La luz monocromática obtenida es llevada a las dos celdas de flujo y la emisión fluorescente es recolectada por otros dos haces de fibras cuyos finales se fijan a diferentes alturas en la rendija de entrada del espectrógrafo modular usado. Así, se obtiene de forma separa y simultánea la emisión fluorescente producida en ambas celdas de flujo (véase Figura VII-23).

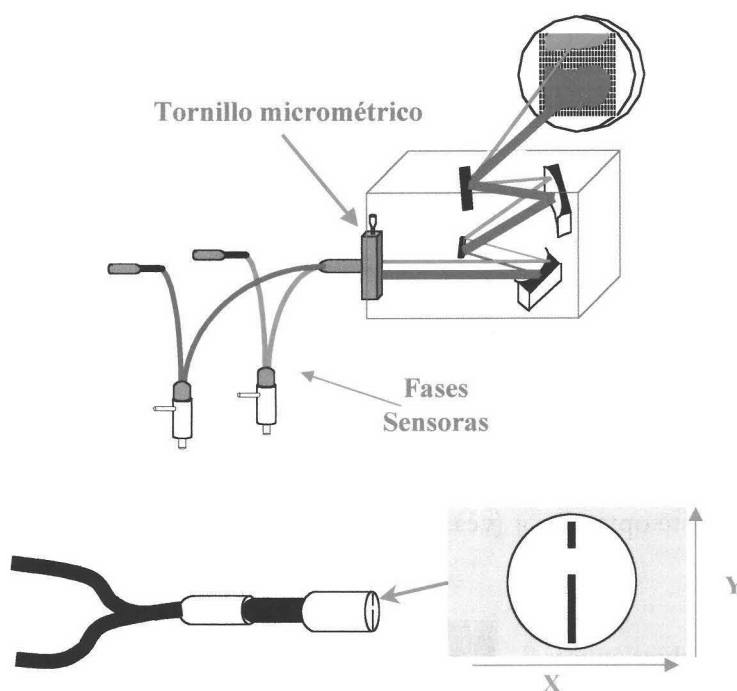


Figura VII-23. Esquema de transporte de la emisión fluorescente al detector.

Como se puede ver en esta figura, las fibras ópticas que conectaban las celdas de flujo con el espectrógrafo se acoplaron a un tornillo que tenía dos rendijas de igual anchura pero diferente longitud. Con este sistema se consiguió que la luz proveniente de cada haz de fibras ópticas se enfocaran en distintas zonas de la CCD y por tanto se pudiera discriminar la luz de cada haz de fibras ópticas.

2.2 Establecimiento de las condiciones experimentales óptimas

Como condiciones experimentales se han mantenido las mismas que se establecen para el optosensor fluorescente que usa como transductor un fluorímetro convencional pues son características de la fase sensora utilizada y no se ven afectadas por el cambio de instrumento de medida.

Lo que sí varía con respecto al anterior optosensor es el sistema de flujo, pues con este detector es posible establecer dos o más celdas de flujo de medida simultáneamente.

En la Tabla VII-24 se resumen todas las condiciones experimentales óptimas para el optosensor desarrollado.

Tabla VII-24. Condiciones experimentales óptimas

Fase sensora	Amberlita XAD 4
Tamaño se resina	80-120 μm
Regenerador	Acetona pura
Disolvente orgánico en las muestras	25% 1,4-dioxano
Disolvente orgánico en el portador	ninguno
Disolución reguladora:	$\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$
$[\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}]$:	15 mM
Velocidad de flujo	2.0 mL/min
Volumen de inyección de muestra:	0.5 mL

2.2.1 Diseño del sistema de flujo

En la Figura VII-24 se muestra el sistema de flujo utilizado. Concretamente consta de:

- Un sistema de propulsión que consistente en una bomba peristáltica que arrastra dos canales de disolución portadora.
- Un sistema de inyección de muestra (válvulas A y B) que introduce los analitos en estudio en el sistema de flujo por cada uno de los canales.

- Un sistema de regeneración que consta de dos válvulas (válvulas C y D) que introducen la disolución regenerante para que el sistema sea reutilizable.
- Dos zonas de medida, que son las dos celdas de flujo diseñadas especialmente para este optosensor, en las que se encuentra la fase sensora empaquetada y a las que llegan haces de fibras bifurcadas.

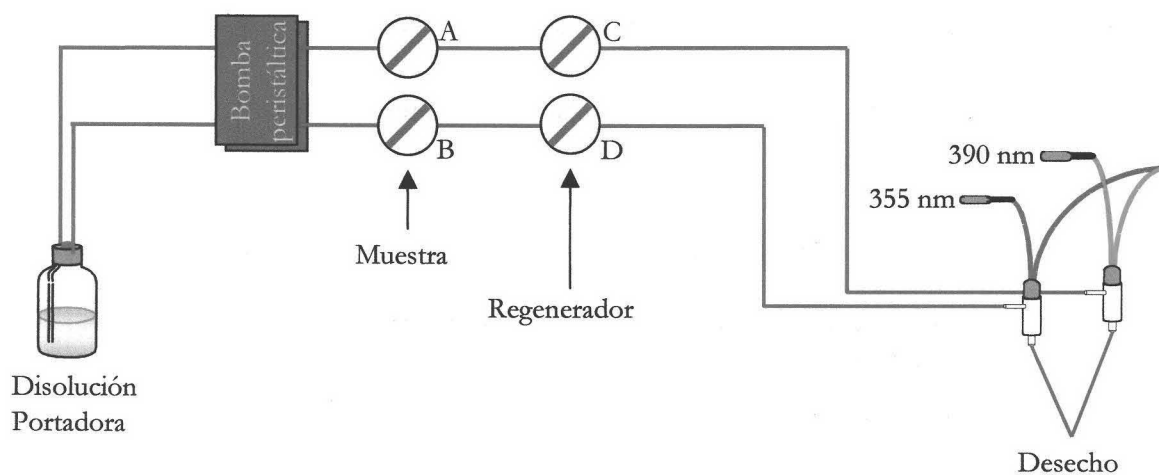


Figura VII-24. Sistema de flujo usado.

2.3 Establecimiento de las condiciones óptimas para la determinación conjunta de los cuatro HAPs

2.3.1 Distribución de la longitud de onda en la CCD

Como se ha comentado anteriormente, el espectrógrafo usado cuenta una red cuya misión es enfocar unas ciertas longitudes de onda en la CCD. Por tanto, y para poder conocer con exactitud qué longitudes de onda están incidiendo en el detector, se llevó a cabo el estudio de distribución de longitudes de onda en la CCD.

Para ello se seleccionó una longitud de onda de 460 nm en la red, se colocó un espejo en la celda de flujo y se registró la señal recibida en la CCD cuando se variaba la λ_{exc} desde 370 a 510 obteniéndose la distribución de longitudes de onda en la CCD (véase Figura VII-25).

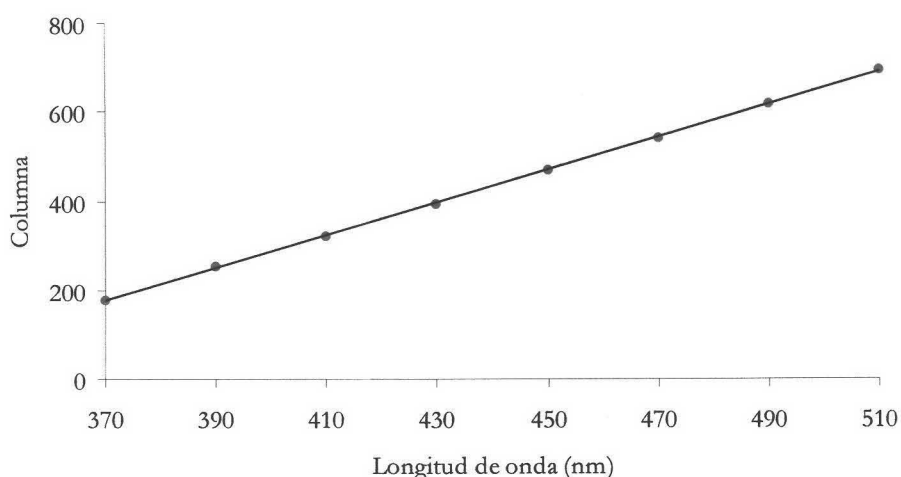


Figura VII-25. *Distribución de longitudes de onda en la CCD.*

De esta forma obtenemos una línea recta que nos relaciona columna de la CCD con una longitud de onda mediante la ecuación $X=3.69 \cdot \lambda - 1187$, donde X es el número de columna y λ la longitud de onda. Además se puede conocer cual es la diferencia de longitud de onda que recogen dos píxeles consecutivos; que en estas condiciones fue de 0.271 nm.

2.3.2 Selección de las longitudes de onda de excitación y emisión

Al igual que con el fluorímetro convencional se llevó a cabo una selección de las longitudes de onda de excitación y emisión de medida para así obtener cuatro zonas del espectro bidimensional; una zona 1 donde emita únicamente el ANT, una zona 2 donde emitan con la misma intensidad ANT, BaP y BbF y que el FLT no emita, una zona 3 donde emitan con la misma intensidad FLT y BbF y no emita el resto de analitos y una zona 4 donde emita solamente el BaP. Y por tanto, se pueda establecer el sistema de ecuaciones:

$$\begin{aligned}
 I'_1 &= k'_1 \cdot [ANT] \\
 I'_2 &= k'_8 \cdot ([ANT] + [BaP] + [BbF]) \\
 I'_3 &= k'_9 \cdot ([FLT] + [BbF]) \\
 I'_4 &= k'_7 \cdot [BaP]
 \end{aligned}$$

y registrando las curvas de calibrado de ANT, la mezcla ANT+BaP+BbF, la mezcla FLT+BbF y de BaP se puedan calcular los factores de estas ecuaciones y poder llevar a cabo la determinación simultánea de los cuatro HAPs.

Para ello, se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 200 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano de cada uno de los HAPs en estudio, registrándose los espectros de emisión de 350 a 600 nm a diferentes λ_{exc} (340, 345, 350, 355 y 390 nm) (véase Figura VII-26).

Como se puede observar, tenemos prácticamente los mismos espectros usando como sistema de detección un fotomultiplicador y una CCD. Y, de igual forma que en el apartado 1, cuando se excita a 355 tenemos una zona 1 donde se emite sólo el ANT, una zona 2 donde emiten ANT, BaP y BbF con intensidad parecida y una zona 3 donde son prácticamente isoemisivos FLT y BbF y ANT y BaP no emiten. Y excitando a 390 nm se obtiene una zona 4 donde emite únicamente el BaP.

Una vez establecidas las zonas de medida, haciendo uso de la ecuación que nos relaciona la longitud de onda con el número de columna en la CCD podemos obtener los píxeles a los cuales se deben llevar a cabo las medidas.

También se llevó a cabo una selección de las filas entre las cuales se va a acumular carga en la CCD. Este parámetro afecta a la cantidad de energía que va a acumular la CCD para cada uno de las zonas de medida y por tanto afecta a la sensibilidad del método propuesto. Así para las zonas 1,2 y 3 se seleccionó a el mismo número de filas (cincuenta) y para la zona 4, debido a que el BaP emite una mayor intensidad se selecciono un número inferior (diez).

Además hay que tener en cuenta el diseño experimental que se ha desarrollado, pues para poder llevar a cabo la determinación simultánea se han enfocado los haces de fibras ópticas provenientes de las dos celdas de flujo a diferentes alturas de la CCD.

Por tanto, teniendo en cuenta todas estas consideraciones, se optimizó la distribución de filas y columnas de la CCD para resolver la determinación conjunta y simultánea de ANT, BaP, FLT y BbF. En la Tabla VII-25 se resumen las condiciones de medida y en la Figura VII-27 se puede observar una simulación de la luz que incide y la lectura que se lleva a cabo la CCD.

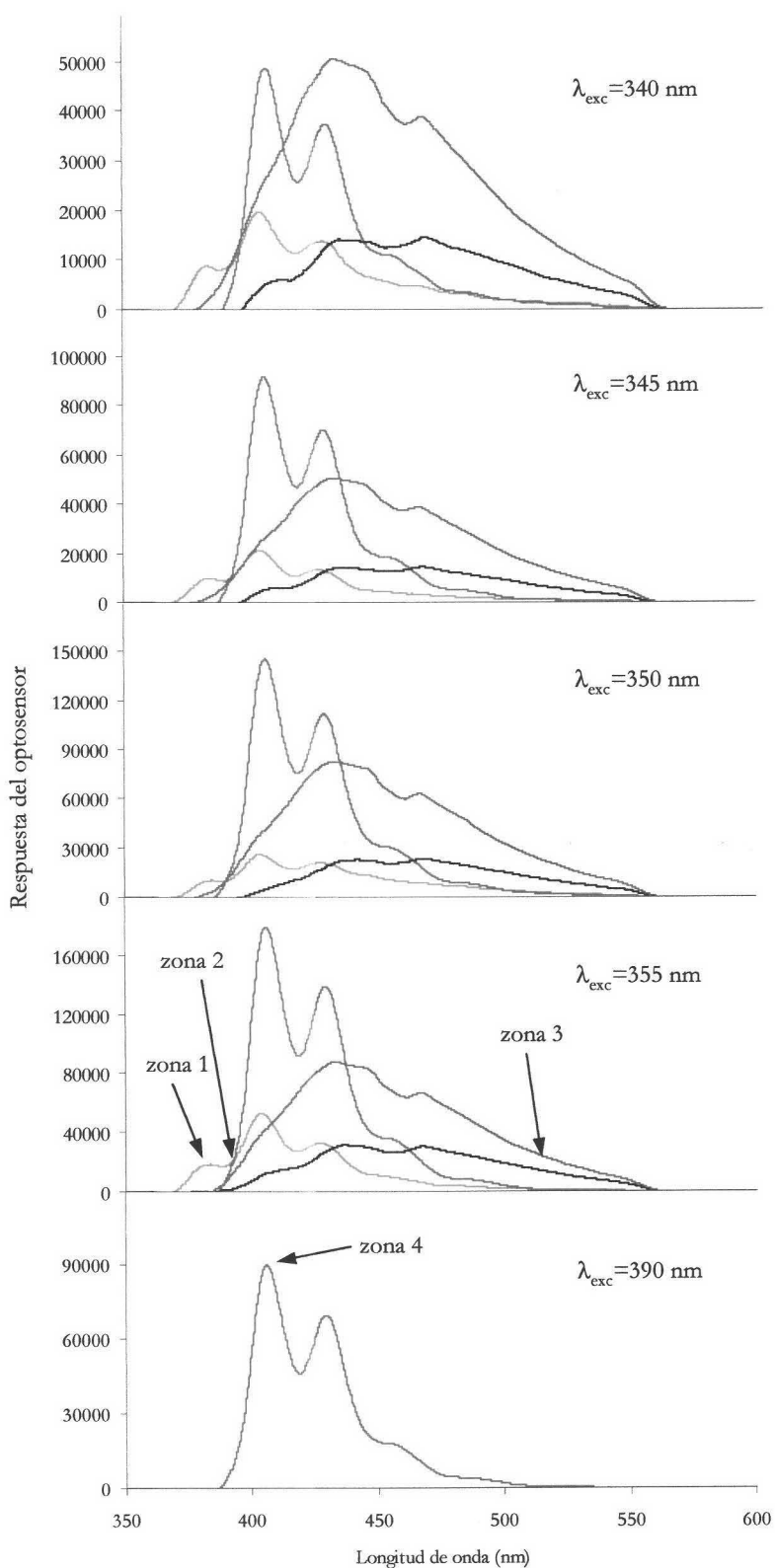


Figura VII-26. Diferencia entre los espectros de excitación y emisión del ANT, BaP, FLT y BbF soportados en Amberlita XAD 4 y esta fase sensora a diferentes longitudes de onda de excitación.

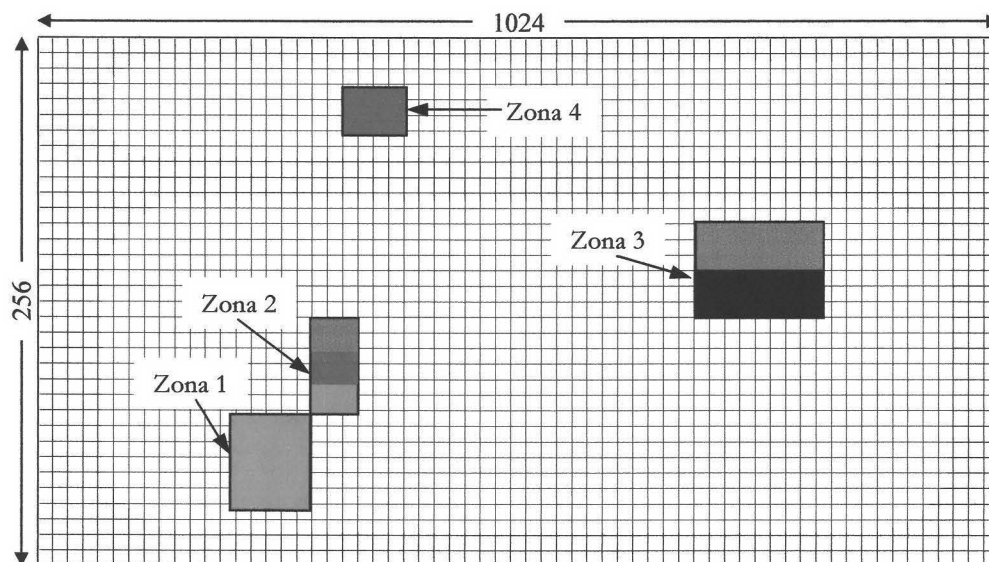


Figura VII-27. Simulación de la luz que incide sobre la CCD y localización de las zonas de medida (ANT, BaP, FLT y BbF).

Tabla VII-25. Condiciones instrumentales de medida

Zona	λ_{exc}	Emisión		
		Columnas	Filas	λ_{em}
1	355	220-249	1-50	382-390
2	355	250-265	51-100	390-394
3	355	800-873	101-151	539-559
4	390	300-330	221-231	403-412

Una vez seleccionadas las condiciones de medida, se procedió a comprobar los requisitos necesarios para la resolución de la mezcla. Para ello, se hicieron sucesivas inyecciones de una disolución de 200 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano de cada uno de los HAPs en estudio, registrándose la señal independiente de cada uno de ellos en los cuatro puntos seleccionados (véase Figura VII-28).

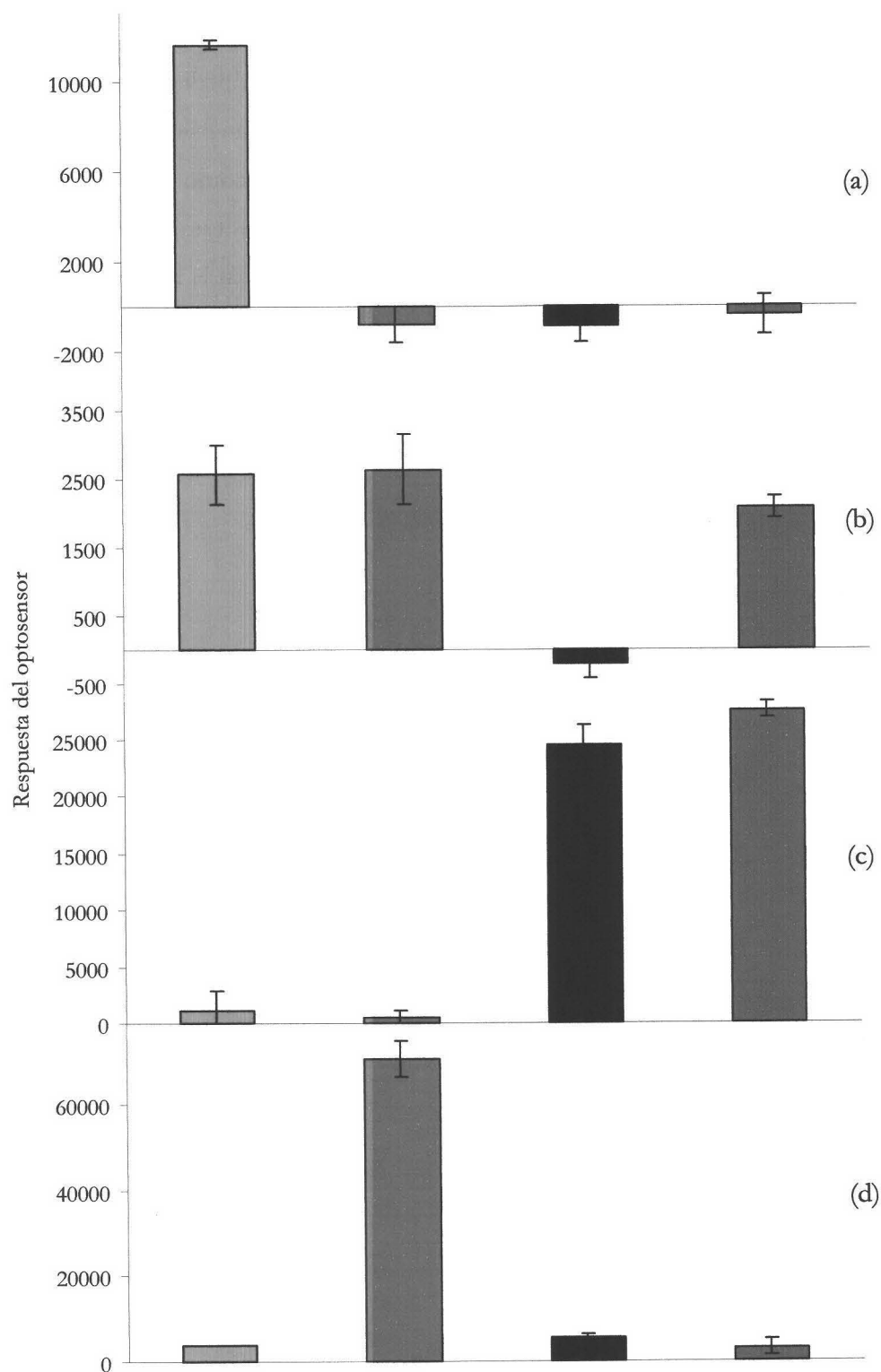


Figura VII-28. Respuesta del optosensor obtenida en (a) zona 1, (b) zona 2, (c) zona 3 y (d) zona 4. (■ ANT, ■ BaP, ■ FLT y ■ BbF).

Como se puede observar en esta figura en las zonas 1 y 4 emiten únicamente el ANT y el BaP, respectivamente, por lo que registrando cómo varía la respuesta del optosensor en función de la concentración de ANT o BaP se pueden calcular los factores k'_1 y k'_7 del sistema de ecuaciones. En la zona 2 emiten con intensidades parecidas ANT, BaP y BbF sin la influencia del FLT, por lo que registrando cómo varía la respuesta del optosensor en función de la suma de las concentraciones de estos tres compuestos se puede calcular el factor k'_8 . Y en la zona 3 emiten FLT y BbF sin la influencia de los otros dos analitos y ambos emiten con intensidades similares, por lo que estableciendo la curva de calibrado en función de la concentración total FLT+BbF se puede calcular el factor k'_9 . Por lo que se puede establecer el sistema de ecuaciones y registrando la intensidad en cada una de las zonas seleccionadas se puede determinar de forma sencilla, rápida y simultánea la concentración de cada especie en una muestra problema.

2.3.3 Estudio de la aditividad de las señales

Para poder establecer una recta de calibrado en las zonas 2 y 3, zonas en las que se evalúa una mezcla de analitos, es necesario comprobar previamente que las señales son aditivas, para así, poder establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de la mezcla.

Para comprobar la aditividad en la zona 2 se hicieron sucesivas inyecciones de disoluciones de ANT, BaP y BbF de 100 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano y las distintas combinaciones de dos (de concentración total 200 ng/mL) y tres compuestos (de concentración final 300 ng/mL) posibles, registrándose la diferencia señal-ruido a sus condiciones de medida (véase Figura VII-29).

Para comprobar la aditividad en la zona 3, se hicieron sucesivas inyecciones de disoluciones de FLT y BbF de 100 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano y la combinación binaria posible (de concentración total 200 ng/mL), registrándose la diferencia señal-ruido a sus condiciones de medida (véase Figura VII-30).

Como se puede observar en ambas figuras, tanto las señales obtenidas en la zona 2 como en la 3 son aditivas, por lo que se puede establecer una recta de calibrado en función de la concentración total de HAPs presentes en la mezcla.

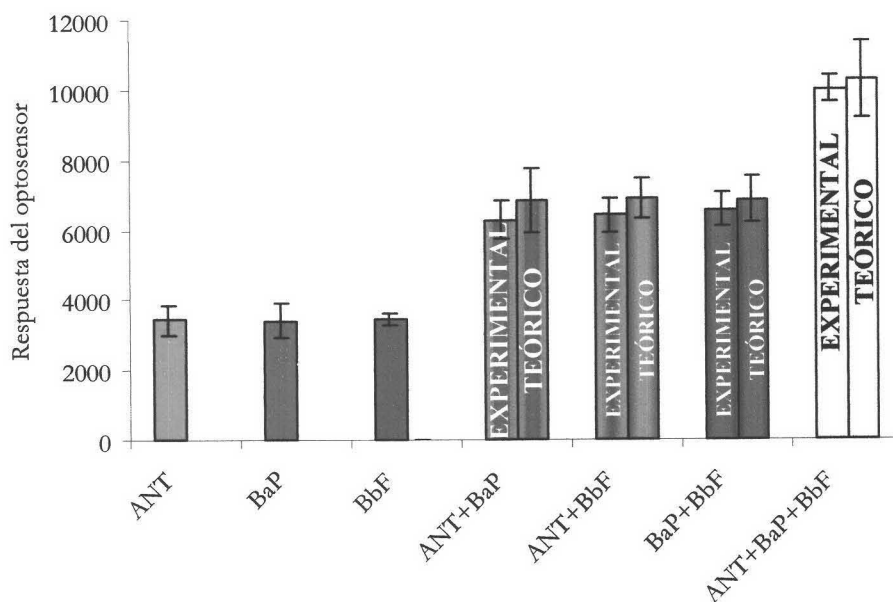


Figura VII-29. Estudio de aditividad en la zona 2 (■ ANT, ■ BaP y ■ BbF).

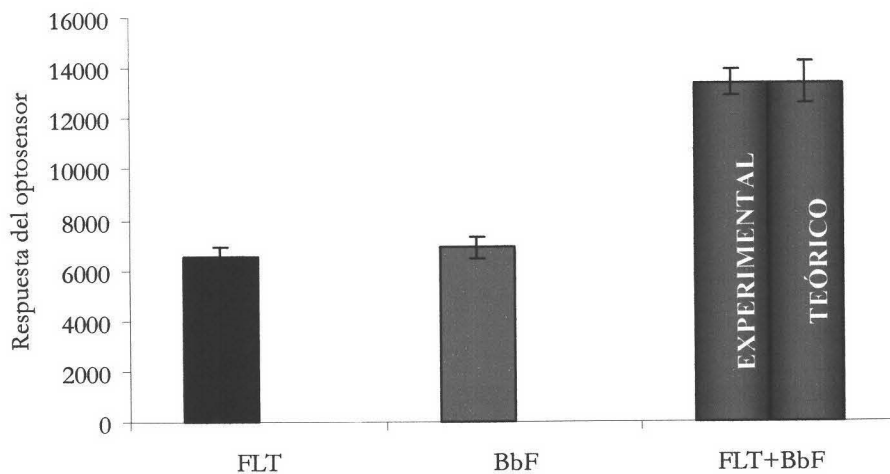


Figura VII-30. Estudio de la aditividad en la zona 3 (■ FLT y ■ BbF).

2.3.4 Estudio del tiempo de respuesta del optosensor

Debido a que el programa informático que controla la adquisición de datos del espectrógrafo usado en este apartado no disponía de la posibilidad de registrar cuentas acumuladas en la CCD en función del tiempo. Es decir, no permitía la posibilidad de registrar diagramas, es necesario establecer el tiempo de respuesta del optosensor.

Para ello se hicieron sucesivas inyecciones de 100 ng/mL y 25% de 1,4-dioxano de cada uno de los analitos y se registró la respuesta del optosensor que se producía en las celdas de flujo a distintos tiempos (véase Figura VII-31).

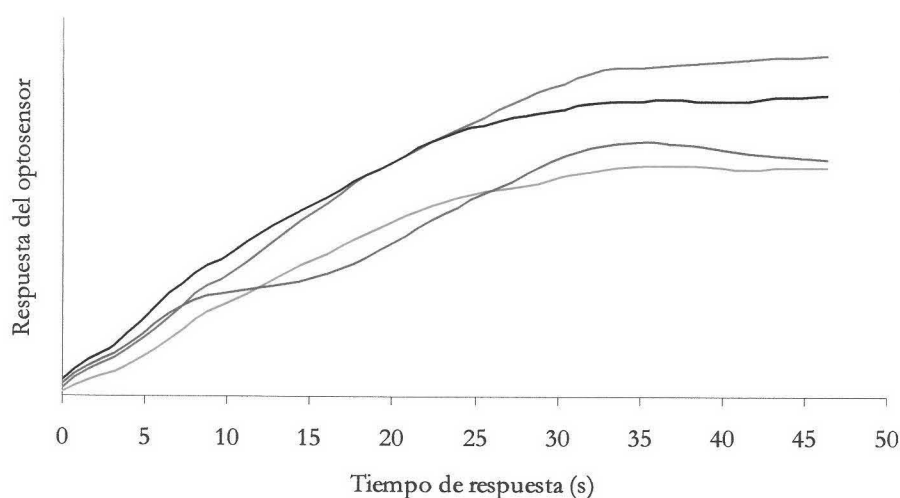


Figura VII-31. Estudio del tiempo de respuesta del optosensor (— ANT, — BaP, — FLT y — BbF).

Como se observa en esta figura, a partir de 35 segundos se estabiliza la respuesta del optosensor para todos los analitos en estudio y por tanto a partir de este tiempo se puede medir. Por lo que se eligió 35 s como tiempo que debe transcurrir desde que se inyecta hasta que se acciona el mecanismo de adquisición de datos de la CCD.

2.4 Características analíticas del método

Una vez establecidas las condiciones experimentales óptimas y las condiciones de medida para determinación conjunta usando el optosensor fluorescente de fibra óptica que usa como transductor un espectrógrafo modular con una ICCD como sistema de detección, se procedió al establecimiento del método analítico. En este apartado se establecen el procedimiento operatorio, las rectas de calibrado para cada una de las zonas de medida previamente seleccionadas y los parámetros de fiabilidad de cada una de las curvas, cuyo estudio se llevó a cabo mediante el protocolo del modelo de regresión lineal de la IUPAC y el propuesto por Cuadros *y col.*¹.

2.4.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora seleccionada (Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en las celdas de flujo diseñadas especialmente para este optosensor y se le acoplaron los haces de fibras ópticas para llevar la luz de excitación y recoger la emisión fluorescente. Se preparó una disolución portadora diluyendo disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y varias disoluciones de concentraciones crecientes de ANT (para llevar a cabo la curva en la zona 1), de ANT+BaP+BbF (para llevar a cabo la curva en la zona 2), de FLT+BbF (para la zona 3) y de BaP (para la zona 2) en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 en una concentración de 15 mM y un 25% de 1,4-dioxano). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2.0 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo (véase Tabla VII-25) y se registró la señal analítica que se producía en las celdas de flujo 35s después de la inyección.

2.4.2 Rectas de calibrado

Se estableció la recta de calibrado para cada una de las zonas de medida seleccionadas variando la concentración de los analitos o mezclas de ellos, realizando tres réplicas para cada nivel de concentración.

En la Tablas VII-26 a VII-29 se muestran los datos obtenidos y en la figuras VII-32 a VII-35 se muestran las influencias de la concentración sobre la respuesta del optosensor en las diferentes zonas de medida.

Tabla VII-26. Réplicas obtenidas del calibrado en la zona de medida 1

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	2461	2694	2645
100	5473	5266	5053
150	7604	7676	7226
200	9558	9689	9577
250	12440	12043	12308

Tabla VII-27. Réplicas obtenidas del calibrado en la zona de medida 2

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
60	2390	2462	2503
120	4528	4700	4318
180	6712	6519	6338
240	8388	8240	8877

Tabla VII-28. Réplicas obtenidas del calibrado en la zona de medida 3

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	2160	1931	1867
100	3976	3829	4007
150	6197	6698	6542
200	8491	8211	8528
250	10068	10268	10138

Tabla VII-29. Réplicas obtenidas del calibrado en la zona de medida 4

Concentración (ng/mL)	Respuesta del optosensor		
50	54216	54952	53910
100	73741	72261	73133
150	92747	92014	91568
200	102140	101883	103632
250	123652	124781	125960

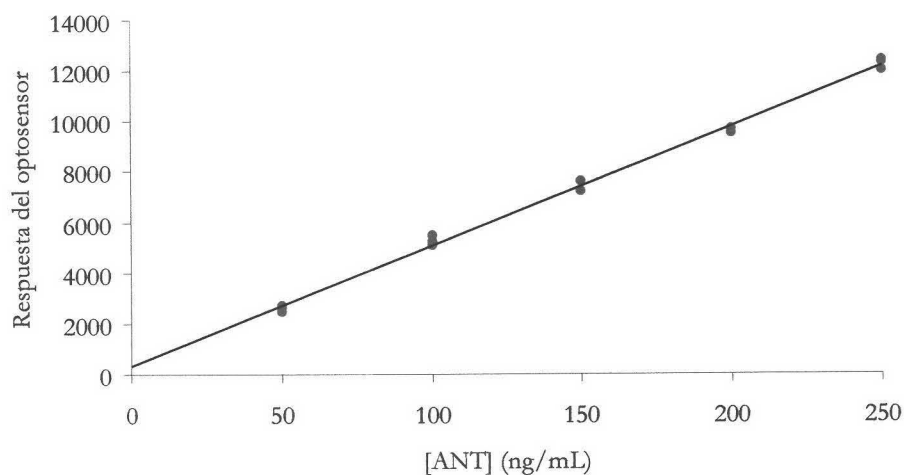


Figura VII-32. Curva de calibrado en la zona 1.

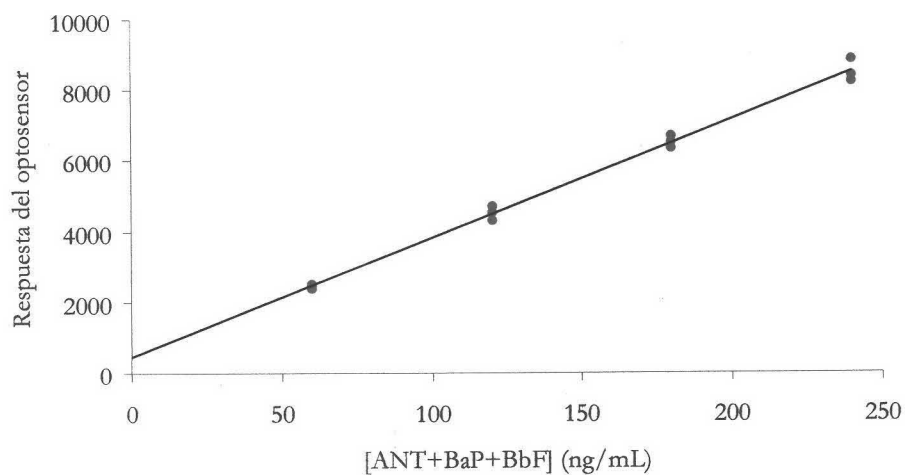


Figura VII-33. Curva de calibrado en la zona 2.

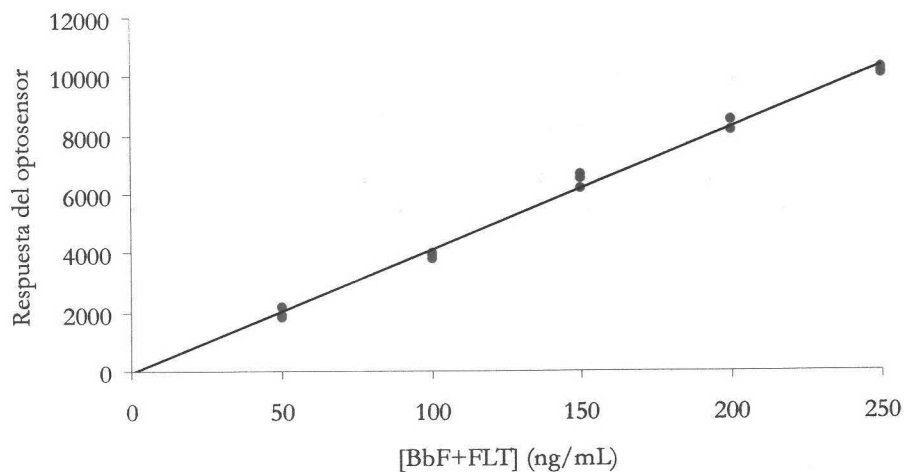


Figura VII-34. Curva de calibrado en la zona 3.

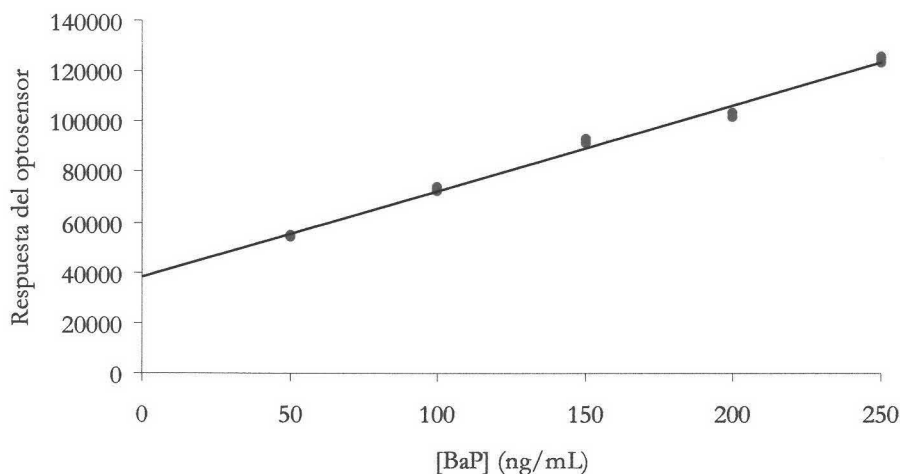


Figura VII-35. Curva de calibrado en la zona 4.

2.4.3 Parámetros de fiabilidad

Para calcular el límite de detección ($L.D.$) y el límite de cuantificación ($L.C.$) según el criterio IUPAC, se calculó la desviación estándar de un blanco (s_0), para ello se registró la desviación estándar de la línea base del optosensor y a partir de ella se calculó el $L.D.$ y el $L.C.$ Las Tablas VII-30 a VII-33 muestran los resultados obtenidos.

Tabla V-30. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 1

Dato	Valor estimado
s_0	122.8
Límite de detección (ng/mL)	7.8
Límite de cuantificación (ng/mL)	26.1
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	7.8-250.0

Tabla V-31. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 2

Dato	Valor estimado
s_0	52.7
Límite de detección (ng/mL)	5.1
Límite de cuantificación (ng/mL)	7.0
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	5.1-240.0

Tabla V-32. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 3

Dato	Valor estimado
s_0	154.0
Límite de detección (ng/mL)	11.1
Límite de cuantificación (ng/mL)	37.0
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	11.1-250.0

Tabla V-33. Parámetros de fiabilidad obtenidos por el método IUPAC para la recta 4

Dato	Valor estimado
s_0	743.9
Límite de detección (ng/mL)	6.5
Límite de cuantificación (ng/mL)	21.8
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	6.5-250.0

Los parámetros de fiabilidad según el método propuesto por Cuadros *y col.* han sido establecidos mediante el método de regresión lineal a partir del conjunto de datos de la experiencia del calibrado.

La sensibilidad analítica, así como la linealidad se establecen mediante el uso de los datos derivados del calibrados, reflejados en las Tablas VII-34 a VII-37.

Tabla VII-34. Datos estadísticos de la recta 1

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	394.13
Desviación estándar (s_a)	125.55
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	31.9
Pendiente (b)	47.10
Desviación estándar (s_b)	0.75
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	1.6
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	207.34
Coefficiente de correlación (r)	0.9983
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.7

Tabla VII-35. Datos estadísticos de la recta 2

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	458.50
Desviación estándar (s_a)	137.39
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	30.0
Pendiente (b)	33.60
Desviación estándar (s_b)	0.84
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	2.5
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	194.29
Coefficiente de correlación (r)	0.9969
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.38

Tabla VII-36. Datos estadísticos de la recta 3

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	-50.93
Desviación estándar (s_a)	149.51
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	293.6
Pendiente (b)	41.63
Desviación estándar (s_b)	0.90
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	2.2
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	246.91
Coefficiente de correlación (r)	0.9970
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.39

Tabla VII-37. Datos estadísticos de la recta 4

Dato estadístico	Valor estimado
Ordenada en el origen (a)	38257.67
Desviación estándar (s_a)	1535.51
Desviación estándar relativa (D.E.R.(a)) (%)	4.0
Pendiente (b)	340.77
Desviación estándar (s_b)	9.26
Desviación estándar relativa (D.E.R.(b)) (%)	2.7
Desviación estándar de regresión ($s_{R,c}$)	2535.82
Coefficiente de correlación (r)	0.9952
Coefficiente de determinación (r^2) (%)	99.05

Para la obtención de los límites de detección y cuantificación y de la precisión del método, son necesarios los datos relativos a la desviación estándar (s) de los patrones empleados para el establecimiento de las rectas de calibrado. Los datos de dichas desviaciones se muestran en las Tablas VII-38 a VII-41.

Tabla VII-38. Desviaciones estándar de los datos de la recta 1

Concentraciones (ng/mL)	s
50	3.2
100	2.9
150	2.8
200	2.9
250	3.2

Tabla VII-39. Desviaciones estándar de los datos de la recta 2

Concentraciones (ng/mL)	s
60	4.4
120	3.8
180	3.8
240	4.6

Tabla VII-40. Desviaciones estándar de los datos de la recta 3

Concentraciones (ng/mL)	s
50	4.3
100	3.9
150	3.8
200	3.9
250	4.3

Tabla VII-41. Desviaciones estándar de los datos de la recta 4

Concentraciones (ng/mL)	s
50	5.5
100	4.9
150	4.7
200	4.8
250	5.5

La estimación de los parámetros característicos del método se ven reflejados en las Tablas VII-42 a VII-45.

Tabla VII-42. Parámetros de fiabilidad para la curva 1

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	98.4	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	4.4	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	12.7	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	42.4	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	12.7-250.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	6.7
	100 ng/mL	2.8
	150 ng/mL	1.8
	200 ng/mL	1.5
	250 ng/mL	1.3

Tabla VII-43. Parámetros de fiabilidad para la curva 2

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	97.5	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	5.8	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	16.5	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	55.1	
Intervalo dinámico lineal (ng/mL)	16.5-240.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	60 ng/mL	7.4
	120 ng/mL	3.2
	180 ng/mL	2.1
	240 ng/mL	1.8

Tabla VII-44. Parámetros de fiabilidad para la curva 3

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	97.8	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	5.9	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	17.1	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	57.1	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	17.1-250.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	8.9
	100 ng/mL	4.1
	150 ng/mL	2.4
	200 ng/mL	1.9
	250 ng/mL	1.8

Tabla VII-45. Parámetros de fiabilidad para la curva 4

Parámetro	Valor estimado	
Linealidad (1-D.E.R.(b)) (%)	97.3	
Sensibilidad analítica (ng/mL)	7.4	
Límite de detección aproximado (ng/mL)	21.5	
Límite de cuantificación aproximado (ng/mL)	71.7	
Rango dinámico lineal (ng/mL)	21.5-250.0	
Precisión (D.E.R.) (%)	50 ng/mL	11.6
	100 ng/mL	4.8
	150 ng/mL	3.0
	200 ng/mL	2.6
	250 ng/mL	2.2

2.5 Aplicaciones del optosensor de fibra óptica para la determinación conjunta de ANT, BaP, FLT y BbF

2.5.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para distintas mezclas aleatorias de los cuatro HAPs en estudio, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua subterránea de un manantial) se enriquecieron a distintos niveles de concentración de los analitos en estudio (véase Tablas VII-46 y VII-47). Se tomó la cantidad adecuada de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 para que tuviese una concentración de 15 mM y la cantidad adecuada de 1,4-dioxano para que estuviese presente en un 25% y se enrasó con la muestra de agua a analizar.

Se realizaron 3 réplicas para cada una de las muestra analizadas a cada nivel de concentración llevando a cabo el registro de la intensidad de fluorescencia a las condiciones

instrumentales óptimas de cada una de las zonas de medida seleccionadas anteriormente con una velocidad de flujo de 2.0 mL./min, inyectando 0.5 mL de muestra y midiendo 35s después de la inyección. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas VII-46 y VII-47.

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto puede usarse de forma simple, selectiva y sensible para la resolución de mezclas de ANT, BaP, FLT y BbF en muestras de agua.

Tabla VII-46. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua superficial de consumo humano

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
A11	-	100	-	-	8.3	105.9	23.0	-12.5	-	105.9	-	-
A12	-	100	-	-	7.0	99.6	8.9	-5.3	-	99.6	-	-
A13	-	100	-	-	9.9	94.9	-3.6	9.8	-	94.9	-	-
Media	-	100	-	-	8.4	100.1	9.4	-2.7	-	100.1	-	-
D.E.R.					17.5	5.5	141.25	428.2	-	5.5	-	-
A21	75	75	75	-	78.9	76.6	88.5	-9.4	105.1	102.1	118.0	-
A22	75	75	75	-	78.2	76.1	84.3	-13.6	104.2	101.4	112.4	-
A23	75	75	75	-	78.0	77.3	85.5	-6.5	104.0	103.0	113.9	-
Media	75	75	75	-	78.3	76.6	86.1	-9.9	104.6	102.2	114.8	-
D.E.R.					0.6	0.8	2.5	36.1	0.6	0.8	2.5	-
A31	50	50	100	50	53.3	53.7	102.5	53.1	106.5	107.5	102.5	106.1
A32	50	50	100	50	50.6	54.5	84.3	61.0	101.2	109.0	84.3	122.0
A33	50	50	100	50	52.7	57.9	102.4	51.9	105.3	115.7	102.4	103.9
Media	50	50	100	50	52.2	55.4	96.4	55.3	104.4	110.8	96.4	110.7
D.E.R.					2.7	4.0	10.9	9.0	2.7	4.0	10.9	9.0

Tabla VII-47. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua subterránea de manantial

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
B11	75	75	-	-	74.8	75.6	0.5	0.8	99.7	100.8	-	-
B12	75	75	-	-	79.4	75.2	9.2	-1.7	105.8	100.3	-	-
B13	75	75	-	-	76.3	76.3	-2.1	9.4	101.7	101.7	-	-
Media	75	75	-	-	76.8	75.7	2.5	2.8	102.4	100.9	-	-
D.E.R.					3.0	0.7	234.1	204.3	3.0	0.7	-	-
B21	-	75	100	75	7.2	75.5	112.7	66.4	-	100.7	112.7	88.5
B22	-	75	100	75	7.1	74.8	107.1	68.6	-	99.8	107.1	91.5
B23	-	75	100	75	8.5	76.0	100.3	75.0	-	101.3	100.3	100.0
Media	-	75	100	75	7.6	75.4	106.7	70.0	-	100.6	106.7	93.3
D.E.R.					10.7	0.8	5.8	6.4	-	0.8	5.8	6.4
B31	100	25	75	75	109.9	20.6	85.8	77.6	109.9	82.4	114.4	103.5
B32	100	25	75	75	103.0	17.1	61.8	94.5	103.0	68.6	82.3	126.0
B33	100	25	75	75	106.4	19.0	79.8	77.3	106.4	76.0	106.4	103.1
Media	100	25	75	75	106.4	18.9	75.8	83.2	106.4	75.7	101.0	110.9
D.E.R.					3.2	9.1	16.5	11.8	3.2	9.1	16.5	11.8

3 Desarrollo de un optosensor fluorescente para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno usando como transductor un fluorímetro convencional y redes neuronales

En el apartado 1 de este capítulo se ha desarrollado un optosensor (optosensor 1) para la determinación conjunta de cuatro HAPs usando como transductor un fluorímetro convencional que disponía de un fotomultiplicador (detector monoparamétrico) como sistema de detección. El hecho de utilizar un sistema monoparamétrico de detección hace que la determinación conjunta de los cuatro HAPs no sea simultánea y aunque posee buenas características analíticas, no posee una de las características imprescindibles que debe tener un optosensor de screening para su comercialización: simultaneidad.

Para solventar este problema, en el apartado 2 de esta Memoria, se ha desarrolla un optosensor fluorescente de fibra óptica (optosensor 2) que usa como transductor un espectrómetro equipado con una ICCD (dispositivo multiparamétrico) como sistema de detección. En este caso, se han conseguido buenas características analíticas y además la determinación de los cuatro HAPs simultáneamente. Sin embargo, la instrumentación utilizada, el sistema de flujo desarrollado y la necesidad de refrigerar el sistema de detección con nitrógeno líquido hacen que el optosensor desarrollado sea más costoso y más difícil de miniaturizar y automatizar.

Para solucionar estos problemas se ha acoplado el optosensor fluorimétrico convencional (que usa como transductor un fluorímetro convencional con un fotomultiplicador como sistema de detección) con una red neuronal para el tratamiento de los datos. Este dispositivo posee la característica de sencillez del optosensor 1, por lo que se solventan las dificultades de instrumentación complicada y costosa, y además la simultaneidad del optosensor 2, pues con un solo espectro de emisión por cada inyección se pueden determinar los cuatro HAPs.

3.1 Procedimiento operatorio

La fase sensora (Amberlita XAD 4 particulada a 80-120 μm) se empaquetó en la cubeta de flujo convencional. Se prepararon una disolución portadora diluyendo disolución

reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 con agua bidestilada hasta una concentración de 15 mM y disoluciones de concentraciones variables de ANT, BaP, FLT y BbF en las condiciones experimentales óptimas (disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 en una concentración de 15 mM y un 25% de 1,4-dioxano). Se ajustó la velocidad de flujo de la bomba peristáltica a 2.0 mL/min y se acondicionó la fase sensora dejando pasar la disolución portadora durante 5 min. Se fijaron las condiciones instrumentales en el equipo para la obtención de espectros de emisión de 370 a 550 nm, con una velocidad de barrido de 3 nm/s, excitando a 355 nm y con un voltaje del detector de 600 V y anchura de rendijas 4 nm y paso de monocromador de 2 nm tanto para la excitación como para la emisión.

Para la obtención del espectro de emisión en flujo, 500 μL de muestra se introdujeron en la válvula de inyección y se accionó la recolección de datos transcurridos 45 s de la inyección de la muestra (tiempo de respuesta del optosensor). La fase sensora se regeneró con 250 μL de acetona pura y una vez recuperada y estabilidad se procedió a la siguiente inyección.

Los espectros de emisión obtenidos fueron tratados informáticamente e introducidos en la red neuronal. Este tratamiento informático consistió en proyectar los datos según las longitudes de onda seleccionadas y normalizar las salidas aplicando el intervalo [0,200], intervalo de concentraciones que nos interesa, a [0.1,0.9].

3.2 Tipo y estructura de la red neuronal

Debido a la complejidad del problema a tratar, el primer paso fue un planteamiento de los modelos desarrollados en el seno de la Inteligencia Artificial para la obtención de una solución de calidad suficiente. De todos los tipos de redes neuronales disponibles el más usado en espectroscopía es el Perceptrón multicapa². Las propiedades de este tipo de redes son bien conocidas, destacando su capacidad de aproximar funciones fuertemente no lineales, estando especialmente indicados cuando no hay mucho conocimiento experto disponible y sí existe una cantidad de datos suficientemente representativa.

2. R. Ferrer, J. Guiteras y J.L. Beltrán. "Artificial neural networks (ANNs) in the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by synchronous fluorescence". *Anal. Chim. Acta* 384 (1999) 261.

La determinación de la estructura de la red es una tarea difícil, pues no hay resultados teóricos disponibles ni reglas prácticas definitivas, por lo que se suele llevar a cabo mediante un proceso de ensayo y error. Los dos parámetros más importantes a optimizar en este tipo de redes son: la arquitectura de la red (número de capas ocultas) y el número de nodos en cada capa.

El número de capas ocultas no debe ser nunca superior a dos, pues con éstas la red puede desplegar todo su potencial; así para la determinación de los 4 HAPs en estudio se usó sólo una capa oculta, por lo que, la arquitectura de la red usada consta de una capa de entrada, una capa oculta y una capa de salida.

El parámetro más crítico en el diseño de la estructura de la red es el número de nodos que contiene cada capa. El número de nodos de la capa de entrada se fijó atendiendo a los datos empleados, el número de nodos de la capa de salida depende del número de analitos que se tengan y el número de nodos de la capa oculta se obtuvo empíricamente.

Cada dato del conjunto se estructura en atributos de entrada y de salida, representando a los valores determinados experimentalmente (espectros de emisión obtenidos con el fluorímetro) y a las concentraciones de cada una de las especies, respectivamente. Inicialmente, el número de parámetros de entrada es muy elevado y no todos son igualmente significativos, por lo que, en este caso, no es sólo recomendable sino necesario realizar una selección de características, es decir, reducir el conjunto de los atributos de entrada, simplificando y facilitando el aprendizaje de la red. Para hacer esta selección se recurrió al conocimiento del experto sobre el problema, seleccionándose 7 longitudes de onda de emisión como las más relevantes (las longitudes de onda máximas de cada analito en estudio y las zonas definidas en el desarrollo del optosensor 1 para la resolución de la mezcla; véase Figura VII-36), por tanto la red neuronal diseñada posee 7 nodos de entrada.

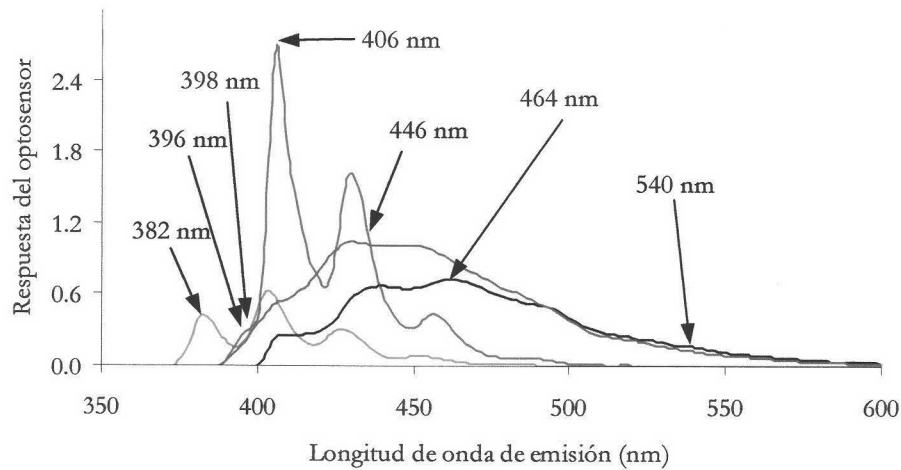


Figura VII-36. Parámetros de entrada seleccionados para el entrenamiento y generalización de las redes neuronales.

Debido a que se quiere resolver una mezcla de cuatro componentes (antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno) es necesario que la red posea 4 nodos de salida.

Y para el establecimiento del número de nodos de la capa oculta se diseñaron varias redes del tipo 7-x-4, donde x, que es el número de nodos de la capa oculta, se varió entre 3 y 20.

3.3 Aprendizaje de la red neuronal

Para el entrenamiento de la red neuronal emplearemos el algoritmo de retropropagación hacia adelante de errores y más concretamente una de sus mejoras posteriores, el algoritmo QuickProp de Falhman, donde los parámetros que regulan su funcionamiento y los valores que se usaron se muestran en la Tabla VII-48.

Tabla VII-48. Parámetros óptimos del aprendizaje

Parámetros	Valor óptimo
Tasa de aprendizaje (η)	0.0005
Crecimiento máximo de los pesos (μ)	1
Término de atenuación de los pesos (ν)	0.0001

Para el aprendizaje de la red neuronal es necesario desarrollar una matriz de muestra de entrenamiento y otra de muestra de prueba. Con las muestras de entrenamiento la red neuronal ajusta los pesos minimizando el error y una vez ajustados los pesos se comprueba su efectividad mostrando a la red nuevos datos que nunca ha visto (muestras de prueba) para evaluar el error cometido. Si este error está dentro de los parámetros permitidos se puede decir que ha terminado el proceso de aprendizaje, si no ocurre así es necesario introducir más muestras de entrenamiento o bien más iteraciones hasta que el error que se cometa sea aceptable.

Teniendo en cuenta que el intervalo de concentraciones razonables que interesan es $I_c=[0,200]$ y que el espacio de salida del conjunto de datos a considerar es I_c^4 , para garantizar que el conjunto de datos utilizados para el entrenamiento y aprendizaje de la red neuronal sea representativo, los datos a utilizar deben cubrir todo el dominio. Por ello, se utilizó un algoritmo de muestreo del espacio de entrada según una distribución aleatoria uniforme, desarrollado por el Grupo de Investigación “*Sistemas Inteligentes*” del Departamento de Ciencias de la Computación e Inteligencia Artificial de la Universidad de Granada, garantizándose la equiprobabilidad entre todas las posibles concentraciones.

Un parámetro importante a la hora de realizar un modelado de sistemas complejos es el número de datos disponibles. La importante dimensionalidad del problema indica que se necesita un número elevado de datos, y por otro lado, el coste de cada experiencia nos lleva a fijar un límite realista para hacer abordable este estudio. Por estas razones, se fijó un conjunto de entrenamiento y aprendizaje con 96 datos, de los cuales 80 se utilizaron para entrenar la red y 16 para evaluar la calidad del aprendizaje realizado.

La Tabla VII-49 muestra los datos de cada una de las muestra de entrenamiento utilizadas para el entrenamiento de la red neuronal.

Tabla VII-49. Muestras de entrenamiento utilizadas

Nombre de la muestra	Concentración (ng/mL)			
	ANT	BaP	FLT	BbF
AA000	0	0	0	0
AA001	0	0	0	100
AA002	0	0	100	200
AA003	0	100	0	0
AA004	0	100	150	50
AA005	0	100	150	200
AA006	0	150	100	100
AA007	0	150	200	150
AA008	0	200	100	0
AA009	50	50	50	0
AA010	50	50	150	50
AA011	50	200	0	200
AA012	50	200	100	200
AA013	50	200	150	50
AA014	100	0	0	50
AA015	100	0	50	150
AA016	100	0	100	0
AA017	100	0	200	0
AA018	100	0	200	200
AA019	100	100	200	100
AA020	100	150	50	0
AA021	100	150	50	200
AA022	100	150	100	150
AA023	100	200	100	0
AA024	150	0	50	150
AA025	150	0	200	150
AA026	150	50	50	0
AA027	150	50	50	50
AA028	150	200	100	150
AA029	200	50	0	100

Nombre de la muestra	Concentración (ng/mL)			
	ANT	BaP	FLT	BbF
AA030	200	50	0	200
AA031	200	50	50	50
AA032	200	50	100	150
AA033	200	50	150	0
AA034	200	50	150	100
AA035	200	150	50	0
AA036	200	150	150	0
AA037	200	200	50	100
AA038	200	200	150	0
AA039	200	200	150	100
AB000	0	100	100	150
AB001	0	100	200	0
AB002	0	200	50	100
AB003	0	200	200	50
AB004	0	200	200	100
AB005	50	0	0	100
AB006	50	0	50	50
AB007	50	0	200	150
AB008	50	50	100	50
AB009	50	100	0	200
AB010	50	100	150	200
AB011	50	150	50	0
AB012	50	150	100	0
AB013	50	200	100	150
AB014	100	0	150	0
AB015	100	50	0	0
AB016	100	50	150	0
AB017	100	100	150	50
AB018	100	150	0	50
AB019	100	0	50	0
AB020	100	150	50	150

Nombre de la muestra	Concentración (ng/mL)			
	ANT	BaP	FLT	BbF
AB021	100	150	150	150
AB022	100	150	150	200
AB023	150	0	0	200
AB024	150	0	200	50
AB025	150	50	0	50
AB026	150	50	150	0
AB027	150	100	50	200
AB028	150	150	0	0
AB029	150	200	0	0
AB030	150	200	50	150
AB031	200	0	0	0
AB032	200	0	50	0
AB033	200	0	150	50
AB034	200	0	200	0
AB035	200	100	0	200
AB036	200	150	100	200
AB037	200	150	150	150
AB038	200	200	50	50
AB039	200	200	150	50

Y la Tabla VII-50 muestra los datos de cada una de las muestra de prueba utilizadas para la evaluación del aprendizaje de la red neuronal.

Tabla VII-50. Muestras de prueba utilizadas

Nombre de la muestra	Concentración (ng/mL)			
	ANT	BaP	FLT	BbF
CA000	0	50	50	50
CA001	0	100	200	0
CA002	0	150	200	100
CA003	0	200	50	0
CA004	50	50	50	0
CA005	50	150	100	150
CA006	100	50	150	0
CA007	100	100	100	150
CA008	100	150	50	0
CA009	100	200	50	200
CA010	100	200	150	0
CA011	150	50	50	200
CA012	150	100	200	0
CA013	150	150	0	50
CA014	200	50	50	150
CA015	200	200	50	50

3.3.1 Parámetros del aprendizaje

En el caso concreto en el que nos encontramos, el entrenamiento y comprobación del aprendizaje de la red neuronal no se realizó con las muestras de entrenamiento y prueba, respectivamente, sino que se realizaron diferentes ejecuciones. Así, se diseñó una matriz con los 96 datos y se llevó a cabo un muestreo uniforme aleatorio obteniéndose 10 particiones, cada una de las cuales contaba con 80 muestras de entrenamiento y 16 muestras de prueba distintas; esto se realizó así para que los resultados fuesen significativos desde un punto de vista estadístico.

Se realizaron 100 entrenamientos de cada red, 10 con cada una de las particiones del conjunto de datos, durante un máximo de 3000 iteraciones, obteniéndose los resultados que se muestran en las Tablas VII-51 a VII-60. Es importante señalar que los tiempos

empleados requeridos para el entrenamiento de la red fueron muy pequeños: del orden de 6 segundos en un ordenador con un procesador Pentium III a 866 MHz.

Tabla VII-51. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-2-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.2724	0.2835
2	0.2651	0.2951
3	0.2819	0.3013
4	0.2969	0.3009
5	0.2792	0.2896
6	0.2718	0.2915
7	0.2561	0.2718
8	0.2948	0.2978
9	0.2562	0.2865
10	0.2897	0.2906
Media	0.2764	0.2909
DER (%)	5.1	2.9

Tabla VII-52. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-3-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.2169	0.2370
2	0.2416	0.2751
3	0.2411	0.2449
4	0.2310	0.2473
5	0.2685	0.2791
6	0.2153	0.2321
7	0.2491	0.2761
8	0.2353	0.2448
9	0.2608	0.2841
10	0.2675	0.2838
Media	0.2427	0.2604
DER (%)	7.4	7.6

Tabla VII-53. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-4-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.1984	0.2086
2	0.2107	0.2276
3	0.2247	0.2398
4	0.2146	0.2318
5	0.1885	0.2127
6	0.2031	0.2163
7	0.2087	0.2305
8	0.2317	0.2481
9	0.1988	0.2266
10	0.2434	0.2598
Media	0.2123	0.2302
DER (%)	7.5	6.6

Tabla VII-54. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-6-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.1449	0.1686
2	0.1563	0.1793
3	0.1387	0.1642
4	0.1420	0.1620
5	0.1544	0.1766
6	0.1491	0.1743
7	0.1544	0.1753
8	0.1500	0.1731
9	0.1509	0.1654
10	0.1203	0.1429
Media	0.1461	0.1682
DER (%)	7.0	6.0

Tabla VII-55. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-8-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.04698	0.07479
2	0.04363	0.08755
3	0.04634	0.07168
4	0.04318	0.07698
5	0.05265	0.08192
6	0.05057	0.07040
7	0.05227	0.07631
8	0.06145	0.07455
9	0.05049	0.08025
10	0.03647	0.08198
Media	0.04840	0.07764
DER (%)	13.2	6.4

Tabla VII-56. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-10-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.0595	0.0957
2	0.0673	0.1026
3	0.0708	0.0973
4	0.0565	0.0846
5	0.0476	0.0811
6	0.0902	0.1234
7	0.0607	0.0922
8	0.0689	0.1049
9	0.0726	0.1081
10	0.0603	0.0903
Media	0.0654	0.0980
DER (%)	16.7	12.0

Tabla VII-57. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-12-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.0614	0.1020
2	0.0581	0.1000
3	0.0649	0.0969
4	0.0570	0.0909
5	0.0616	0.0968
6	0.0454	0.0883
7	0.0441	0.0833
8	0.0436	0.0793
9	0.0453	0.0825
10	0.0497	0.0889
Media	0.0531	0.0909
DER (%)	14.9	8.2

Tabla VII-58. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-14-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.0488	0.0854
2	0.0556	0.0932
3	0.0432	0.0863
4	0.0432	0.0807
5	0.0423	0.0818
6	0.0448	0.0854
7	0.0495	0.0868
8	0.0448	0.0841
9	0.0437	0.0796
10	0.0505	0.0886
Media	0.0466	0.0852
DER (%)	8.7	4.4

Tabla VII-59. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-16-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.0416	0.0812
2	0.0412	0.0805
3	0.0426	0.0790
4	0.0424	0.0883
5	0.0424	0.0889
6	0.0407	0.0812
7	0.0431	0.0828
8	0.0411	0.0811
9	0.0473	0.0853
10	0.0419	0.0940
Media	0.0424	0.0842
DER (%)	4.2	5.4

Tabla VII-60. Error cometido en el aprendizaje de la red de topología 7-20-4

Partición	Error en las muestras de entrenamiento	Error en las muestra de prueba
1	0.0397	0.0857
2	0.0404	0.0836
3	0.0389	0.0861
4	0.0398	0.0784
5	0.0388	0.0846
6	0.0394	0.0841
7	0.0389	0.0856
8	0.0395	0.0820
9	0.0384	0.0827
10	0.0404	0.0824
Media	0.0394	0.0835
DER (%)	1.6	2.6

donde la medida del error usada es la raíz del Error Cuadrático Medio (*ECM*). El *ECM* se define como:

$$ECM = \frac{1}{4n} \sum_{p \in \text{ejemplos}} \sum_{j \in \text{salidas}} (c_{pj} - o_{pj})^2$$

donde c_{pj} es la concentración del analito j -ésimo para el dato p -ésimo y o_{pj} es la salida calculada por la red para dicha aproximación, n es el número de ejemplos y 4 el número de salidas.

Por tanto, y a la vista de los resultados experimentales obtenidos se seleccionó la topología 7-8-4 para la resolución del problema analítico (véase Figura VII-37).

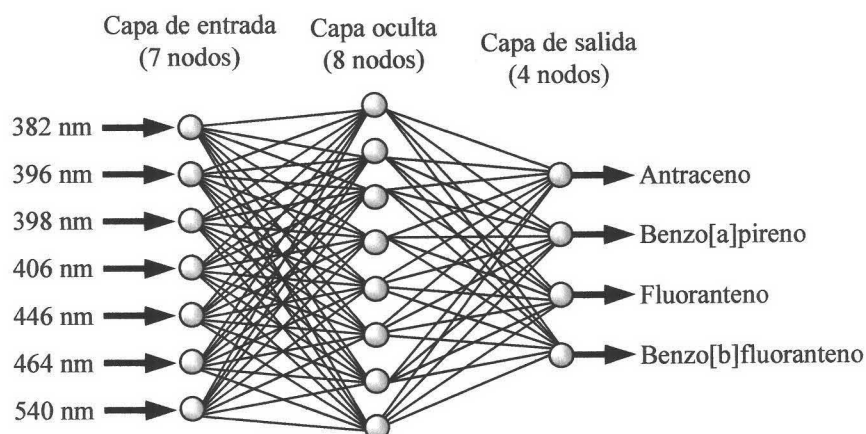


Figura VII-37. Red neuronal multicapa 7-8-4.

3.4 Generalización de la red neuronal

Para conocer la verdadera versatilidad del optosensor propuesto se evaluó la capacidad de generalización de la red neuronal propuesta. Para ello se analizaron las mismas muestra de agua que se habían analizado con los dos optosensores previamente desarrollado.

Hacer notar, que una vez entrenada la red neuronal, el tiempo de aplicación (cálculo del valor para una entrada nueva) es inapreciable (menor de 1 segundo).

3.4.1 Estudios de recuperación

Para comprobar la exactitud del método propuesto se ha realizado un estudio de recuperación. Dicho estudio se llevó a cabo para distintas mezclas aleatorias de los cuatro HAPs en estudio, siempre con valores que están dentro del intervalo lineal del método propuesto.

El procedimiento operatorio seguido fue: se tomaron 2 muestras diferentes de agua (agua superficial de consumo humano y agua subterránea de un manantial) se enriquecieron a distintos niveles de concentración de los analitos en estudio (véase Tablas VII-61 y VII-62). Se tomó la cantidad adecuada de disolución reguladora de $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ a pH 7 para que tuviese una concentración de 15 mM y la cantidad adecuada de 1,4-dioxano para que estuviese presente en un 25% y se enrasó con las muestra de agua a analizar.

Se realizaron 3 réplicas para cada una de las muestra analizadas a cada nivel de concentración siguiendo el procedimiento operatorio previamente establecido. Los resultados obtenidos se muestran en las Tablas VII-61 y VII-62.

Se podría concluir de estos resultados que el optosensor propuesto puede usarse de forma simple para la resolución de mezclas de ANT, BaP, FLT y BbF en muestras de agua. Además el uso de redes neuronales para el tratamiento de señales ha transformado a un optosensor monoparamétrico en otro que posee las propiedades de los multiparamétricos pero que sin embargo, posee instrumentación más barata y sencilla de automatizar y miniaturizar.

Tabla VII-61. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua superficial de consumo humano

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
A11	-	100	-	-	-12.5	105.3	-22.5	-3.5	-	105.3	-	-
A12	-	100	-	-	11.3	95.5	-1.5	-3.5	-	95.5	-	-
A13	-	100	-	-	-15.1	106.2	10.4	6.2	-	106.2	-	-
Media	-	100	-	-	-5.4	102.3	-4.5	-0.3	-	102.3	-	-
D.E.R.					14.5	5.9	16.7	5.6	-	5.9	-	-
A21	75	75	75	-	69.2	77.8	80.2	-2.5	92.3	103.7	106.9	-
A22	75	75	75	-	67.3	80.5	69.2	11.2	89.7	107.3	92.3	-
A23	75	75	75	-	77.9	70.8	70.2	5.5	103.9	94.4	93.6	-
Media	75	75	75	-	71.5	76.4	73.2	4.7	95.3	101.8	97.6	-
D.E.R.					5.7	5.0	6.1	6.9	7.5	6.7	8.1	-
A31	50	50	100	50	49.8	51.5	98.3	45.5	99.6	103.0	98.3	91.0
A32	50	50	100	50	61.0	60.8	104.5	45.8	122.0	121.6	104.5	91.6
A33	50	50	100	50	55.8	49.2	92.5	49.8	111.6	98.4	92.5	99.6
Media	50	50	100	50	55.5	53.8	98.4	47.0	111.1	107.7	98.4	94.1
D.E.R.					5.6	6.1	6.0	2.4	11.2	12.3	6.0	4.8

Tabla VII-62. Datos de réplicas en aplicación para las muestra de agua subterránea de manantial

	Valor añadido (ng/mL)				Valor encontrado (ng/mL)				% Recuperación			
	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF	ANT	BaP	FLT	BbF
B11	75	75	-	-	81.2	68.5	-22.5	-3.5	108.3	91.3	-	-
B12	75	75	-	-	79.1	77.8	-1.5	-3.5	105.5	103.7	-	-
B13	75	75	-	-	69.5	73.4	10.4	6.2	92.7	97.9	-	-
Media	75	75	-	-	76.6	73.2	-4.5	-0.3	102.1	97.6	-	-
D.E.R.					6.2	4.7	16.7	5.6	8.3	6.2	-	-
B21	-	75	100	75	-2.3	65.0	99.2	77.6	-	86.7	99.2	103.5
B22	-	75	100	75	-16.5	70.5	99.2	71.8	-	94.0	99.2	95.7
B23	-	75	100	75	2.0	75.8	105.7	69.7	-	101.1	105.7	92.9
Media	-	75	100	75	-5.6	70.4	101.4	73.0	-	93.9	101.4	97.4
D.E.R.					9.7	5.4	3.8	4.1	-	7.2	3.8	5.5
B31	100	25	75	75	99.8	26.8	78.3	75.7	99.8	107.2	104.4	100.9
B32	100	25	75	75	111.0	22.8	74.5	65.9	111.0	91.2	99.3	87.9
B33	100	25	75	75	105.8	28.5	62.5	69.4	105.8	114.0	83.3	92.5
Media	100	25	75	75	105.5	26.0	71.8	70.3	105.5	104.1	95.7	93.8
D.E.R.					5.6	2.9	8.2	5.0	5.6	11.7	11.0	6.6

4 Comparación de los sensores para el screening de antraceno, benzo[a]pireno, fluoranteno y benzo[b]fluoranteno propuestos

Como se puede deducir, los tres optosensores propuestos difieren principalmente en la naturaleza del transductor, pues usan la misma fase sensora y las mismas condiciones experimentales del sistema FIA. Además, el bloque instrumental para la excitación es bastante similar, por lo que, las diferencias que puedan aparecer entre ambos se debe a los distintos sistemas de detección utilizados, que en un caso es un fotomultiplicador (PMT), en el otro una ICCD y en el tercero es un fotomultiplicador y redes neuronales (PMT-ANN).

La comparación entre las prestaciones de los tres sistemas se realizará en términos de: capacidad de llevar a cabo la simultaneidad de las medidas, límites de detección, precio, portabilidad, tiempo de respuesta y aplicaciones prácticas..

4.1 Simultaneidad de las medidas

Debido a las características intrínsecas de cada sistema de detección usado es imposible llevar a cabo una medida simultánea de los cuatro puntos seleccionados, para la resolución de los HAPs, cuando se usa como sistema de detección un fotomultiplicador (PMT). Sin embargo, la ICCD y el PMT-ANN sí nos dan la posibilidad de calcular la concentración de forma simultánea y rápida de cada uno de los analitos estudiados, con una sola inyección de mezcla problema.

Por tanto, y en virtud de la simultaneidad de las medidas el mejor sensor es el que usa como sistema de detección una ICCD o un fotomultiplicador con redes neuronales para el tratamiento de las señales.

4.2 Límites de detección

En la Tabla VII-63 se pueden analizar los límites de detección de los métodos propuestos para la resolución de los cuatro analitos usando ambos sistemas de detección.

Tabla VII-63. Comparativa de los límites de detección en función del sistema de detección usado

Zona de medida	L. D. (ng/mL)	
	PMT	ICCD
1	17.4	12.7
2	7.8	16.5
3	11.9	21.5
4	7.4	17.1

Se puede deducir de esta tabla, que los límites de detección cuando se usa un PMT como sistema de detección son menores que cuando se usa una ICCD, aunque no hay mucha diferencia entre ellos.

Por tanto, y en virtud del límite de detección el mejor optosensor es el que usa como sistema de detección un PMT.

4.3 Precio

Hoy día, los espectrógrafos equipados con una ICCD son más caros que los espectrofluorímetros convencionales que van equipados con un fotomultiplicador. Y a su vez, la implementación de las redes neuronales para el tratamiento de las señales obtenidas de un fotomultiplicador encarece el precio con respecto al que usa sólo un PMT, pero nunca igualando ni superando el de la ICCD.

Por tanto, y en virtud del precio el mejor optosensor es el que usa como sistema de detección un PMT.

4.4 Portabilidad y miniaturización

Sin lugar a duda, debido a la sencillez de la instrumentación utilizada, es mucho más fácil de miniaturizar y, por tanto, transformar en portátil, el optosensor que usa un PMT como sistema de detección. En el caso de usar una CCD, ésta tiene que ser intensificada y

además refrigerada bien con nitrógeno líquido, lo que dificulta su portabilidad, o bien con un dispositivo Peltier, lo que encarece su miniaturización.

En referencia al sistema que usa un PMT con ANN no ofrece ningún problema añadido al de un PMT solo, pues en el mismo ordenador que controle el equipo portátil se puede usar para ejecutar la red neuronal.

Por tanto, y en virtud de la facilidad de miniaturizar y por tanto transformar en un instrumento portátil el mejor optosensor es el que usa como sistema de detección un PMT o PMT-ANN.

4.5 Tiempo de respuesta

Debido a la simultaneidad de las respuestas de la ICCD y el PMT-ANN, el tiempo de respuesta de estos es mucho menor que el que usa sólo un PMT.

El optosensor 1 (que usa un fotomultiplicador como sistema de detección) necesita 50 s para cada una de las especies, por lo que usa un tiempo total de 200 s. Sin embargo, los optosensores 2 y 3 (que usan una ICCD o PMT-ANN, respectivamente) pueden darnos la misma información en sólo 50s.

Por tanto, y en virtud del tiempo de respuesta el mejor optosensor es el que usa como sistema de detección ICCD o PMT-ANN.

4.6 Aplicaciones prácticas

Según se puede deducir de las aplicaciones, los tres sensores presentan buenos porcentajes de recuperación (cercanos al 100%), aunque si se analiza la D.E.R. de las medidas se puede observar que en el caso en el que se usa un PMT como sistema de detección, los errores cometidos es las medidas son mucho menores que cuando se usa una ICCD o ANNs.

Los errores elevados, cuando se usa una ICCD, se pueden deber a multitud de factores; en primer lugar, a que se usa una celda de flujo “casera”, por lo que optimizando ésta, la posición de la fase sensora en la celda y el enfoque de los haces de fibras ópticas sobre la fase sensora se podrían disminuir los errores cometidos en las medidas, y en segundo lugar, se ha de señalar que las fibras ópticas que se usaron se atacaban con la

disolución regenerante y aunque se intentó mantenerlas pulidas, cuando se llevó a cabo la aplicación del optosensor ya estaban bastante dañadas. Por lo que una optimización del tipo de fibras a usar o el estudio/desarrollo de una película transparente a las longitudes de onda de medida para proteger el extremo de las fibras ópticas disminuiría el error del sensor que usa como sistema de detección una ICCD.

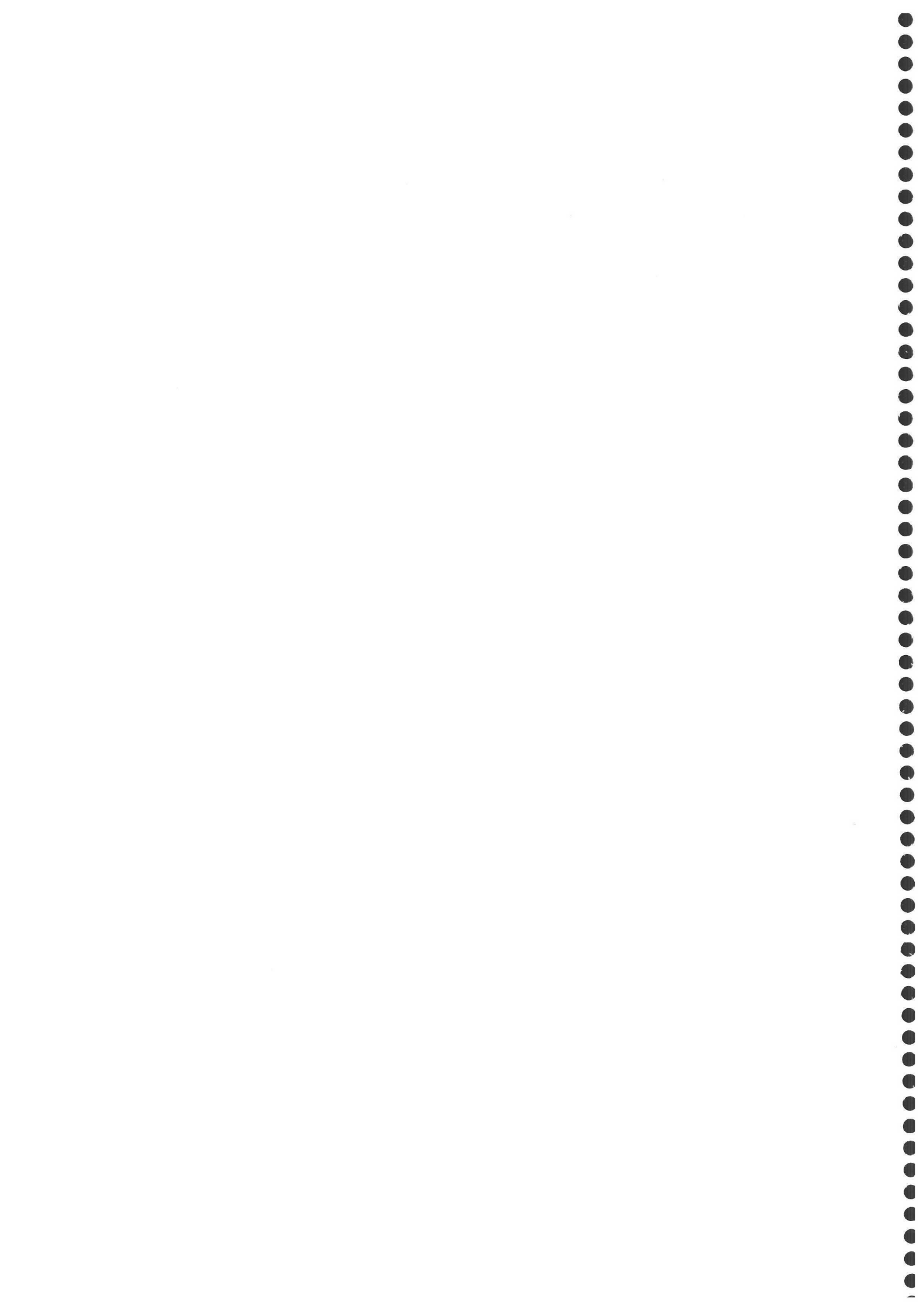
Los errores cometidos por el optosensor que usa como transductor un PHT con tratamiento de datos con ANNs, se pueden deber a que son necesarias más muestras de entrenamiento para un mejor aprendizaje de la red neuronal, además también se puede deber a que se han usado factores de conversión para la normalización de los espectros obtenidos con el optosensor usando para ello la media de tres muestras de corrección, y también se puede deber a la transmisión de errores en el tratamiento matemático-informático que se llevó a cabo con los datos experimentales tanto antes de introducirlos en la red neuronal como una vez conseguidas las salidas de ésta. Todo ello, se puede solucionar preparando más muestras de entrenamiento que aporten más información a la red neuronal, utilizándose más muestras de normalización de los espectros y simplificando los tratamientos matemáticos de los datos experimentales. Además, todos estos problemas se podrían también solucionar usando otros algoritmos de aprendizaje y otras redes neuronales más potentes y que incorporen en su estructura y funcionamiento información del experto como son las redes neuronales difusas.

Por tanto, y en virtud de la aplicabilidad a muestras reales y su menor el mejor sensor es el que usa como sistema de detección un PHT

4.7 Conclusiones experimentales

Por todo lo anteriormente comentado, el sensor propuesto que usa como sistema de detección un PMT presenta menores límites de detección, es más barato, más fácil de miniaturizar y es más preciso que el sensor que usa como sistema de detección una ICCD. Todas estas ventajas de los PMTs frente a las CCDs son simplemente debidas a su mayor expansión y uso en los equipos comerciales y se pueden solventar optimizando las celdas de flujo y fibras ópticas usadas. Sin embargo, la CCD presenta una ventaja frente al PMT que es imposible solventar para estos, como es la posibilidad de la simultaneidad de las medidas.

El dispositivo que usa como transductor un PMT-ANN presenta las mismas ventajas que el que usa sólo el PMT, a excepción de las aplicaciones prácticas, por lo que presenta menores límites de detección, es más barato y más fácil de miniaturizar que el sensor que usa como sistema de detección una ICCD, aunque es menos preciso, y posee la principal ventaja del optosensor que usa una ICCD, ya que es capaz de llevar a cabo medida simultánea de los cuatro HAPs con una sola medida instrumental.





CONCLUSIONES



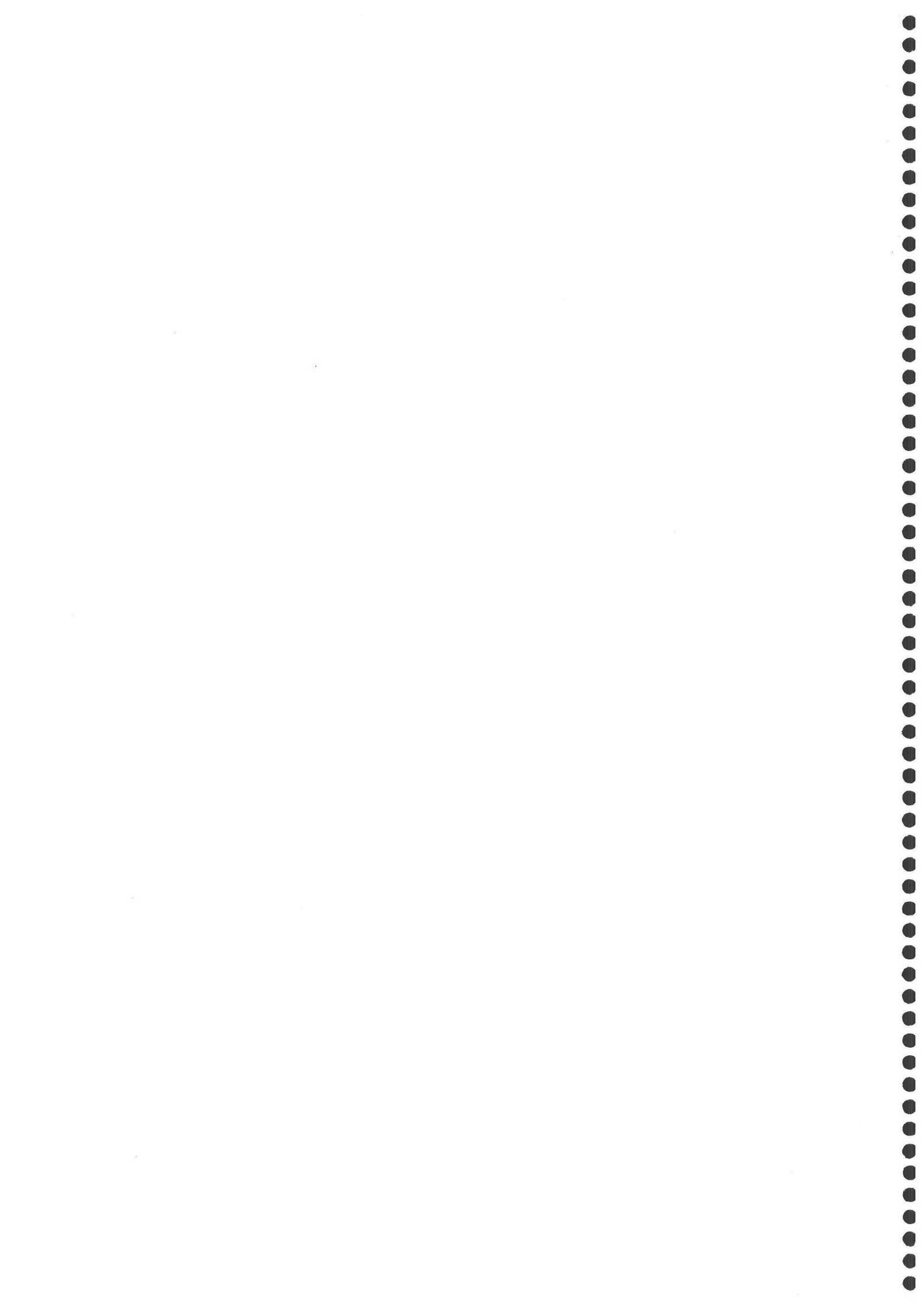
CONCLUSIONES

Las principales conclusiones derivadas de la investigación descrita en la presente Memoria se pueden resumir en los siguientes puntos:

1. Para demostrar la utilidad de los optosensores convencionales en el control de procesos industriales farmacológicos y en los análisis clínicos, se han desarrollado tres optosensores para la determinación de tres principios activos en diferentes preparados farmacéuticos y orina humana y se han implementado las fases sensoras en instrumentos portátiles demostrando, que el desarrollo de optosensores convencionales es imprescindible, como paso previo, al diseño de un optrodo:
 - 1.a Se ha desarrollado un optosensor fluorescente para la determinación de nafronil basado en la interacción de éste con la fase sensora Gel de Sílica Davisil a pH 5 (fijado con una disolución reguladora HAc/NaAc 5 mM), obteniendo un intervalo dinámico lineal de 3.9 a 700 ng/mL, un límite de detección de 3.9 ng/mL y un límite de cuantificación de 13.0 ng/mL. Este optosensor ha sido aplicado satisfactoriamente (102.7% de porcentaje de recuperación con una desviación estándar relativa del 2.3%) a la determinación de nafronil en el único preparado farmacéutico comercializado en España que lo contiene como principio activo: Praxilene 100 mg.
 - 1.b Un optosensor para la determinación de naproxeno basado en la interacción del analito en estudio con la fase sensora Amberlita XAD 7 a pH 2.5 (fijado con una disolución reguladora glicina/HCl 15 mM), obteniendo un intervalo dinámico lineal de 1.5 a 200.0 ng/mL, un límite de detección de 1.5 ng/mL y un límite de cuantificación de 5.0 ng/mL y fue aplicado a la determinación de naproxeno en los preparados farmacéuticos Naprosyn 500 y Antalgin 550, obteniendo porcentaje de recuperación del 99.5 y 100.9% con una desviación estándar relativa del 3.3 y 3.6%, respectivamente y a la determinación de naproxeno en muestras de orina, analizándose la cantidad de naproxeno que se excretaba vía urinaria al cabo de las 24 horas de la ingesta de un comprimido de Antalgin 550, corroborándose mediante el método de adición de patrón que los datos obtenidos por el optosensor son exactos.

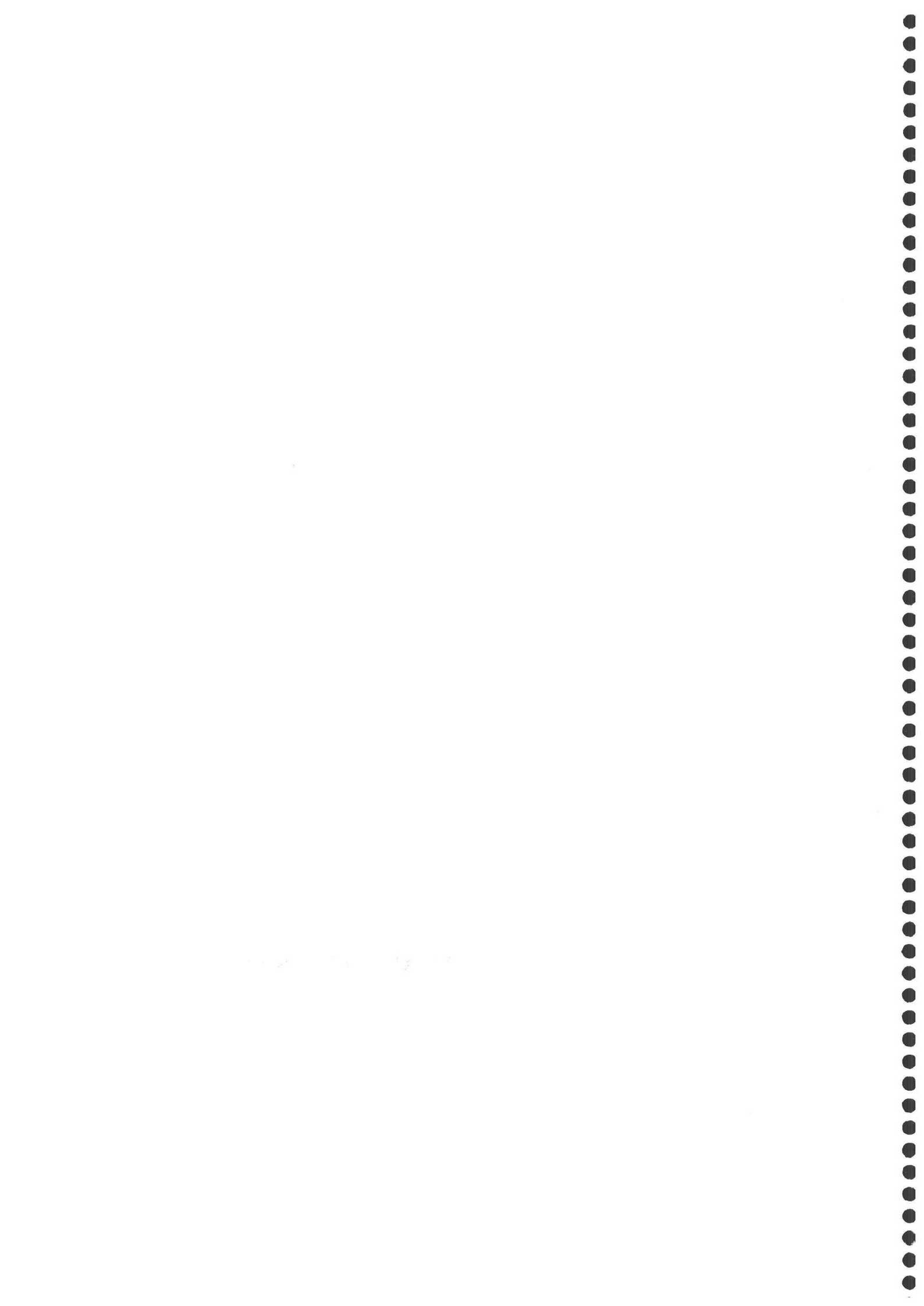
- 1.c Un optosensor para la determinación de propranolol, en este caso, basado en la interacción del propranolol con la fase sensora Amberlita XAD 7 a pH 6.0 (fijado con una disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 5 mM), obteniendo un intervalo dinámico lineal de 1.3 a 250 ng/mL, un límite de detección de 1.3 ng/mL y un límite de cuantificación de 4.3 ng/mL. Este optosensor se ha aplicado a la determinación de propranolol en Sumial 10, obteniendo un porcentaje de recuperación del 98.7 % con una desviación estándar relativa de 1.5%, y, a partir de él, se ha desarrollado un test de dopaje para el control de propranolol en orina de deportistas con unas excelentes características analíticas (intervalo dinámico lineal 0.2-100 ng/mL, límite de detección 0.2 ng/mL y límite de cuantificación 0.7 ng/mL) capaz de detectar la presencia de propranolol en orina 24 horas después de la ingesta de medio comprimido de Sumial 10, apareciendo una alternativa selectiva, rápida y de bajo costo para el control del agente dopante propranolol frente al método utilizado en la actualidad, GC-MS.
 - 1.d Y, por último, se han desarrollado un optosensor de fibra óptica, implementando las fases activas previamente evaluadas, para la determinación de principios activos en muestras de orina, demostrándose la importancia que tiene el desarrollo de optosensores convencionales para la caracterización de fases activas que, posteriormente, pueden ser implementadas en dispositivos portátiles con buenas prestaciones analíticas.
2. Para demostrar la utilidad de los optosensores en el control ambiental de analitos altamente contaminantes (Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos) se ha realizado un estudio de las características fluorescentes a temperatura ambiente y en superficie sólida de los dieciséis hidrocarburos aromáticos policíclicos seleccionados por la EPA, como los más representativos y contaminantes, incluyendo el establecimiento del tipo de soporte sólido con el que interaccionan, los máximos de excitación y emisión fluorescentes, la influencia de la interacción con el pH, así como el tipo y porcentaje de disolvente orgánico que es necesario adicionar a las muestras para asegurar la solubilización de los analitos e impedir que queden retenidos en las conducciones de los sistemas de flujo, concluyendo qué fases sensoras se pueden usar en el desarrollo de sensores mono o multiparamétricos en el análisis de HAPs. Esto ha dado lugar a:

- 2.a Un optosensor selectivo para la determinación de benzo[a]pireno en muestras de aguas de consumo humano, basado en la interacción selectiva de éste (según demuestra el estudio de interferentes tanto de naturaleza inorgánica como orgánica llevado a cabo) con la fase sensora Amberlita XAD 4 a pH 7.0 (fijado con una disolución reguladora $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ 15 mM), obteniendo un dispositivo que cumple la normativa actual de la Unión Europea (intervalo dinámico lineal de 3.0 a 250 ng/L, límite de detección de 3 ng/L y límite de cuantificación de 10 ng/L) sin la necesidad de llevar a cabo ningún proceso de preconcentración previo al análisis, siendo aplicado satisfactoriamente (porcentajes de recuperación cercanos al 100% con desviaciones estándares adecuados) al análisis de diferentes cantidades de BaP (10 ng/mL y 150 ng/mL) en seis muestras de aguas obtenidas de la red de abastecimiento de diferentes localidades de la provincia de Granada.
- 2.b Tres optosensores, que difieren en el sistema de transducción de la señal analítica, para la determinación conjunta de una mezcla de cuatro HAPs (Antraceno, Benzo[a]pireno, Benzo[b]fluoranteno y Fluoranteno) en muestras de agua, evaluándose sus características y llevando a cabo un análisis comparativo como primera etapa para la obtención de un dispositivo pequeño y portátil para el control ambiental de HAPs en ríos y acuíferos. El primero usa como transductor un fotomultiplicador, consiguiendo la resolución de los cuatro HAPs tras la inyección de una muestra por cuadruplicado y la resolución de un sistema de cuatro ecuaciones con cuatro incógnitas; el segundo, para solventar los problemas de simultaneidad del primer optosensor propuesto, emplea un dispositivo de acoplamiento de carga (CCD), siendo capaz de resolver una mezcla de los 4 HAPs evaluados con una sola medida; y el tercero, para disminuir el costo y simplificar el diseño instrumental, emplea como sistema de transducción un fotomultiplicador y redes neuronales para el tratamiento de las señales, resolviendo de forma sencilla, rápida (una sola inyección) y barata las mismas muestras de agua analizadas por los dos optosensores previos de forma exacta y precisa.





ABREVIATURAS



ABREVIATURAS

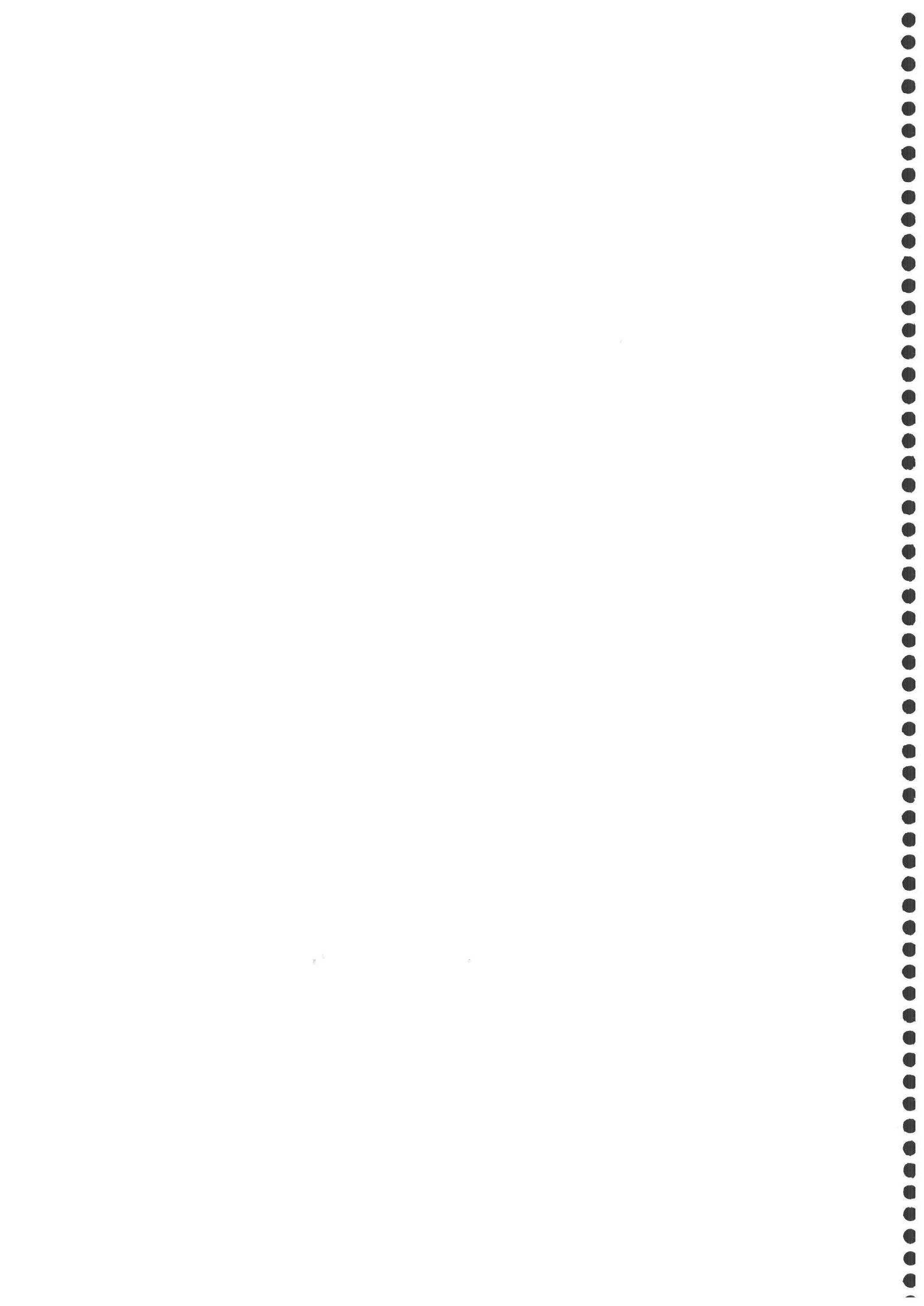
a	Ordenada en el origen de la recta de calibrado
ACE	Acenafteno
ACEN	Acenaftileno
ANN	Redes neuronales (Artificial Neural Network)
ANT	Antraceno
b	Pendiente de la recta de calibrado
BaA	Benzo[a]antraceno
BaP	Benzo[a]pireno
BbF	Benzo[b]fluoranteno
BghiP	Benzo[g,h,i]perileno
BkF	Benzo[k]fluoranteno
c	Concentración
\bar{c}	Media aritmética de los valores de concentración
CCD	Detector de acoplamiento de carga (Charge Coupled Device)
CD-RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente en ciclodextrinas (Cyclodextrins Room Temperature Phosphorescence)
CHRY	Criseno
c_i	Valores de concentración
DBahA	Dibenzo[a,h]antraceno
$\Delta\lambda$	Incremento de longitud de onda
DER	Desviación estándar relativa
DL ₅₀	Dosis letal para el 50% de la población animal
DMF	N,N-Dimetilformamida
ECM	Error cuadrático medio
EPA	Agencia de protección medioambiental americana (Environmental Protection Agency)
E_r	Error relativo medio
FIA	Análisis por inyección en flujo (Flow Injection Analysis)

FLT	Fluoranteno
FLU	Fluoreno
GC	Cromatografía de gases (Gas Chromatography)
HAc	Ácido acético
HAI-RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente inducida por átomos pesados (Heavy-Atom Induced Room Temperature Phosphorescence)
HAP	Hidrocarburo aromático policíclico
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (High Performance Liquid Chromatography)
ICCD	Detector de acoplamiento de carga intensificado (Intensified Charge Coupled Device)
IcdP	Indeno[1,2,3-c,d]pireno
IRF	Intensidad relativa de fluorescencia
IUPAC	Unión Internacional de la Química Pura y Aplicada (International Union of Pure and Applied Chemistry)
λ	Longitud de onda
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
λ_{exc}	Longitud de onda de excitación
LC	Límite de cuantificación
LD	Límite de detección
m	Número de repeticiones de un análisis
ME-RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente en microemulsiones (Microemulsion Room Temperature Phosphorescence)
MS-RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente en medio micelar (Micellar Solution Room Temperature Phosphorescence)
n	Número de réplicas
NaAc	Acetato sódico
NAP	Naproxeno
NAPH	Naftaleno
NFL	Nafronil
OMS	Organización Mundial de la salud
PHE	Fenantreno

PHT	Fotomultiplicador
PYR	Pireno
R	Señal analítica
r	Coefficiente de correlación
r^2	Coefficiente de correlación
RTP	Fosforescencia a temperatura ambiente (Room Temperature Phosphorescence)
s	Desviación estándar
s_0	Desviación estándar del blanco
s_a	Desviación estándar de la ordenada en el origen de la recta de calibrado
s_b	Desviación estándar de la pendiente de la recta de calibrado
s_p	Desviación estándar promedio
$s_{R,c}$	Desviación estándar de la recta
t	t de student tabulada
t_{cal}	t calculada
t_{tab}	t de student tabulada
UE	Unión Europea
V	Voltios
v/v	En volumen



PUBLICACIONES DERIVADAS



PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA MEMORIA

Los resultados experimentales obtenidos en esta Memoria ha dado lugar a 6 artículos y 10 comunicaciones a congresos.

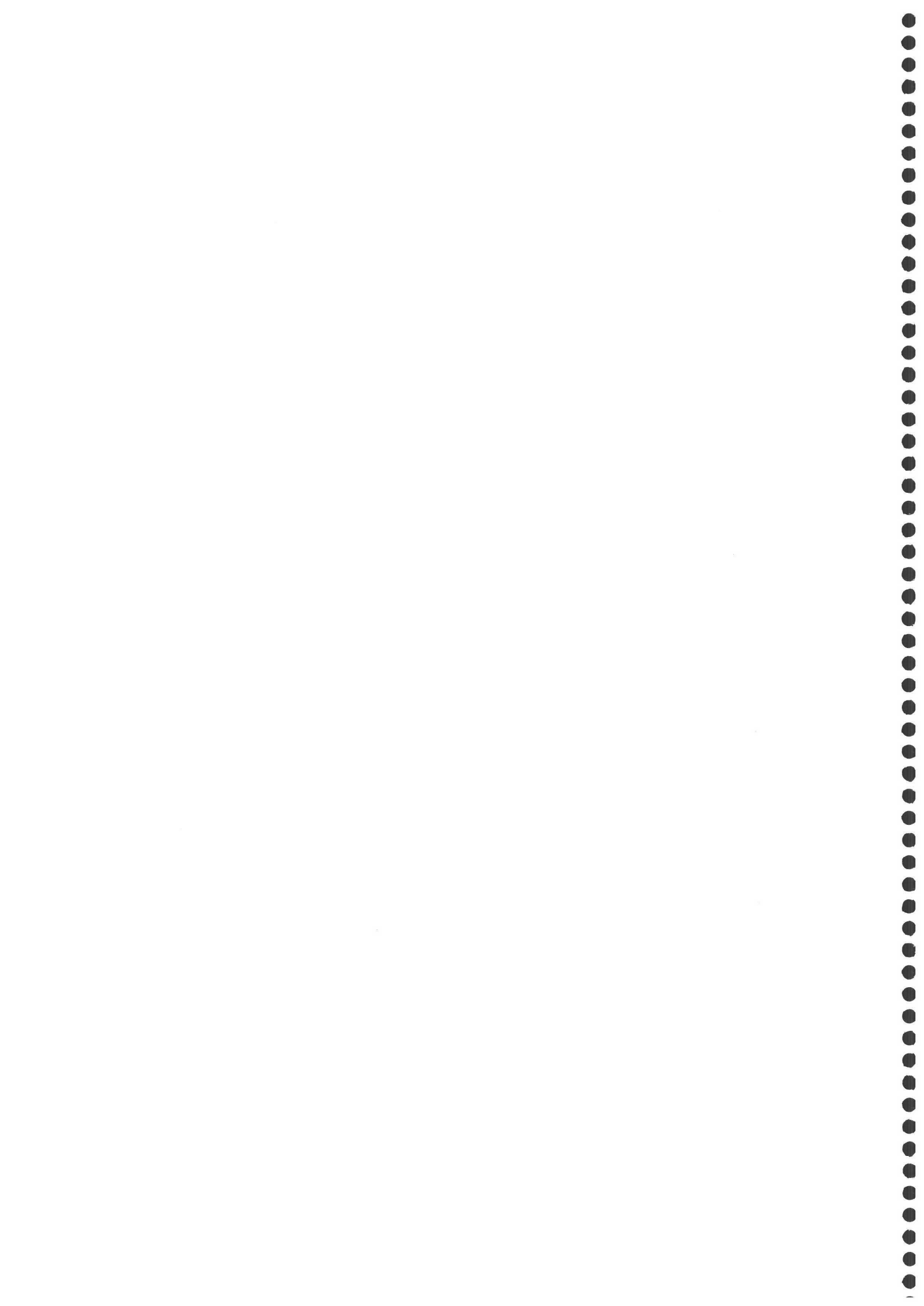
Artículos publicados en revistas científicas:

- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Room-temperature luminescence optosensings based on immobilized principles actives: application to nafronyl and naproxen in pharmaceutical preparations and biological fluids”. *Anal. Chim. Acta*, 462 (2002) 217-224
- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “A sensitive fluorescence optosensor for analysing propranolol in pharmaceutical preparations and a test for its control in urine in sport”. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, en prensa.
- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples”. *Talanta*, en prensa.
- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Very selective and highly sensitive solid-surface fluorescence optosensor for benzo[a]pyrene in drinking water”. Enviado a *The Analyst*.
- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, J.M. Benítez Sánchez, C. Cruces Blanco, R. Pereiro, A. Sanz Medel y A. Fernández Gutiérrez. “Development and critical comparison of three fluorescence optosensors with different transducer and artificial neural networks for screening of polycyclic aromatic hydrocarbons”. Enviado a *Analytical Chemistry*.
- **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, J.M. Costa-Fernández, C. Cruces Blanco, R. Pereiro, A. Sanz Medel y A. Fernández-Gutiérrez. “Portable fiber optic instrumentation for on-line control of naproxen and propranolol in clinical samples”. En redacción.

Comunicaciones presentadas a congresos:

- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, D.N.M. Garrido-García, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Fluorescence optosensing method for on-line nafronyl determination in pharmaceutical preparation”. P-41 presentado en el *Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications IMA 2001* celebrado en Ioannina (Grecia) del 5 al 9 de Septiembre de 2001.
- ☛ D.N.M. Garrido-García, **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “A flow-through fluorescence optical sensor for naproxen in pharmaceutical preparations and biological fluids”. CARTEL P-42 presentado en el *Instrumental Methods of Analysis Modern Trends and Applications IMA 2001* celebrado en Ioannina (Grecia) del 5 al 9 de Septiembre de 2001.
- ☛ J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, A. Sanz Medel, **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Portable fiber optic instrumentation for on-line control of naproxen and propranolol in clinical samples”. CARTEL P67 presentado en el *Sixth European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors, EUROPT(R)ODE VI*, celebrado en Manchester (Reino Unido) del 7 al 11 de Abril de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons by solid surface fluorescence as the first step to develop a optical sensor for pah’s screening”. CARTEL F-65 presentado en el *Xth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Flowing Stream-Quality Assurance and Applied Analysis*, celebrado en Granada (España) del 4 al 7 de junio de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “A flow-through fluorescence optical sensor for benzo[a]pyrene in water samples”. CARTEL F-64 presentado en el *Xth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Flowing Stream-Quality Assurance and Applied Analysis*, celebrado en Granada (España) del 4 al 7 de junio de 2002.

- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, C. Cruces Blanco, A. Sanz Medel y A. Fernández Gutiérrez. “The development of new instrumentation using ICCD detection for the screening of polycyclic aromatic hydrocarbons by a flow-through fluorescence fiber-optic sensor”. CARTEL F-66 presentado en el *Xth International Symposium on Luminescence Spectrometry-Detection Techniques in Flowing Stream-Quality Assurance and Applied Analysis*, celebrado en Granada (España) del 4 al 7 de junio de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “A sensitive fluorescence optosensing method for on-line propranolol control in pharmaceutical preparations and sports’ urine”. CARTEL CS313PR presentado en el *9th International Meeting on Chemical Sensors*, celebrado en Boston (Estados Unidos) del 7 al 10 de julio de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Screening of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples by fluorescence sensor”. CARTEL CS312PR presentado en el *9th International Meeting on Chemical Sensors*, celebrado en Boston (Estados Unidos) del 7 al 10 de julio de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco y A. Fernández Gutiérrez. “Aplicación de optosensores luminiscentes en el análisis de principios activos en preparados farmacéuticos y muestras biológicas”. CARTEL 25-T presentado en la *VIII Reunión GRASECA 2002* celebrado en Granada (España) los días 26 y 27 de septiembre de 2002.
- ☛ **J.F. Fernández Sánchez**, A. Segura Carretero, J.M. Costa Fernández, R. Pereiro, C. Cruces Blanco, A. Sanz Medel y A. Fernández Gutiérrez. “Comparative study of two transducer systems to develop a sensor for screening of polycyclic aromatic hydrocarbons”. CARTEL PO-AME-52 presentado en las *9^{as} Jornadas de Análisis Instrumental*, celebrado en Barcelona (España) del 26 al 29 de noviembre de 2002.





ELSEVIER

Analytica Chimica Acta 462 (2002) 217–224

ANALYTICA
CHIMICA
ACTA

www.elsevier.com/locate/aca

Room-temperature luminescence optosensings based on immobilized active principles actives

Application to nafronyl and naproxen determination in pharmaceutical preparations and biological fluids

J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero*,
C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutiérrez

*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada,
C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain*

Received 27 November 2001; received in revised form 13 March 2002; accepted 22 April 2002

Abstract

This paper presents two easy and selective methods for determining the active principles nafronyl (NFL) and naproxen (NAP), using a flow-through fluorescence optosensor based on the on-line immobilization on a nonionic-exchanger (Silica Gel, Davisil™ and Amberlite XAD 7, respectively) solid support. The determination was performed in 5×10^{-3} M HAc/NaAc buffer solution at pH 5 for NFL and 15×10^{-3} M glycine/HCl buffer solution at pH 2.5 for NAP at a working temperature of 20 °C. The fluorescence intensities were measured at $\lambda_{\text{ex/em}} = 294/336$ nm and $\lambda_{\text{ex/em}} = 332/354$ nm for NFL and NAP, respectively. The response time for these optosensors were practically instant, obtaining a linear concentration range between 0 and 700.0 ng ml⁻¹ with a detection limit of 20.8 ng ml⁻¹, an analytical sensitivity of 10.1 ng ml⁻¹ and a standard deviation of 1.27% at a 500 ng ml⁻¹ concentration level for NFL and a linear concentration range between 0 and 200.0 ng ml⁻¹ with the detection limit of 13.3 ng ml⁻¹, an analytical sensitivity of 6.0 ng ml⁻¹ and a standard deviation of 3.52% at a 100 ng ml⁻¹ concentration level for NAP. The proposed methods were satisfactorily applied to real samples (three commercial formulations and urine samples). The effects of the possible interferences were evaluated in all cases. © 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Fluorescence optosensor; Nafronyl; Naproxen; Pharmaceutical preparations; Urine

1. Introduction

Nafronyl (NFL) [tetrahydro- β -(1-naphthalenyl-methyl)-2-furanpropionic acid 2-(diethylamino)ethyl ester] is a drug with vasodilating activity used for treatment of cerebral and peripheral vascular disor-

ders [1–3]. Unfortunately, this vasodilator agent can be consumed as a doping substance altering the outcome of sport competitions [4]. Few reports on the determination of NFL at therapeutic levels have been published [5–11].

Naproxen (NAP) [(+)-2-(6-methoxy-2-naphthyl)-propionic acid] is a non-steroidal anti-inflammatory drug with also analgesic and antipyretic properties. Different techniques [12–17] including fluorimetry [18] and phosphorimetry [19–21] have been used to

* Corresponding author. Tel.: +34-958-248-593;
fax: +34-958-249-510.
E-mail address: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero).

determine NAP in commercial formulation and/or biological fluids.

The extensive use of NAP or NFL formulations requires the development of highly sensitive and selective, accurate, simple, rapid and low cost methods which can be used in routine quality control.

With the movement towards automation in sample assays, more and more research for the determination of pharmaceutical preparations is being done with a continuous-flow system. This format is inherently easier leading to rapid results. Besides, the determination of NAP and NFL in urine samples by fluorimetry (both in batch and FIA modes) is usually not possible due to other substances which cause interferences as they emit light in the same spectral region. In order to solve this problem and automate the determination of these compounds, another alternative could be high resolution techniques prior to the fluorimetric determination such as HPLC or CE. These involve more sophisticated instrumentation and higher cost per analysis. Nevertheless, in some situations, these methods are difficult or impossible to apply mainly because of their expensive maintenance and/or operational complexity. To overcome these limitations, different types of sensors have been applied to the analysis of active principles in pharmaceuticals and human fluids using UV [22–25], amperometric [26], potentiometric [27], fluorescent [28,29], phosphorescent [30] and chemiluminescent [31] detection.

The analytical advantages of optical sensors were demonstrated during the last decade [32,33]. The combination of flow-injection analysis techniques with detection on optically active surfaces having an immobilised indicator packed in a flow-through cell, has been called “optosensing flow-injection analysis” [34] and has proved to offer important advantages because of its high sensitivity and selectivity, good precision, simplicity, speed and low cost.

We have developed two optosensors for a simple, selective analysis of the drugs nafrolyl and NAP in real samples (pharmaceutical preparations and human urine) without tedious preliminary procedures. They can compete very favorably with chromatographic methods in terms of cost and time spent on analysis, and can also compete with luminescence-batch methods for determining both analytes in human fluids.

2. Experimental

2.1. Reagents

Analytical reagent grade chemicals were used for the preparation of all the solutions. Sodium acetate and glycine were purchased from Sigma (Spain) and were used as received. A solution of 0.1 M HAc/NaAc buffer at pH 5.0 and 0.3 M for glycine/HCl at pH 2.5 were freshly prepared.

Aqueous $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ for NFL (Sigma) and NAP (Sigma) solutions were prepared.

The strongly basic anion-exchanger resins Dowex 1x2–100, Dowex 1x4–100 and Dowex 1x8–100 (Sigma), the strongly acid cation-exchanger resins Dowex 50wx2–100, Dowex 50wx4–100 and Dowex 50wx8–100 (Fluka), and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck (Sigma) were sieved and then tested at three-grain size (80–120, 120–160 and $>160 \mu\text{m}$).

The water used was distilled twice and prepared with a Mili-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Optosensing manifold

In a single-line-flow-injection system, a Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of $25 \mu\text{l}$ volume was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector (see Fig. 1). Two rotatory valves (Supelco 5020) were used for sample introduction and regenerating the active surface, respectively. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell. A Gilson Miniplus-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

All fluorescence measurements (relative fluorescence intensity, RFI) were carried out with an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrometer equipped with a continuous high power xenon lamp and a thermostat cell holder.

2.3. General procedure

For NFL, 2 ml of sample was injected through the valve A into a channel of 5×10^{-3} M HAc/NaAc buffer solution at pH 5 into the carrier stream. In this medium at a 1.5 ml min^{-1} flow-rate the NFL is retained in the

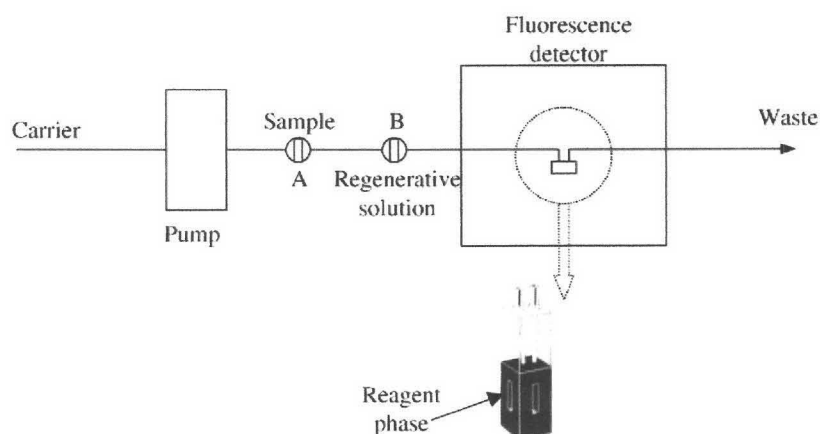


Fig. 1. Flow manifold used for fluorescence optosensor. (A) sample valve; (B) regenerative solution valve.

flow cell on Silica Gel Davisil. After fluorescent measurement ($\lambda_{\text{ex/em}} = 294/336$ nm, detector voltage of 650 V, slits of 4 nm for excitation and emission) 250 μl of regenerative solution (NaOH 0.5 M) was injected through valve B, to strip the analyte retained on the solid phase, before proceeding with the next sample.

For NAP, 2 ml of sample was injected through valve A into a channel of 15×10^{-3} M glycine/HCl buffer solution at pH 2.5 into the carrier stream. In this medium at a 2 ml min^{-1} flow-rate the NAP is retained in the flow cell on Amberlite XAD 7. After fluorescent measurement ($\lambda_{\text{ex/em}} = 332/354$ nm, detector voltage of 600 V, slits of 4 nm for excitation and emission) 250 μl of regenerative solution (acetonitrile/ H_2O 80% (v/v)) was injected through valve B, to strip the analyte retained on the solid phase, before proceeding with the next sample.

2.4. Procedure for the pharmaceutical preparations

Three different commercial products, bought at local chemists, were analyzed: Praxilene 100 mg (FAES, Bilbao, Spain), Naprosyn 500 mg (Roche, Madrid, Spain) and Antalgin 550 mg (Roche, Madrid, Spain) with a nominal content of 100 mg of NFL, 500 mg of NAP and 550 mg of NAP, respectively and also containing excipients without indication of their concentration. For the analysis of these preparations, the contents of five capsules of each were taken and the solids were powdered and homogenized. A portion was dissolved in doubly distilled water and

aliquots of these solutions were treated as indicated under general procedure.

2.5. Procedure for human urine samples

NAP (Antalgin 550 mg) was administrated to a volunteer (female). Urine was collected during 24 h after oral dosage intake (550 mg in capsule as single dose). The sample was vortex at 3800 rpm for 15 min and frozen until analytical preparation. For the analysis of the urine sample, aliquots of this sample was treated as indicated under general procedure.

3. Result and discussion

3.1. Selection of reagent phase and regenerative solution

The strongly basic anion-exchanger resins Dowex 1x2–100, Dowex 1x4–100 and Dowex 1x8–100, the strongly acid cation-exchanger resins Dowex 50Wx2–100, Dowex 50Wx4–100 and Dowex 50Wx8–100 and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck were studied. The best differences between noise and fluorescence signal were obtained using Silica Gel Davisil for NFL and Amberlite XAD 7 for NAP (see Table 1). Hence using these resins, different grain sizes were tested and improvements in

Table 1
Selection of reagent phase (2 ml of NFL, 500 ng ml⁻¹ or 2 ml of 100 ng ml⁻¹ NAP were injected in all cases)

Support	<i>I</i> ^a	
	NFL	NAP
Dowex 1x2–100	0.278	1.772
Dowex 1x4–100	0.029	1.836
Dowex 1x8–100	0.035	1.806
Dowex 50wx2–100	1.037	0.212
Dowex 50wx4–100	0.022	0.052
Dowex 50wx8–100	0.071	0.009
Silica Gel Davisil	2.010	0.006
Silica Gel Merck	0.586	0.129
Amberlite XAD 2	0.050	0.018
Amberlite XAD 4	0.017	0.002
Amberlite XAD 7	0.035	2.478

^a Differences between fluorescence signal and noise.

the analytical signal were observed with 80–120 μm mesh resin in both cases.

Finally, studies of optimum regenerative solution were carried out to transform the system in to a reusable one. The best regenerative solutions were NaOH 0.5 M for NFL and acetonitrile/water 80% v/v for NAP.

3.2. Fluorescence properties on solid surface

The fluorescence excitation and emission spectra of the NFL and NAP on the non-ionic resins were recordered and shown in Fig. 2. NFL on Silica Gel

Table 2
Instrumental parameters

	Optima values	
	NFL	NAP
Wavelength excitation/emission (nm)	294/336	332/354
Detector voltage (V)	650	600
Slits (excitation/emission) (nm)	4/4	4/4
Resolution (s)	5	5

Davisil emits fluorescence with a maximum excitation intensity at 294 nm and a maximum emission intensity at 336 nm. NAP on the Amberlite XAD 7 emits fluorescence with a maximum excitation intensity at 332 nm and a maximum emission intensity at 354 nm. Different instrumental parameters related to the luminescence technique affect the fluorescence intensity, so they have been carefully selected (see Table 2).

3.3. Influence of pH, type and concentration of buffer solution

The pH affects the dissociations of the different compounds and consequently, the retention on the different exchanger resins. Fig. 3 shows the effect of the pH on the fluorescence emission intensity and noise signals.

Different pHs ranging from 2.0 to 10.5 were studied with a solution of a fixed amount of NFL

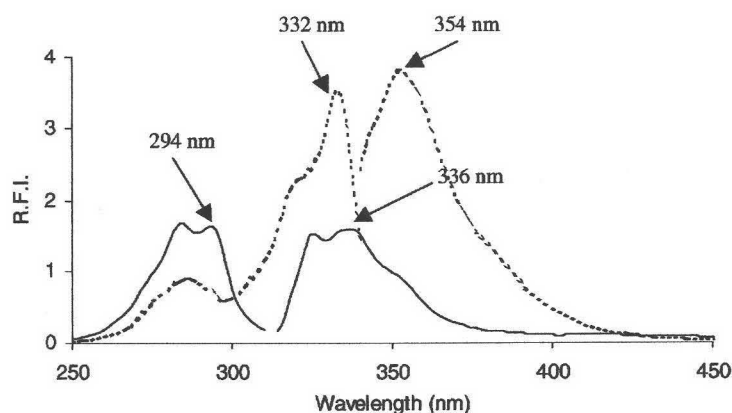


Fig. 2. Projected two-dimensional spectra of NFL (—) and NAP (---). [NFL] = 500 ng ml⁻¹, 5 × 10⁻³ M HAc/NaAc buffer solution at pH 5, voltage detector 650 V and slits_{ex/em} 4/4 nm. [NAP] = 100 ng ml⁻¹, 15 × 10⁻³ M glycine/HCl buffer solution at pH 2.5, voltage detector 600 V and slits_{ex/em} 4/4 nm.

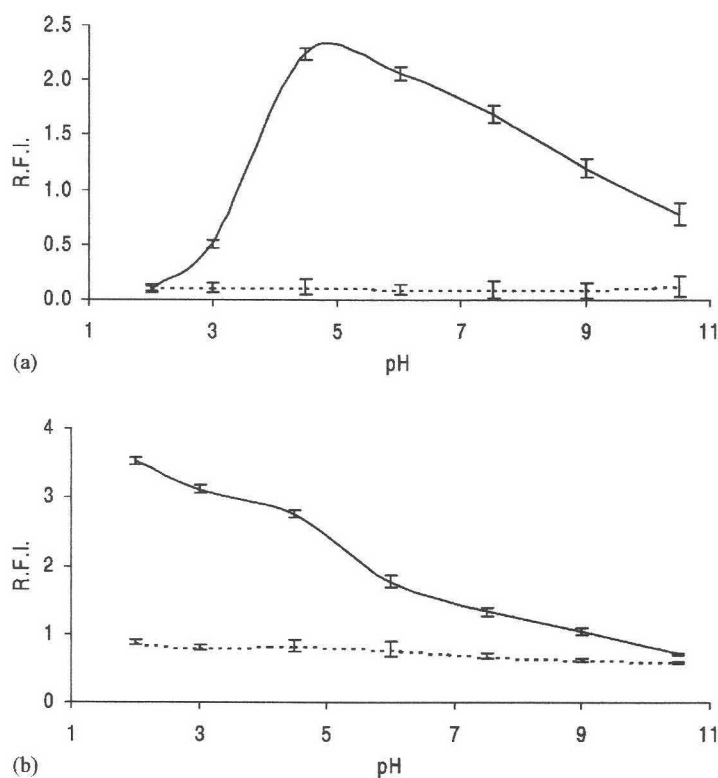


Fig. 3. Effect of pH on the fluorescence (—) and noise (---) signals for (a) NFL and (b) NAP. [NFL] = 500 ng ml⁻¹, $\lambda_{\text{ex/em}}$ = 294/336 nm, voltage detector 650 V, slits_{ex/em} 4/4 nm, resolution 5 s, flow-rate 1.5 ml min⁻¹ and injection volume 2 ml. [NAP] = 100 ng ml⁻¹, $\lambda_{\text{ex/em}}$ = 332/354 nm, voltage detector 600 V, slits_{ex/em} 4/4 nm, resolution 5 s, flow-rate 2.0 ml min⁻¹ and injection volume 2 ml.

(500 ng ml⁻¹) and NAP (100 ng ml⁻¹) under the optimum conditions. Under these conditions, NFL presents a maximum at pH 5.0 and NAP presents a decrease with an increase of the pH, choosing 2.5 as the optimum pH value.

Different pH 5.0 buffer solutions (acetate/HCl, citrate/HCl and fitalate/NaOH buffers) and pH 2.5 buffer solutions (glycine/HCl and fitalate/HCl buffers) were tested for NFL and NAP determinations. The best difference between noise and fluorescence signal was obtained with acetate/HCl buffer solution at pH 5.0 for NFL and glycine/HCl buffer solution at pH 2.5 for NAP.

Different concentrations of buffer solutions were tested for both analytes. Fig. 4 shows the varying buffer concentrations between 0–15 × 10⁻³ and 0–30 × 10⁻³ M in the fluorescence intensities and noise signals for NFL and NAP, respectively. The optimum concentrations were 5 × 10⁻³ M HAc/NaAc (pH 5.0)

for NFL and 15 × 10⁻³ M Glycine/HCl (pH 2.5) for NAP.

3.4. Flow-rate and injection volume optimization

The retention of both analytes was changed at carrier flow-rate from 0.5 to 3 ml min⁻¹. An increase of flow-rate significantly decreased the fluorescence signal but also decreased the response time of the sensor. So, optimum values of 1.5 ml min⁻¹ for NFL and 2.0 ml min⁻¹ for NAP were chosen for the rest of experimental work.

The injection volume of both analytes considerably affects the fluorescence emission signals. For NFL, an increase of injection volume presents a maximum fluorescence intensity at 2 ml of analyte, so this volume was chosen for the rest of experimental work. For NAP, an increase of injection volume of up to 3.0 ml gives an increase in fluorescence signal intensity, while

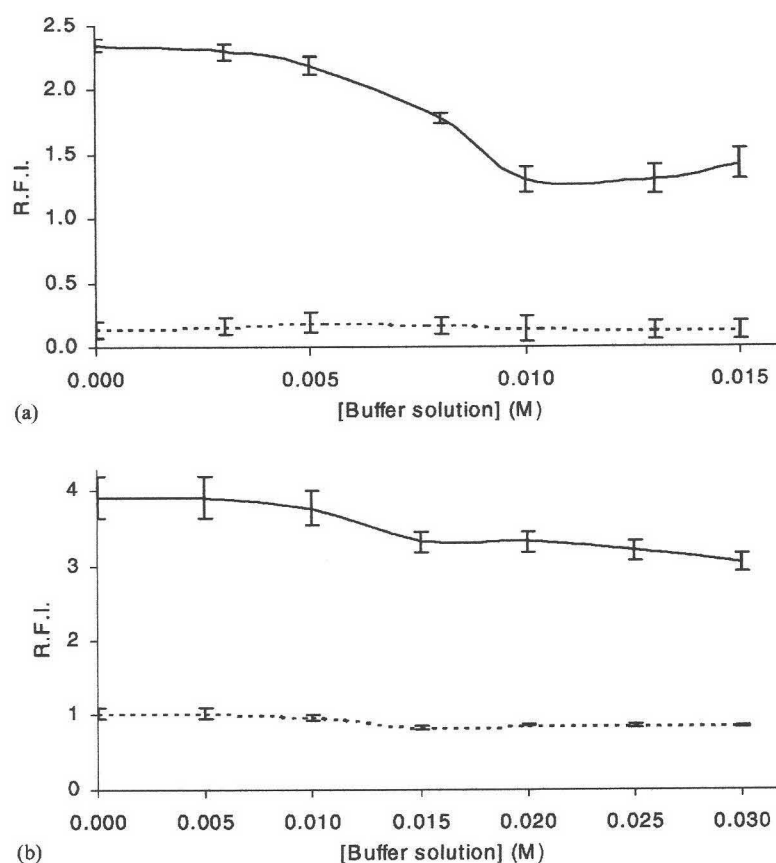


Fig. 4. Effect of buffer solution concentration on the fluorescence (—) and noise (---) signals for (a) NFL and (b) NAP. [NFL] = 500 ng ml⁻¹ and HAc/NaAc buffer solution at pH 5. [NAP] = 100 ng ml⁻¹ and glycine/HCl buffer solution at pH 2.5. Instrumental and FIA parameters as Fig. 3.

increasing injection volume greater than 3.0 ml results in a plateau. However, an increase of injection volume presents an increase in a response time sensor. So, 2.0 ml was chosen as the optimum injection volume.

3.5. Effect of temperature

Temperature is an important parameter that affects the fluorescence emission intensity and the retention on the exchanger resins of the compounds. A detailed study of the fluorescence emission of NFL and NAP at temperatures ranging from 5 to 50 °C was carried out.

For NFL, a temperature of 20 °C ± 1 °C was selected for the all the experimental work, because the fluorescence signal decreased considerably with the temperature. For NAP, the fluorescence signal was virtually

unchanged at temperatures ranging from 5 to 50 °C, so it was not necessary to fix a temperature.

3.6. Calibrations, sensitivity and precision

Analytical performance characteristics of the proposed techniques were evaluated. Standard calibration graphs, prepared according to recommended procedures, were linear passing through the origin for the NFL and NAP.

The regression equation for NFL was $I = 0.010 + 0.004C$ and for NAP was $I = 0.007 + 0.022C$, where C is the concentration in ng ml⁻¹ of NFL or NAP and I the difference between analyte and noise signals. The correlation coefficients (r) were 0.999 and 0.997, respectively.

Table 3
Analytical parameters of proposed methods

	NFL	NAP
Linear range (ng ml ⁻¹)	0–700	0–200
Sensitivity (ng ml ⁻¹)	10.1	6.0
Detection limit (ng ml ⁻¹)	20.7	13.3
Quantification limit (ng ml ⁻¹)	69.2	44.4
R.S.D. (%)	1.27 ^a	3.52 ^b

^a At a 500 ng ml⁻¹ level.

^b At a 100 ng ml⁻¹ level.

The wide linear ranges, small standard errors and correlation coefficients indicate very good calibration linearity. The detection limits, quantification limits, sensitivity and precision were determined using the method proposed by Cuadros Rodríguez et al. [35]. All the features of the proposed methods are summarised in Table 3.

3.7. Analytical applications

The low detection limits and good analytical sensitivity of the proposed methods allow the determination of these drugs in pharmaceutical preparations and biological fluids.

The first method proposed was applied to the determination of NFL in the only Spanish pharmaceutical preparation that contains this vasodilator agent called Praxilene 100 mg (containing 100 mg of nafronyl as active principle and talcum, microcrystalline silica and magnesium stearate as excipients without specified concentration).

The second method proposed was applied to the determination of NAP in two pharmaceutical preparations, Naprosyn 500 mg (containing 500 mg of NAP as active principle and polivinilpirrolidone K-90, sodium croscarmellose, iron oxide E-172 and magnesium stearate as excipients without specified concentration) and Antalgin 550 mg (containing 550 mg of NAP as principle active and microcrystalline cellulose, polivinilpirrolidone, talcum, magnesium stearate, hidroxypropyl methyl cellulose, polyetilenglycol, titanium dioxide E-171, E-132 and pure water as excipients without specified concentration) and in a volunteer urine sample with a previous intake of Antalgin 550 mg.

Table 4 shows the results obtained for the pharmaceutical preparations.

Table 4
Analytical application results in pharmaceutical preparations

Pharmaceutical preparations	Recovery percentage (%)	R.S.D. (%) ^d
Praxilene 100 mg	102.7	2.27
Naproxyn 500 mg	99.5	3.31
Antalgin 550 mg	100.9	3.59

^a For seven replicates.

No interference caused by the excipients and other products present in the three pharmaceutical preparations were detected in the response sensors because the fluorescence intensity and emission spectra between pure analyte and pharmaceutical preparations were identical.

The NAP ingested is excreted up to 95% via the urinary route, unchanged or as 6-*O*-desmethyl NAP and its conjugates [36]. The proposed method was applied to determine the percentage of unchanged NAP which is excreted in volunteer urine samples with a previous intake of the pharmaceutical preparation Antalgin 550 mg. The results of this experiment showed that the unchanged NAP was excreted via the urinary route in 42.4% with a relative standard deviation of 1.87% for seven replicates. Also, the method was validated with a standard addition method of calibration. The percentage excreted via the urine route obtained was 44.3%. To check the similarity of the slopes, a Student's *t*-test is used [37]. The statistic for slopes calculated was 1.632 while the statistic for slopes tabulated was 2.807 at 23° of freedom and $\alpha = 0.01$. Therefore, the slopes are essentially the same.

No interferences were detected because the fluorescence intensity and emission spectra were the same in solution with or without urine, and the standard calibration and standard addition calibration have the same slope.

4. Conclusions

We present two flow sensors for on-line determination of NFL and NAP in real samples (pharmaceutical preparations and biological fluids). The proposed sensors offer excellent analytical parameters such as sensitivity, selectivity, versatility and ease of use, demonstrating that the possible interferences do not

affect the determination. In fact, these can be a good alternative to more sophisticated techniques for the analysis of biological samples and to control the concentrations of pharmaceutical preparations.

It would be interesting to use a separative technique with mass spectrometry detection to confirm that decomposition products or molecular analogue residues do not interact with the reagent phase of the flow sensor proposed to determine NAP in human urine.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financed support of Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project PPQ2000-1291-C02-01) and the grant support of Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (Agreement no. 1870).

References

- [1] A. Meyenau, M. Grand, L. Fontaine, *Arzneim. Forsch.* 23 (1973) 1431.
- [2] A. Meyenau, M. Grand, M. Belleville, L. Fontaine, *Therapie* 30 (1975) 777.
- [3] K. Roth, M. Hildebrand, K.H. Beyer, *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 14 (1989) 133.
- [4] C. Rodríguez Bueno, *Dopaje*, Interamericana–McGraw-Hill, Madrid, 1992.
- [5] L.M. Walmsley, P.A. Wilkinsons, R.R. Brodie, L.F. Chasseaud, *J. Chromatogr.* 338 (1985) 433.
- [6] P. Stehlik, H. Houbova, *Cesk. Farm.* 39 (1990) 394.
- [7] H. Hang, F.C. Thyron, *J. Liquid Chromatogr. Releat. Technol.* 21 (1998) 1347.
- [8] R.R. Brodie, L.F. Chasseaud, T. Taylor, J.D. Hunter, P.J. Ciclitira, *J. Chromatogr.* 164 (1979) 534.
- [9] E.R. Garrett, *J. Pharm. Sci.* 72 (1984) 635.
- [10] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Analyst* 123 (1998) 2285.
- [11] J.A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López, *Anal. Chim. Acta* 382 (1999) 77.
- [12] G. Kanoute, E. Nivaud, B. Paulet, P. Boucly, *Talanta* 31 (1984) 144.
- [13] T. Pomazanska-Kolodziejska, *Acta Pol. Pharm.* 40 (1983) 357.
- [14] M.S. Mahrous, M.M. Abdel-Khakel, M.E. Abdel-Mamid, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (1985) 535.
- [15] J.W. Wainer, T.D. Doyle, *J. Chromatogr.* 284 (1984) 117.
- [16] R.A. Upton, J.N. Buskin, T.W. Guentert, D.L. Williams, S. Riegelman, *J. Chromatogr.* 190 (1980) 119.
- [17] H.E. Larsen, K. Marinelli, *J. Chromatogr.* 222 (1981) 482.
- [18] A. Markku, *J. Pharm. Sci.* 66 (1977) 433.
- [19] L.J. Cline Love, M. Lynn Grayeski, J. Noroski, *Anal. Chim. Acta* 170 (1985) 3.
- [20] I. Rapado Martínez, R.M. Villanueva Camañas, M.C. García-Álvarez-Coque, *Analyst* 119 (1994) 1093.
- [21] A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, M.I. Ramírez García, B. Cañabate Díaz, A. Fernández Gutiérrez, *Talanta* 50 (1999) 401.
- [22] P. Ortega Barrales, M.L. Fernández de Covadonga, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 227.
- [23] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Covadonga, M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Molina Díaz, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 131.
- [24] M.J. Ayora Cañada, M.I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Covadonga, A. Molina Díaz, *J. Pharm. Biomed.* 22 (2000) 59.
- [25] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Covadonga, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz, *Int. J. Pharm.* 216 (2001) 95.
- [26] P.J. O'Connell, C. Gormally, M. Parvda, G.G. Guilbault, *Anal. Chim. Acta* 431 (2001) 239.
- [27] M.L. Wen, Y.B. Zhao, X. Chen, C.Y. Wang, *J. Pharm. Biomed.* 18 (1999) 957.
- [28] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández Covadonga, A. Molina Díaz, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 265.
- [29] A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández Covadonga, A. Molina Díaz, *Eur. J. Pharm. Sci.* 13 (2001) 385.
- [30] F. Álava Moreno, M.J. Valencia González, M.E. Díaz García, *Analyst* 123 (1998) 151.
- [31] Z.H. Song, L. Wang, *Analyst* 126 (2001) 1393.
- [32] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Analyst* 1156 (1990) 699.
- [33] *Talanta* 35 (special issue) (1998).
- [34] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier, The Netherlands, 1994.
- [35] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [36] *V-I Vademecum Internacional*, 1999, pp. 1324–1325.
- [37] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, F. Alés Barrero, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *J. AOAC Int.* 78 (1995) 471.

A sensitive fluorescence optosensor for analysing propranolol in pharmaceutical preparations and a test for its control in urine in sport

J.F. Fernández-Sánchez, A. Segura Carretero*, C. Cruces-Blanco, A. Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuentenueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

Abstract

We describe a simple and selective method for analysing propranolol and a sensitive test for its control in urine. A flow-through fluorescence optosensor based on on-line immobilization in a non-ionic-exchanger (Amberlite XAD-7) solid support in a continuous flow was used in both cases. Determination was made in 5 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ buffer solution at pH 6 at a working temperature of 20°C. Fluorescence intensities were measured at $\lambda_{\text{ex/em}}=300/338$ nm with a response time of 80 s, thus obtaining a linear concentration range of between 0 and 250.0 ng mL⁻¹ with a detection limit of 1.3 ng mL⁻¹, an analytical sensitivity of 6.0 ng mL⁻¹ and a standard deviation of 2.40% at a 150 ng mL⁻¹ concentration level for propranolol. We also propose a test to detect propranolol in urine with a linear concentration range between 0 and 100.0 ng mL⁻¹, a detection limit of 0.2 ng mL⁻¹, an analytical sensitivity of 1.0 ng mL⁻¹, and a standard deviation of 0.84% at a 75 ng mL⁻¹ concentration level. The effect of proteins presents in urine samples were evaluated. The two proposed methods were satisfactorily applied to commercial formulations and urine samples respectively.

Keywords: Flow-through fluorescence sensor; Propranolol; Pharmaceutical analysis; Urine; Doping test.

*Corresponding author. Telf.: +34958248593; fax: 34-958249510.

E-mail address: ansegura@ugr.es (A. Segura-Carretero).

1. Introduction

Propranolol is a beta-adrenergic blocking drug widely prescribed for the treatment of cardiac arrhythmia, sinus tachycardia, angina pectoris and hypertension [1,2]. It has also been suggested for use in a number of other conditions including dysfunctional labour and anxiety. When administered over a long period of time it reduces mortality caused by hypertension and lengthens survival in patients with coronary heart disease [3,4].

It is also used in low activity sports, reducing cardiac frequency, contraction force and coronary flow [5]. Therefore it has been included in the list of forbidden substances by the International Olympic Committee [6]. The Spanish Olympic Committee has decided that only a qualitative determination of propranolol in urine is necessary [7].

Different techniques [8-13], including fluorimetry [5-14] and phosphorimetry [15], have hitherto been used to determine propranolol in commercial formulations and/or biological fluids. Practically all previous methods function in a batch system and require various tedious preliminary procedures such as pre-concentration in an organic solvent. Thus, in recent years new techniques to determine propranolol such as molecularly imprinted [16] or ion selective PVC membrane electrodes [17] have been developed, but it is still necessary to further develop highly selective, simple, rapid and cheap procedures to determine propranolol in pharmaceutical preparations and human fluids.

The analytical advantages of optical sensors have been demonstrated during the last decade [18,19]. A combination of flow-injection analysis techniques with detection on optically active surfaces with an immobilised indicator packed in a flow-through cell, has been called "optosensing flow-injection analysis"[20] and has proved to offer important advantages because of its high sensitivity, selectivity, precision, simplicity, speed and low cost [21].

The development of optosensing techniques has led to a shorter turnaround analysis time and reduces costs for doping controls. As a large part of the samples prove to be non-doped, rapid analytical methods such as doping tests that provide reliable "yes/no" responses are of increasing interest. These tests can usually be described as systems that "filter" samples to select those with analyte content levels "similar to" or "higher than" a previously established threshold. These "probably doped" samples must

then be examined with more exact instrumental methods. Doping tests can significantly cut costs and save time [22,23].

We have developed an optosensor for the drug propranolol to use in the analysis of pharmaceutical preparations and as a doping test for the qualitative analysis of propranolol in human urine without lengthy preliminary procedures.

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Analytical reagent grade chemicals were used for the preparation of all the solutions. Sodium di-hydrogen phosphate 1-hydrate was bought from Sigma (Spain) and used as received. A solution of 0.1 M $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ buffer at pH 6.0 was freshly prepared.

25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solution of propranolol (Sigma) was prepared in distilled water.

The strong basic anion-exchanger resins Dowex 1x2-100, Dowex 1x4-100 and Dowex 1x8-100 (Sigma), the strong acid cation-exchanger resins Dowex 50wx2-100, Dowex 50wx4-100 and Dowex 50wx8-100 (Fluka), and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck (Sigma) were sieved and then used at three-grain size (80-120, 120-160 and >160 μm).

Water was distilled twice and prepared with a Mili-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

2.2. Optosensing manifold

Using a single-line flow-injection system, a Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of 25 μl volume was packed with the corresponding resin and placed in the standard sample compartment of the detector. Two rotatory valves (Supelco 5020) were used for sample introduction and renewing the active surface. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell. A Gilson Miniplus-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream.

All fluorescence measurements (relative fluorescence intensity, R.F.I.) were carried out with an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrometer equipped with a continuous high-power xenon lamp and a thermostat cell holder.

2.3. General procedure

2 mL of sample was injected through valve of sample into a channel of 5 mM $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ buffer solution, pH 6, into the carrier stream. In this medium at a 1.5 mL min^{-1} flow-rate the propranolol is retained in the flow cell on Amberlite XAD 7. After the fluorescent measurement ($\lambda_{\text{exc/em}}=300/338 \text{ nm}$, detector voltage of 600 V, slits of 4 nm for excitation and emission) 250 μL of regenerative solution (acetonitrile/ H_2O 80% v/v) was injected through valve of regenerative solution to strip the analyte retained on the solid phase before proceeding with the next sample.

The measurement was repeated three times to evaluate its error.

2.4. Procedure for pharmaceutical preparations

Sumial 10 mg (Laboratorios Seneca), a commercial product bought at the local chemists, with a nominal content of 10 mg of propranolol and an unknown concentration of excipients, was analysed. The contents of five pills were powdered and homogenised. A portion was dissolved in doubly distilled water and an aliquot of this solution was treated as indicated under general procedure.

2.5. Procedure for urine samples

Doped urine was collected 24 h after the oral intake of a 5 mg single dose (half a pill) of Sumial 10 mg. Propranolol-free urine was also collected from two volunteers (male and female).

Both types of samples were vortexed 3800 r.p.m. for 15 min and frozen until preparation for analysis. For the analysis of the urine samples, aliquots of these were treated as indicated under general procedure.

3. Results and discussion

3.1. Selection of reagent phase and regenerative solution

The strong basic anion-exchanger resins Dowex 1x2-100, Dowex 1x4-100 and Dowex 1x8-100, the strong acid cation-exchanger resins Dowex 50wx2-100, Dowex 50Wx4-100 and Dowex 50Wx8-100 and the non-ionic resins Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck were studied (see Table 1). The best differences between noise (due to resin signal) and the fluorescence signal of propranolol were obtained using Amberlite XAD 7. Using this

resin, different grain sizes were tested and improvements in the analytical signal were observed with 80-120 μm mesh resin.

Finally, we made experiments to find the most suitable regenerative solution to make the system satisfactorily reusable. This proved to be acetonitrile/water 80% v/v.

3.2. Fluorescence properties on solid surface

The fluorescence excitation and emission spectra of propranolol on the non-ionic resin were recorded and shown in Fig. 1. Propranolol on Amberlite XAD 7 emits fluorescence with a maximum excitation intensity at 300 nm and maximum emission intensity at 338 nm. Different instrumental parameters relating to the luminescence technique affect fluorescence intensity and so these were carefully optimised (see Table 2).

3.3. Influence of pH, type and concentration of buffer solution

pH affects the dissociation of the compound and consequently the retention on the exchanger resin. The effect of pH on the fluorescence emission intensity of propranolol and noise signals are shown in Fig. 2.

Different pH values ranging from 2.0 to 13.0 were studied under optimum conditions, fixing the quantity of propranolol at 150 ng mL^{-1} . Under these conditions, propranolol presents maximum fluorescence at pH 6.0.

Different buffer solutions (phosphate/HCl and italate/NaOH) were tested at pH 6. The best results were obtained with phosphate/HCl. Different concentrations of phosphate/HCl buffer solution (between 0 and $20 \times 10^{-3} \text{ M}$) were also tested, the optimum concentration proving to be $5 \times 10^{-3} \text{ M}$.

3.4. Optimisation of FIA variables

The retention of propranolol changes according to the carrier flow-rate. An increase in flow-rate significantly decreases the fluorescence signal but also decreases the response time of the optosensor (time passed between injection and maximum intensity measurement). Thus, an optimum value of 1.5 mL min^{-1} was chosen for the rest of our experimental work (see Fig. 3a)

The injection volume of propranolol considerably affects the fluorescence emission signals. An increase in injection volume of up to 3.0 mL increases the fluorescence signal intensity concomitantly but an increase in injection volume also

increases the sensor time response. Therefore, an injection volume of 2.0 mL was chosen as the optimum value (see Fig. 3b).

3.5. Effect of temperature

Temperature is normally an important parameter affecting fluorescence emission intensity and the analyte retention on the exchanger resin. A detailed study of the effect of temperature upon the fluorescence emission of propranolol was carried out at temperatures ranging from 5°C to 50°C. The fluorescence signal was virtually unchanged within this range so it was unnecessary to fix any particular temperature.

3.6. Calibrations, sensitivity and precision

To evaluate the performance of our analytical methodology standard linear calibration graphs were drawn according to recommended procedures, with the curve passing through the origin for propranolol.

The regression equation was $I=0.072+.009\cdot C$, where C is the concentration in ng mL^{-1} of propranolol and I is the difference between the analyte and noise signals. The correlation coefficient (r) was 0.998.

The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate very good calibration linearity. The limit of detection was determined using the IUPAC method ($\text{LOD}=3S_b/m$) and quantification limit, sensitivity and precision were determined using the method proposed by Cuadros et al.[24]. All the features of the proposed method are summarised in Table 3.

3.7. Analysis of propranolol in pharmaceutical preparations

The detection of low levels and good analytical sensitivity of the proposed method facilitate the determination of propranolol in pharmaceutical preparations.

Our proposed method was applied to the determination of propranolol in a pharmaceutical preparation called Sumial 10 mg, without matrix effect (because of the similarity of fluorescence intensity and the coincidence of excitation and emission spectra between the pure analyte and the pharmaceutical preparations) in which we obtained a percentage recovery of 98.74% with a relative deviation standard of 1.46% for seven replicas.

3.8. Doping test for propranolol

Propranolol is a beta-adrenoceptor that is used in sports demanding low physical activity. Propranolol is rapidly and almost completely absorbed after oral administration and undergoes extensive first-pass metabolism. During 48 h less than 4% of a dose is excreted in the urine as an unchanged drug [25].

The Spanish Olympic Committee has decided that only a qualitative determination of propranolol in urine is necessary [7]. The minimum detectable quantity of propranolol in urine is the detection limit of the proposed method in the presence of urine samples.

The performance of the proposed analytical test was evaluated by establishing a standard linear calibration graph according to recommended procedures adding free-propranolol urine samples (until 1:10 dilution) to evaluate and eliminate the matrix effect of the urine in the proposed test.

The regression equation was $I = -0.179 + 0.005 \cdot C$, where C is the concentration in ng mL^{-1} of propranolol and I is the difference between the analyte signal and the noise signal. The correlation coefficient (r) was 0.999. The calibration graph has a negative origin because there is a quenching effect on the fluorescence intensity from the urine matrix, although a linear increase of I with propranolol concentration was observed.

The wide linear range, small standard errors and correlation coefficient indicate very good calibration linearity. The detection limit was determined using the IUPAC method and quantification limit, sensitivity and precision were determined using the method proposed by Cuadros et. al.[24]. All the features of the proposed method are summarised in Table 4.

The Amberlite XAD 7 is commonly used for protein purification. In addition, the proportions of individual proteins excreted in the urine depend on the extent of their reabsorption by the renal tubules; albumin represents approximately 60% of total proteins excreted because it is not completely removed from the filtrate by the tubular cells [26]. The values of albumin in urine can fluctuate between 0 and 80 mg L^{-1} . To evaluate the effect of proteins in the determination of propranolol using the doping test, three different levels (80, 160 and 800 mg L^{-1} of albumin) were added to the urine spiked sample observing that the very-high level of proteins (albumin) do not affect the response of the doping test proposed and there is not a gradual accumulation of proteins on the solid support because the proteins are removed with the regenerative solution.

To demonstrate that the doping test is a good tool for controlling propranolol in urine, three urine samples (one doped, from a male volunteer, and two propranolol-free urine samples, from a male and female volunteers) were checked (see Fig. 4).

We have shown that there is a difference between free-propranolol urine samples and doped urine sample signals and demonstrate that the doping test is able to detect the ingestion of only 5 mg of propranolol 24 h after the volunteer has taken the medicine.

4. Conclusions

We present an optosensor for the on-line determination of propranolol in pharmaceutical preparations and a doping test for propranolol in urine. The proposed method offers excellent analytical parameters, such as sensitivity, selectivity, versatility, and ease of use. These may well be a good alternative to more sophisticated techniques for the analysis of biological samples and for controlling the concentrations of pharmaceutical preparations.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financed support of Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project PPQ2000-1291-C02-01) and the grant support of Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (Agreement no. 1870).

References

- [1] K. Parfitt (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, Pharmaceutical Press, London, 1990.
- [2] K. Parfitt (Ed.), *Martindale: The Complete Drug Reference*, 32nd ed, Pharmaceutical Press, London, 1990.
- [3] J.B. Soriano, A.W. Hoes, L Meems, D.E. Grobbee, *Prog. Cardiovasc. Dis.* 39 (1997) 445.
- [4] G. Emilien, J.M. Maloteaux, *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 53 (1998) 389.
- [5] J.A. Murillo-Pulgarín, A. Alañón-Molina, P. Fernández-López, *Anal. Chim. Acta* 370 (1998) 9.
- [6] C. Rodríguez Bueno, *Dopaje*, Mc-Graw Hill, Madrid, 1992.
- [7] BOE No.84, 7 April 2000, pp.14411-14416.

- [8] F. Belal, O.A. Al-Deeb, A.A. Al-Majed, E.A.R. Gad-Kariem, *Farmaco* 54 (1999) 700.
- [9] K.A. Assi, B.J. Clark, K.D. Altria, *Electrophoresis* 20 (1999) 2723.
- [10] A.J. Braza, P. Modamio, E.L. Marino, *J. Chromatogr. B* 738 (2000) 225.
- [11] X.X. Bai, T.Y. You, H.W. Sun, X.R. Yang, E.K. Wang, *Electroanal.* 12 (2000) 535.
- [12] G.M. Hanna, F.E. Evans, *J. Pharm. Biomed.* 24 (2000) 189.
- [13] M.A. El-Ries, F.M. Abou Attia, S.A. Ibrahim, *J. Pharm. Biomed.* 24 (2000) 179.
- [14] G.S. Rekhi, S.S. Jambhekar, P.F. Souney, D.A. Williams, *J. Pharm. Biomed.* 13 (1995) 1499.
- [15] I.R. Martínez, R.M.V. Camanas, M.C. García-Álvarez-Coque, *Analyst* 119 (1994) 1093.
- [16] W.M. Mullett, P. Martín, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 73 (2001) 2383.
- [17] H.Y. Aboul-Enein, X.X. Sun, *Analisis* 28 (2000) 855.
- [18] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Analyst* 1156 (1990) 699.
- [19] *Talanta* 35 (1998) special issue.
- [20] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow-through (Bio)Chemical Sensors*, Elsevier, Netherlands, 1994.
- [21] A. Fernández Gutiérrez, S.G. Schulman, *Fosforescencia Molecular Analítica: Una Aplicación Práctica*, Editorial Universidad de Granada, Granada, 2001.
- [22] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
- [23] B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 451 (2001) 203.
- [24] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [25] A.C. Moffat, *Clarke's Isolation and Identification of Drugs*, Pharmaceutical Press, London, 1986.
- [26] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1999.

Table 1

Selection of reagent phase

Support	I ^a
Dowex 1x2-200	0.031
Dowex 1x4-200	0.056
Dowex 1x8-200	0.017
Dowex 50wx2-200	0.378
Dowex 50wx4-200	0.136
Dowex 50wx8-200	0.068
Silica Gel Davisil	0.093
Silica Gel Merck	0.350
Amberlite XAD 2	0.104
Amberlite XAD 4	0.070
Amberlite XAD 7	1.580

^a Differences between fluorescence and noise signals (2 mL of propranolol 150 ng mL⁻¹ were injected in all cases)

Table 2

Instrumental parameters

	Optima values
Wavelength excitation/emission	300/338 nm
Detector voltage	600 V
Slits (excitation/emission)	4/4 nm
Resolution	5 s

Table 3

Analytical parameters of proposed method

	Estimate value	
Relative standard deviation (R.S.D. (a)) (%)	32.35	
Relative standard deviation (R.S.D. (b)) (%)	1.65	
Standard deviation of regression ($s_{R,c}$)	0.055	
Linearity (%)	98.35	
Linear range (ng mL ⁻¹)	0-250	
Sensitivity (ng mL ⁻¹)	6.0	
Limit of detection (ng mL ⁻¹)	1.3	
Limit of quantification (ng mL ⁻¹)	42.6	
Precision (R.S.D.) (%)	50 ng mL ⁻¹	7.6
	100 ng mL ⁻¹	4.0
	150 ng mL ⁻¹	2.4
	200 ng mL ⁻¹	1.9
	250 ng mL ⁻¹	1.7

Table 4

Analytical parameters of proposed doping test

	Estimate value	
Relative standard deviation (R.S.D. (a)) (%)	1.2	
Relative standard deviation (R.S.D. (b)) (%)	0.7	
Standard deviation of regression ($s_{R,c}$)	0.005	
Linearity (%)	99.3	
Linear range (ng mL ⁻¹)	0-100	
Sensitivity (ng mL ⁻¹)	0.96	
Limit of detection (ng mL ⁻¹)	0.2	
Limit of quantification (ng mL ⁻¹)	7.0	
Precision (R.S.D.) (%)	25 ng mL ⁻¹	2.5
	50 ng mL ⁻¹	1.2
	75 ng mL ⁻¹	0.8
	100 ng mL ⁻¹	0.7

Caption figures

Fig. 1. Excitation and emission spectra of propranolol. [Propranolol]= 150 ng mL⁻¹, 5x10⁻³ M H₂PO₄⁻/ HPO₄²⁻ buffer solution at pH 6, voltage detector 600 V and slits_{exc/em} 4/4 nm.

Fig. 2. Effect of pH on the fluorescence (—) and noise (----) signals. [Propranolol]= 150 ng mL⁻¹, λ_{exc/em}= 300/338 nm, voltage detector 600 V, slits_{exc/em} 4/4 nm, resolution 5s, flow-rate 1.5 mL min⁻¹ and injection volume 2 mL.

Fig. 3. Effect of flow-rate (a) and injection volume (b) on the fluorescence of propranolol (—), noise (----) and response time (-●-●-) signals. [Propranolol]= 150 ng mL⁻¹. Experimental and instrumental parameters as Fig. 1 and Fig. 2, respectively.

Fig. 4. Signal obtained using the test for propranolol in two propranolol-free samples of urine and a doped sample of urine. (—) Signal when the carrier is passing through the active surface, (----) signal when the regenerative solution is passing through the active surface.

Figure 1:

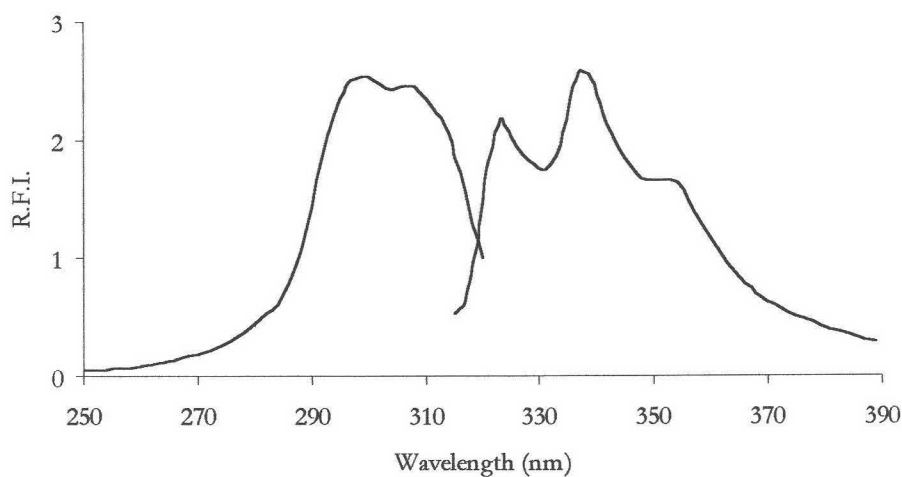


Figure 2

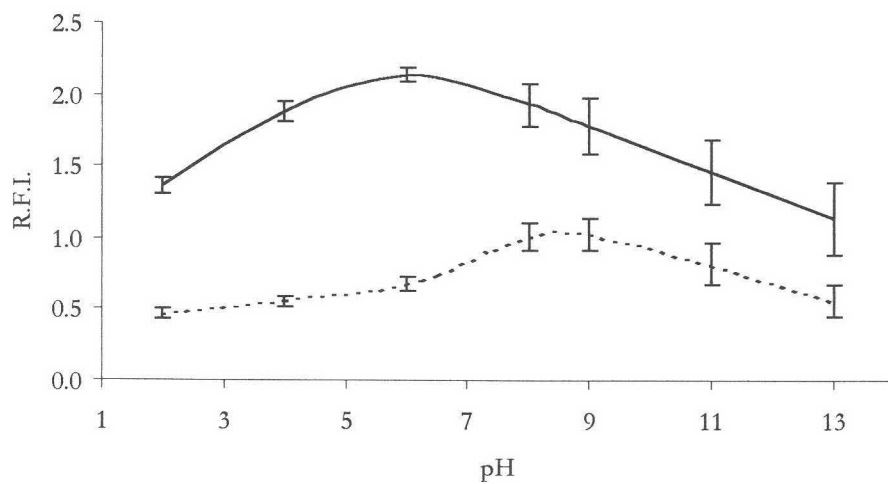


Figure 3

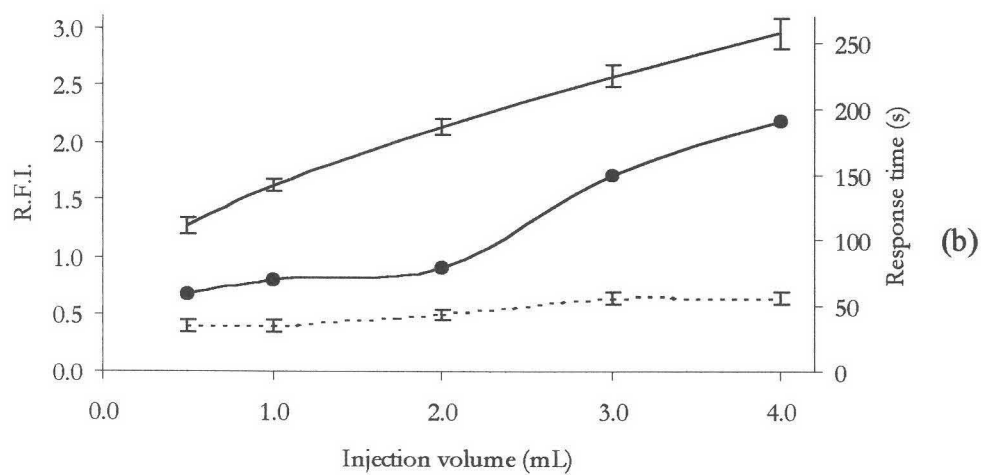
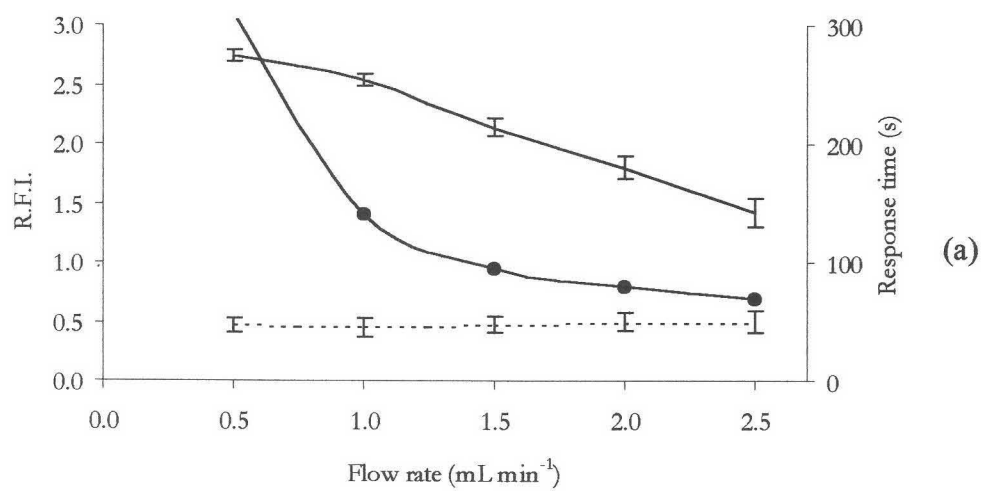
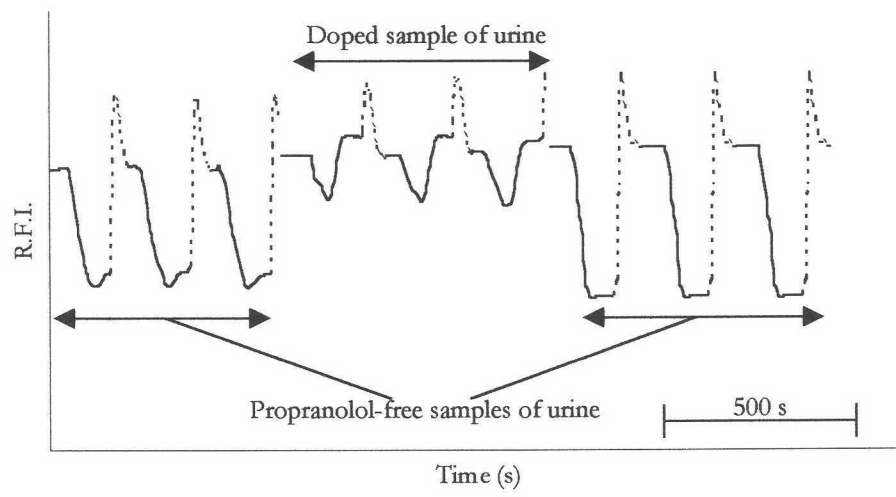


Figure 4



The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples

Jorge F. Fernández-Sánchez, Antonio Segura Carretero*, Carmen Cruces-Blanco, Alberto Fernández-Gutiérrez

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Granada, C/Fuente Nueva s/n, E-18071 Granada, Spain.

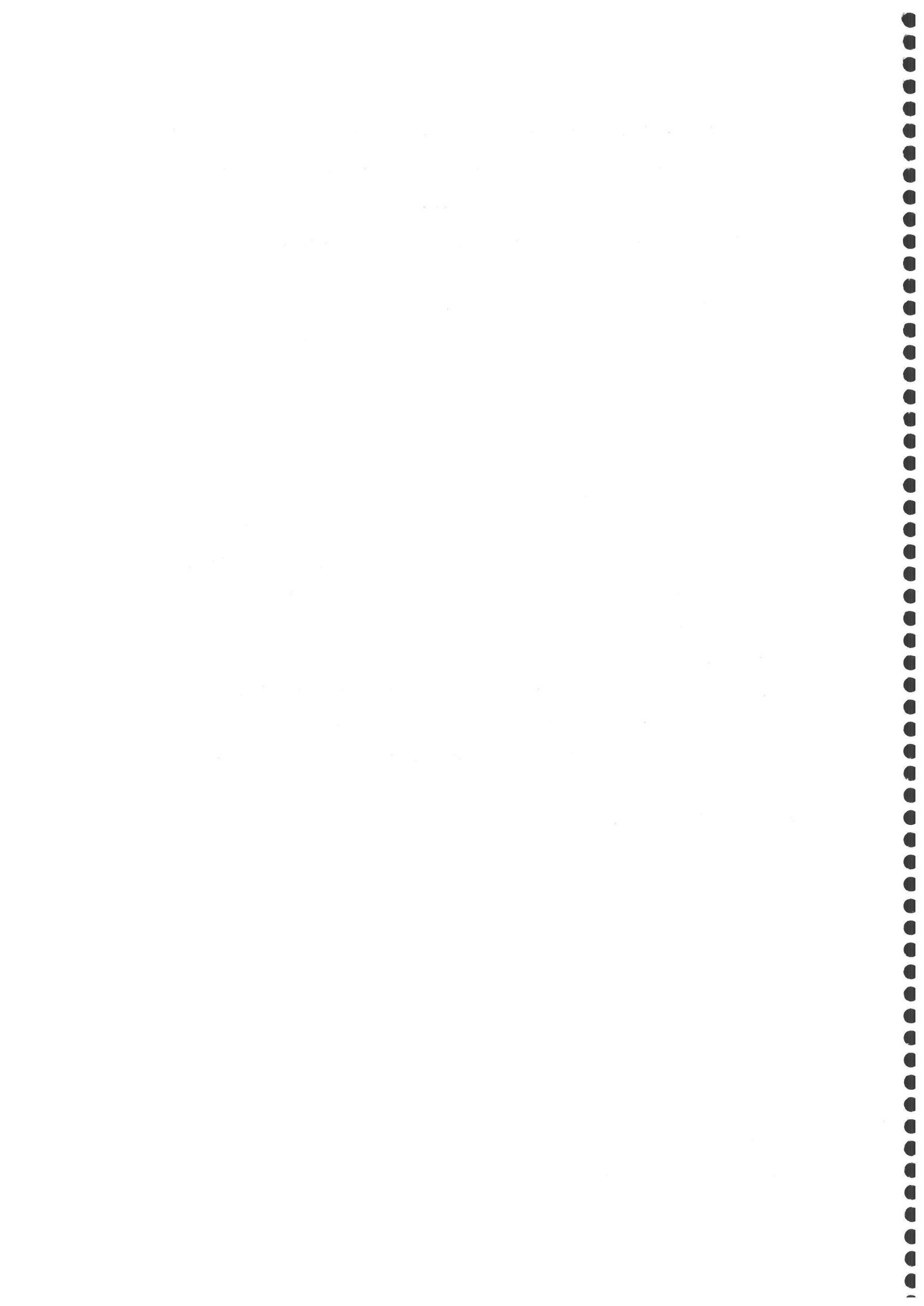
Abstract

This paper presents the characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in solid-surface fluorescence as the first step for obtaining new optical sensors for PAHs screening. The fluorescence properties of the EPA-PAHs (naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo[a]anthracene, benzo[k]fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno [1,2,3-cd]pyrene, benzo[g,h,i]perylene and dibenzo[a,h]anthracene) on five types of solid surfaces were evaluated. The experimental variables (pH and percentage of organic solvent in samples) were studied, obtaining different possibilities for making individual sensors for some of these PAHs and the best conditions for developing sensors for PAH screening were also studied.

Keywords: Solid-surface fluorimetry; Polycyclic aromatic hydrocarbons; Screening test; Luminescence sensor

*Corresponding author: Tel.: +34-958248593; fax: +34958249510

E-mail address: ansegura@ugr.es



1. Introduction

The analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) have been of great interest because of their carcinogenicity and the general ubiquity of these compounds in the environment.

The two main sources of PAHs in the environment arise from incomplete combustion of fossil fuels for energy production and from incomplete combustion of refuse [1], certain technological processes and cooking procedures can also cause elevated levels of PAHs in some foods [2] and an increase of PAH levels in smokers' urine have been detected by several researchers [3,4]. So, human exposure to PAHs can occur through contaminated air and water, ingestion of food, and for different life styles.

The high percentage of probability of human exposure to PAHs and their cancer-inducing activity has led to the necessity to identify and determine PAHs and to the establishment of numerous methods for their determination [5,6] and national and international governments have developed different laws to control these pollutants [7,8].

Identification and quantification is usually by HPLC with UV-visible, fluorimetric or amperometric detection or by means of GC-MS or GC-FID [9-13] and most of them include a preconcentration step. These steps are time-consuming and require great deal of effort, thus making the analysis unsuitable for routine control analysis.

Fluorescence methodologies offer the advantage of wide linear dynamic ranges, low detection limits and good selectivity. The formation of luminescent species on the surface can be explained due to the room temperature solid-surface luminescence phenomenon. The basic difference between solution luminescence and solid-surface luminescence is that in solid luminescence, the luminescent species are usually adsorbed on a solid substrate. Since the molecules are isolate and collision-restricted, this technique enables very sensitive determinations for many organic and inorganic substances at room temperature without cryogenic conditions [14-16].

A goal for the analysis of PAHs in solution is to develop screening techniques that obviate expensive, time consuming and laborious chromatographic procedures [17-19]. The development of a screening test method leads to a shorter turnaround analysis time and reduces costs for environmental controls. So, as a large part of the samples



prove to be non-polluted, rapid analytical methods such as a screening test that provides reliable “yes/no” responses are of increasing interest. These systems can usually be described as systems that “filter” samples to select those with analyte content levels “similar to” or “higher than” a previously established threshold. These “probably polluted” samples must then be examined with more exact instrumental methods [20,21].

In this paper, a characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons by solid-surface fluorescence is presented as the first step for developing selective sensors for one PAH or screening test sensors for different EPA-PAHs of environmental interest (see Table 1).

2. Experimental

2.1. Chemicals and materials

Analytical reagent grade chemicals were used for the preparation of all the solutions.

EPA-PAHs (naphthalene, acenaphthene, acenaphthylene, fluorene, phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, chrysene, benzo[a]anthracene, benzo[k]fluoranthene, benzo[b]fluoranthene, benzo[a]pyrene, indeno [1,2,3-cd]pyrene, benzo[g,h,i]perylene and dibenzo[a,h]anthracene) were purchased from Sigma and used as received.

50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ solutions of each PAH (Sigma) were prepared in 1,4-dioxane, methanol, ethanol, dimethylformamide, acetonitrile and acetone.

Samples of each PAH at 600 ng mL^{-1} were prepared in organic solvent /water (10:90). Water was distilled twice and prepared with a Mili-Q System (Millipore, Bedford, MA, USA).

The non-ionic resins (Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck) (Sigma) were sieved and then used at 80-120 μm grain size.



2.2. Fluorescence measurements

A Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of 25 μl volume was used in all solid-surface fluorescence measurements. No attempts were made to remove oxygen from PAH solution.

All fluorescence measurements (relative fluorescence intensity, R.F.I.) were carried out with an Aminco Bowman Series 2 luminescence spectrometer equipped with a 150 W continuous high-power xenon lamp, two monochromators with a resolution of 0.2 nm and a high performance R928 photomultiplier detector. The system was controlled with a personal computer with 4 MB RAM memory, OS/2 version 2.0, and a GPIB(IEEE-488) interface card for computer-instrument communication.

2.3. General procedure

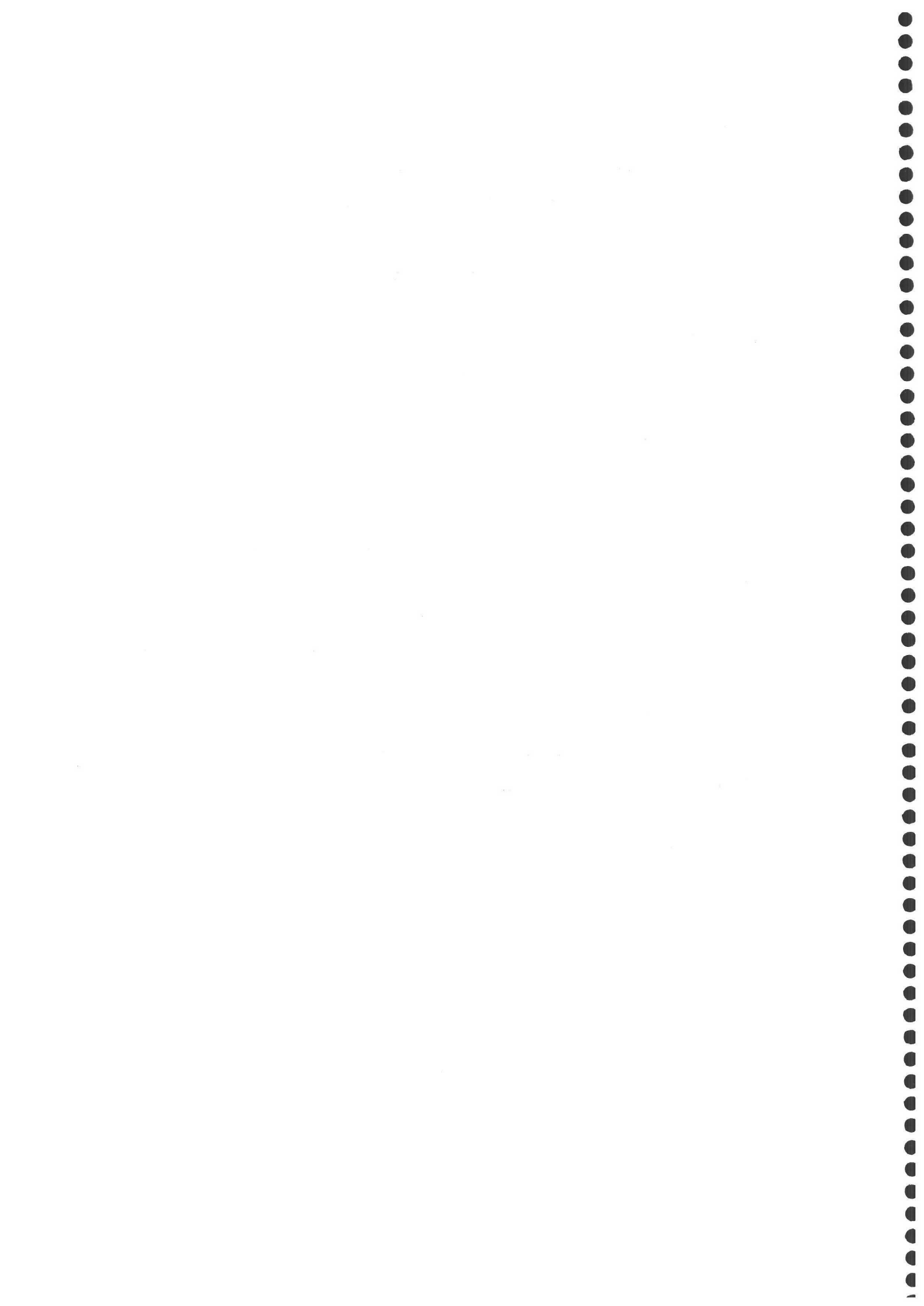
In a single-line-flow-injection system, a Hellma Model 176.052-QS flow-through cell of 25 μl volume was packed with the corresponding resin and placed in the conventional sample compartment of the detector. A rotatory valve (Supelco 5020) was used for sample introduction. PTFE tubing (0.8 mm i.d.) and fittings were used for connecting the flow-through cell. A Gilson Miniplus-3 peristaltic pump was used to generate the flow stream (see Figure 1).

When the flow-through cell was packed with the corresponding resin, the fluorescence background was measured at the excitation and emission wavelengths of each PAH (see Table 1). Then, 500 μL of sample was passed through the cell, and the fluorescence signal was recorded at the excitation and emission wavelengths chosen for each PAH, detector voltage of 600 V and slit width of 4 nm for excitation and emission.

3. Results and discussion

The most important experimental variables which can affect solid-surface fluorescence emission are: pH, type of solid support and the organic solvents present in the medium.

The effect of pH will be related to the dissociation of the ionisable groups of the analytes and also affect the capacity of the resins to interact with analytes [22]. In the case of PAHs, in the presence of the resins assayed, the pH does not affect the dissociation of the compounds because they do not have dissociable groups in the



molecules; consequently, the pH will only affect the interaction analyte-exchanger resins.

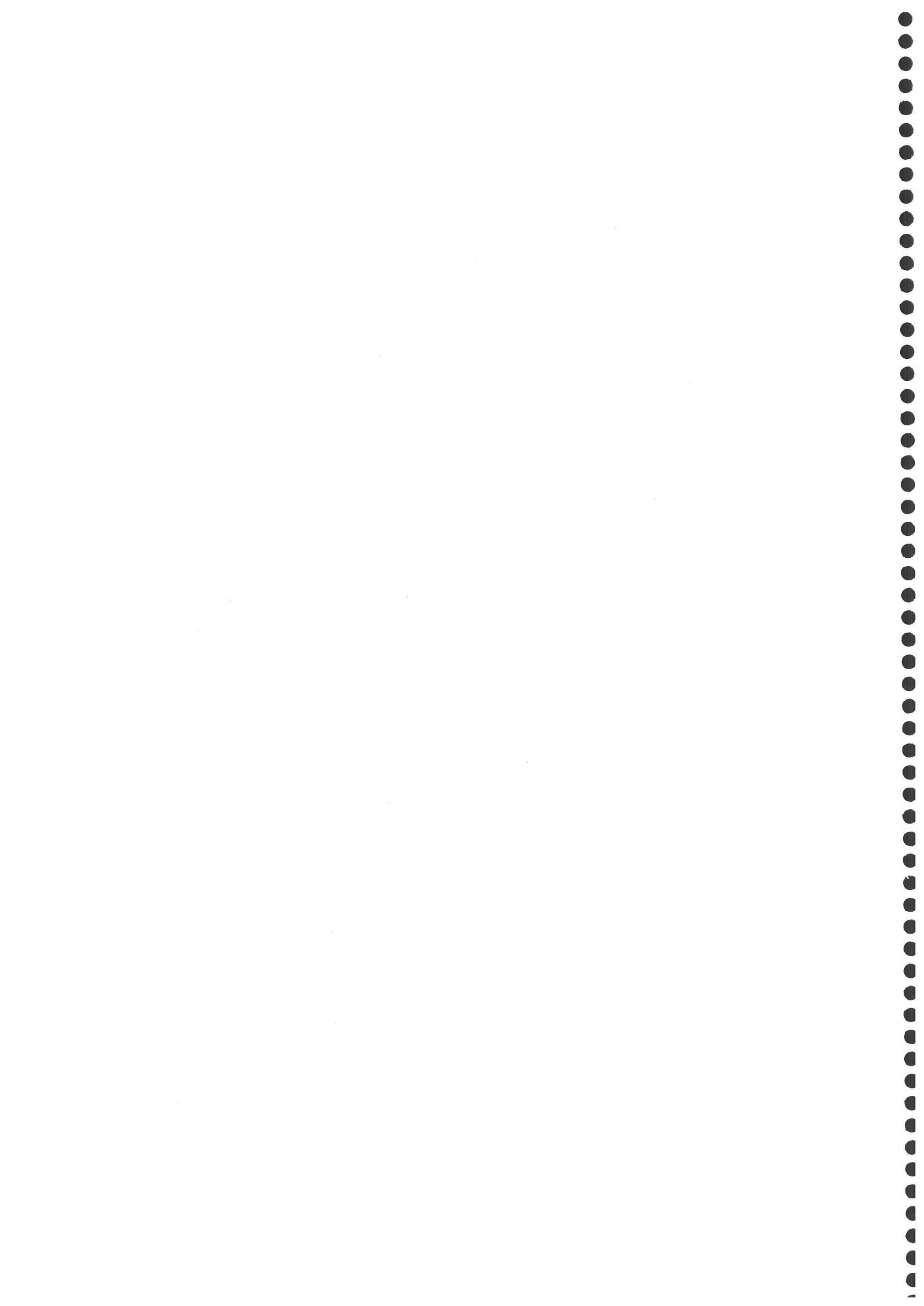
Three PAHs (ACE, PYR and BaP) have been selected as examples to show the influence of pH over the interaction analyte-resin. As can be seen in Figure 2 there are no significant differences in the interaction between the three analytes at the three pHs tested (an acid value (pH =3), a neutral value (pH = 7) and a basic value (pH = 12)) because the graph shapes at the three pH values for each analyte are very similar so we can conclude that the interaction of the three analytes with the five resins tested is independent of the pH values.

Bearing these conclusions in mind, we have chosen pH = 7 for the rest of the experimental work to simplify the methodology.

In solid-surface room temperature fluorescence a solid support to carry out the interaction with the analyte is necessary to concentrate the emission fluorescence intensity in a small area for measurement. Many resins could be used as a solid surface, however, as the analytes do not have ionisable groups, non-ionic exchangers (Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4, Amberlite XAD 7, Silica Gel Davisil and Silica Gel Merck) were selected to carry out the characterization of PAHs by solid-surface fluorescence. These solid surfaces have a high capacity to pre-concentrate the PAHs when they are at low concentrations. Thus the retention capacity of the solid surfaces tested has been considered the same as the experimental conditions used.

The organic solvent presents in the sample is an important experimental variable because it helps to dissolve the analyte and impedes the retention of the analyte in the flow system, guaranteeing that the all injected analyte reaches the solid surface. Moreover, in the development of optosensors, the carrier and the samples must be as identical as possible, so organic solvents miscible with water (ethanol, methanol, acetonitrile, acetone, dimethylformamide and 1,4-dioxane) are selected in the study of the effect of the organic solvents over the fluorescence emission intensity of sixteen EPA-PAHs at pH 7 in solid-surface (Silica Gel Davisil, Silica Gel Merck, Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4 and Amberlite XAD 7).

In general, the presence of organic solvents in the samples affects the excitation and emission wavelengths, but in our case, the analyte is retained by the solid surface and the organic solvent passes through the flow cell. Therefore, the presence of organic



solvents in the samples does not significantly affect the maximum excitation and emission wavelengths of the PAHs.

The organic solvents affect the emission fluorescence intensity, e.g, when dimethylformamide is used with BaP at pH 7, the emission solid-surface fluorescence is four times higher than in ethanol or methanol and when acetonitrile is used with ACE at pH 3, the emission solid-surface fluorescence is five times higher than dimethylformamide or 1,4-dioxane (see Figure 2).

Under these conditions, the differences between the fluorescence signal of PAHs and the background of the resins were measured at the maxima excitation and emission wavelength of each PAH. Figure 3 shows the results obtained.

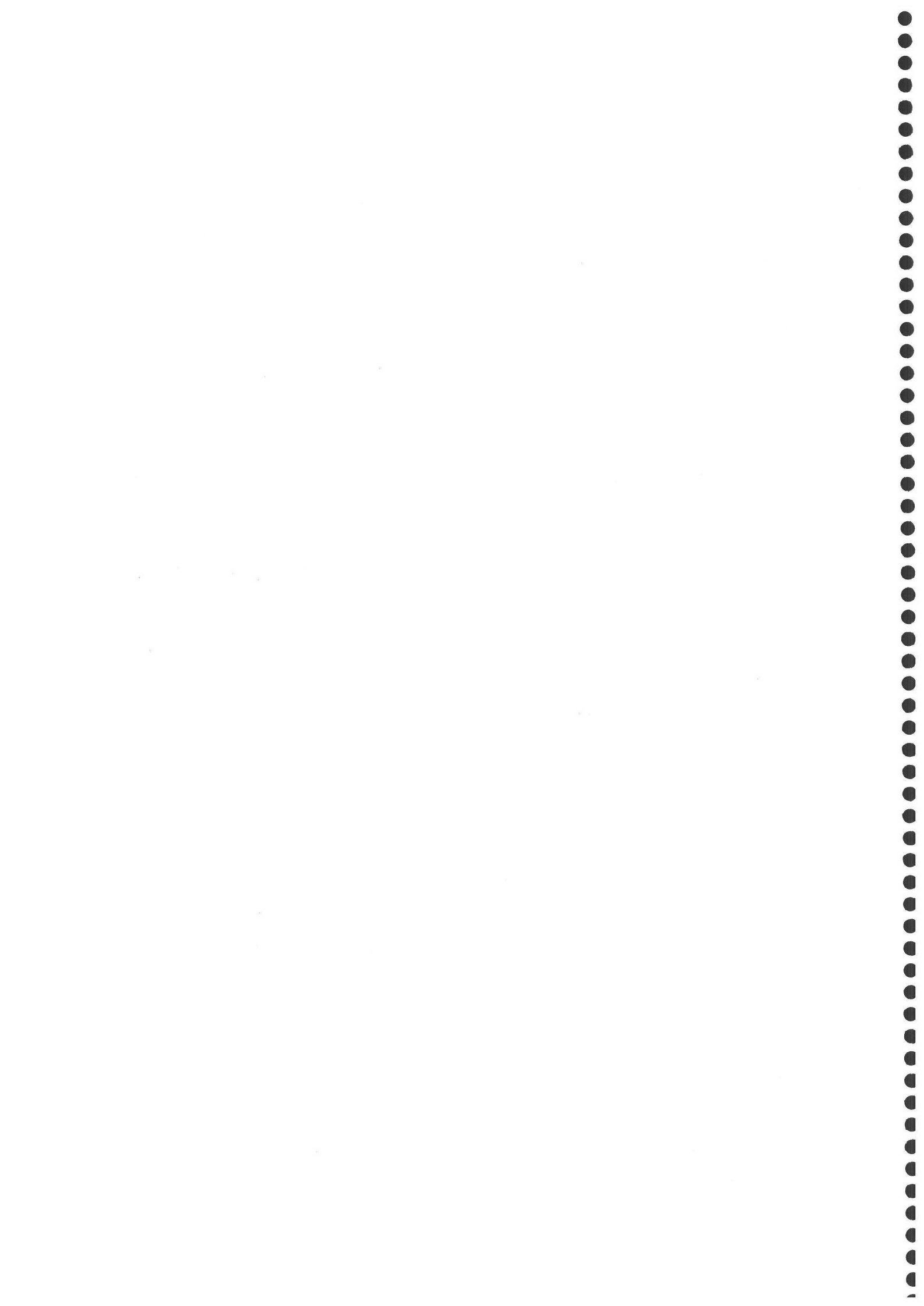
To consider the whether interaction analyte-exchanger resin is effective or ineffective, we have taken that if the signal-background difference is higher than 10% of the highest fluorescence intensity, the PAH-resin interaction is effective, while if is less than 10% the interaction is considered to be ineffective. The results obtained as YES/No for all the analytes under study is summarised in Table 3.

NAPH, ACEN, CHRY, IcdP and BghiP do not interact with any tested solid support. ACE, FLU, PHE, PYR, BaA, BkF and DbahA interact only with Amberlite XAD 7. ANT, FLT and BaP interact only with Amberlite XAD 2, Amberlite XAD 4 and Amberlite XAD 7, and BbF interacts with all the resins tested.

In general, we have observed that when an analyte interacts with Amberlite XAD 2 it also interacts with Amberlite XAD 4 and the emission intensities on Amberlite XAD 2 and Amberlite XAD 4 are very similar. However, the interaction with Amberlite XAD 2 or Amberlite XAD 4 does not imply an interaction with Amberlite XAD 7. This is due to Amberlite XAD 2 and Amberlite XAD 4 having a styrene and divinylbenzene matrix and Amberlite XAD 7 having a polymethacrylate matrix [23].

4. Conclusion.

The results shows, it is possible to develop future sensors for a screening test of ANT, FLT, BbF and BAP using non-ionic exchanger Amberlite XAD 2 or Amberlite XAD 4 and another for the screening of ACE, FLU, PHE, ANT, FLT, PYR, BaA, BkF, BbF, BaP and DbahA with Amberlite XAD 7 as the solid support. The detection of limits obtained in the screening test of ANT, FLT, BbF and BAP using Amberlite XAD



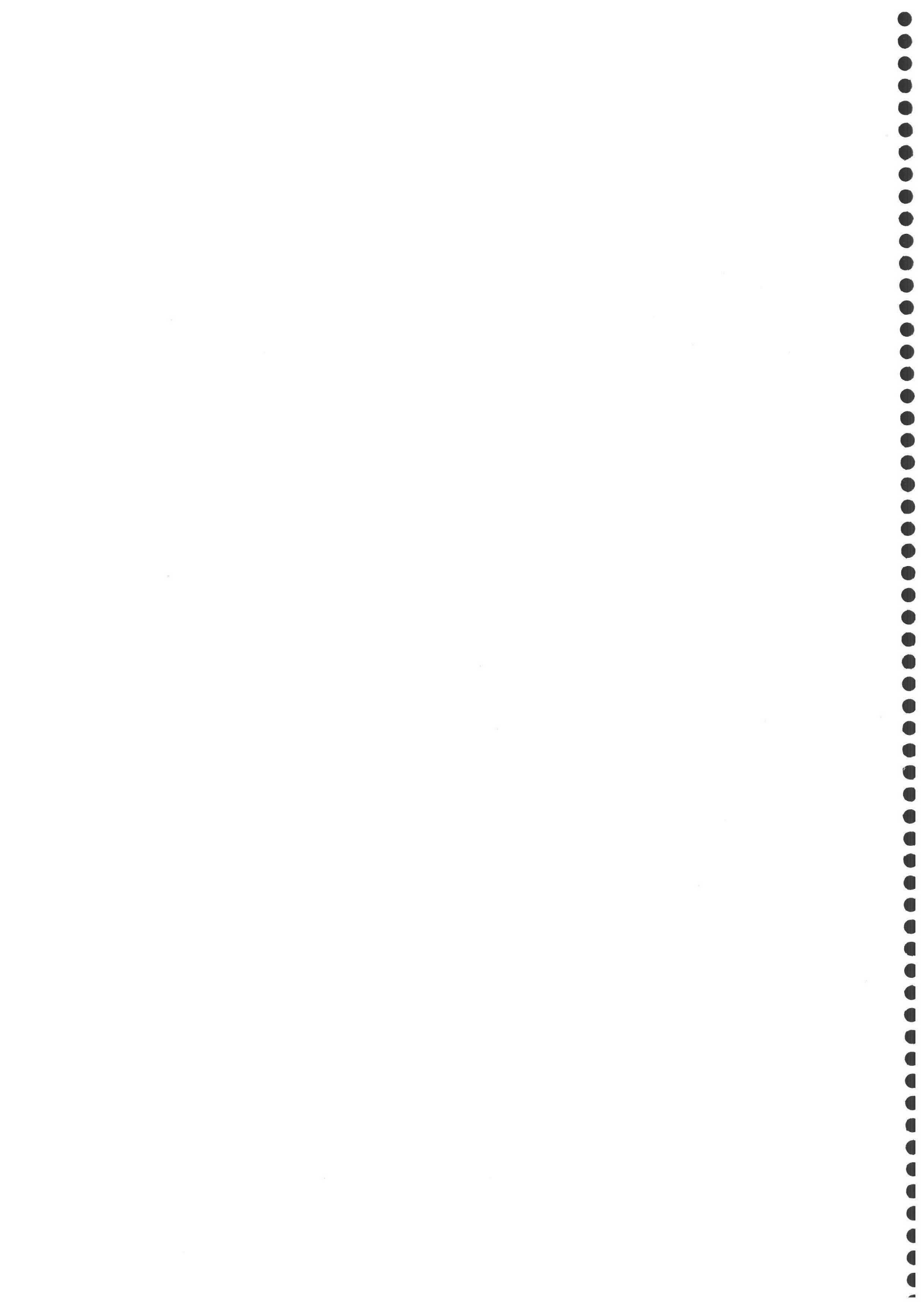
4 as solid-surface and in presence of 25% of 1,4-dioxane as organic solvent are between 7 and 18 ng mL⁻¹ [24]. The development of selective solid-surface fluorescence sensor would be a easy task for environmental control.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge the financed support of Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project PPQ2000-1291-C02-01) and the grant support of Consejería de Medio Ambiente de la Junta de Andalucía (Agreement no. 1870).

References

- [1] A. Mellone, B.W. Smith, J.D. Winefordner, *Talanta* 37 (1990) 111.
- [2] S. Vázquez Troche, M.S. García Falcón, S. González Amigo, M.A. Lage Yusty, J. Simal Lozano, *Talanta* 51 (2000) 1069.
- [3] S. Hoffman, I. Schmelz, S.S. Hecht, E.L. Wynder, *Polycyclic Hydrocarbons and Cancer*, vol. 1, Academic Press, New York, 1978, pp. 85-117.
- [4] C. Jonson, A. Greenberg, *J. Chromatogr. B* 728 (1999) 209.
- [5] M.L. Lee, M. Novotny, K.D. Bartle, *Analytical Chemistry of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Academic Press, New York, 1981.
- [6] A. Bjorseth, *Handbook of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons*, Dekker, New York, 1983.
- [7] European Directive 98/83/EC.
- [8] B.O.E. n° 178, pp.27398.
- [9] H.P. Nirmaier, E. Fisher, A. Meyer, G. Henze, *J. Chromatogr. A*, 730 (1996) 169.
- [10] G. Michor, J. Carron, S. Bruce, D.A. Cancilla, *J. Chromatogr. A*, 732 (1996) 85.
- [11] T.A. Mastran, A.M. Dietrich, D.L. Gallagher, T.J. Grizzard, *Water Res.*, 28 (1994) 2353.
- [12] G.A. Junk, J.J. Richard, *Anal. Chem.*, 60 (1988) 451.
- [13] D.W. Potter, J. Pawliszyn, *Environ. Sci. Technol.*, 28 (1994) 298.
- [14] R.J. Hurtubise, *Solid Surface Luminescence Analysis*, Dekker, New York, 1981.
- [15] T. Vo-Dinh., *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis*, Wiley, New York, 1984.
- [16] A.E. Eroğlu, M. Volkan, O.Y. Ataman, *Talanta* 53 (2000) 89.



- [17] R.J. Hurtubise, *Anal. Chim. Acta* 351 (1997) 1.
- [18] T. Vo-Dinh, J. Fetzer, A.D. Campiglia, *Talanta* 47 (1998) 943.
- [19] J.L. Whitcomb, A.D. Campiglia, *Talanta* 55 (2001) 509.
- [20] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego, *Trends Anal. Chem.* 18 (1999) 685.
- [21] B. San Vicente de la Riva, J.M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, *Anal. Chim. Acta* 451 (2001) 203.
- [22] J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez, *Anal. Chim. Acta* 462 (2002) 217.
- [23] J. Paleos, *Journal of Colloid and Interface Science* 31 (1969) 7.
- [24] J.F. Fernández Sánchez, A. Segura Carretero, C. Cruces Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *Abstract Book of 9th International Meeting on Chemical Sensors* (2002), pp 314.

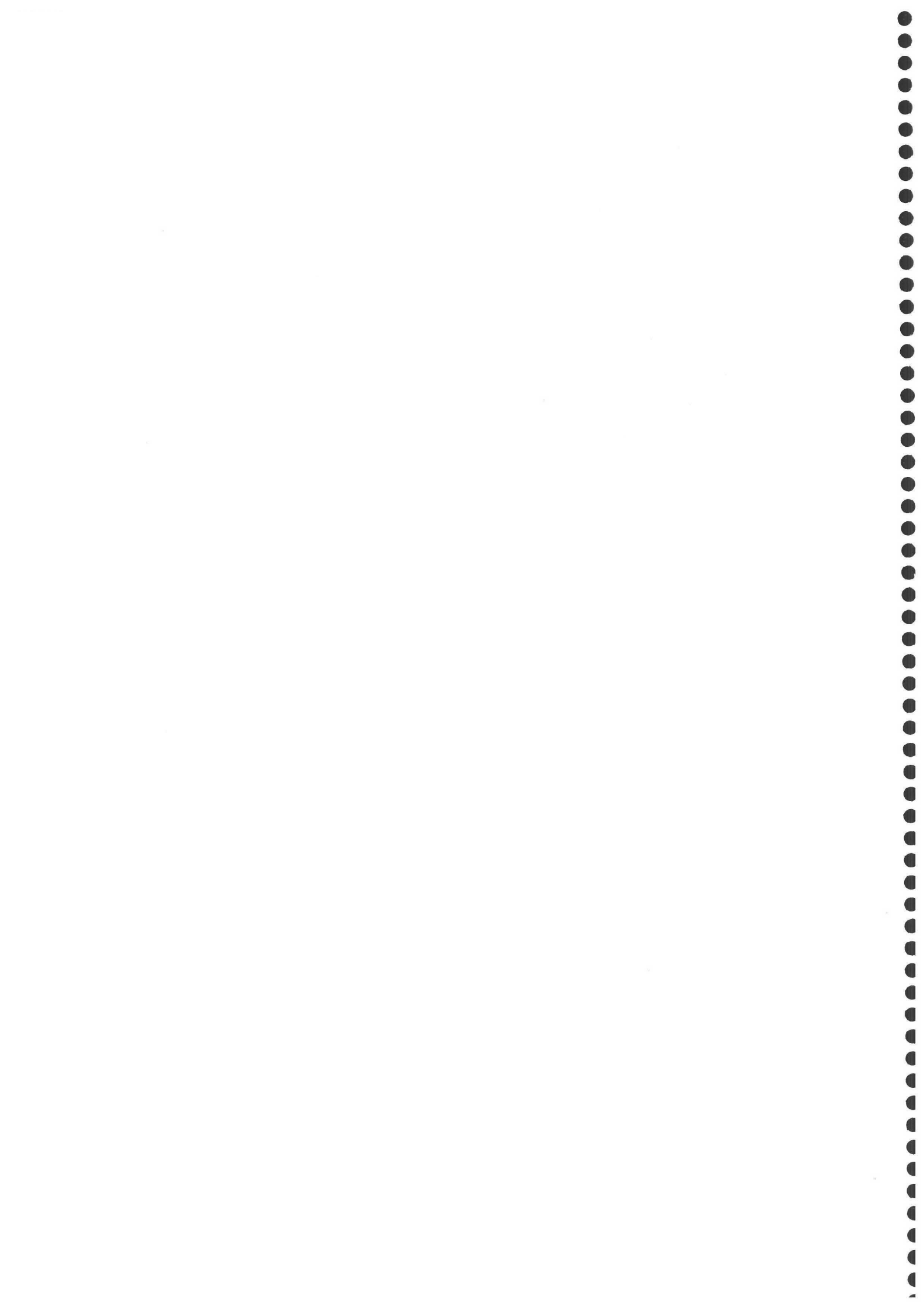


Table 1.

EPA-PAH names, chemical structures, abbreviations and fluorescence characteristics




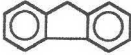
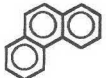
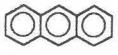
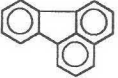

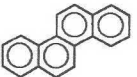
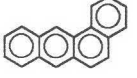
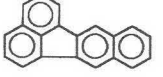
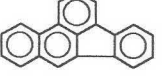



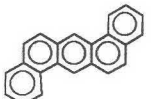
Name	Chemical Structure	Abbreviations	$\lambda_{\text{exc/em}}$ (nm)
Naphthalene		NAPH	286/322
Acenaphthylene		ACEN	292/324
Acenaphthene		ACE	292/322
Fluorene		FLU	290/304
Phenanthrene		PHE	294/364
Anthracene		ANT	358/402
Fluoranthene		FLT	358/460
Pyrene		PYR	300/406
Chrysene		CHRY	322/386
Benzo(a)anthracene		BaA	288/388
Benzo(k)fluoranthene		BkF	308/414
Benzo(b)fluoranthene		BbF	358/446
Benzo(a)pyrene		BaP	386/406
Indeno(1,2,3-cd)pyrene		IcdP	362/496
Benzo(ghi)perylene		BghiP	336/394
Dibenzo(a,h)anthracene		DBahA	304/404

Table 2.

Characterization of PAHs by solid-surface fluorescence

	Silica Gel Davisil	Silica Gel Merck	Amberlite XAD 2	Amberlite XAD 4	Amberlite XAD 7
NAPH	-	-	-	-	-
ACEN	-	-	-	-	-
ACE	-	-	-	-	✓
FLU	-	-	-	-	✓
PHE	-	-	-	-	✓
ANT	-	-	✓	✓	✓
FLT	-	-	✓	✓	✓
PYR	-	-	-	-	✓
CHRY	-	-	-	-	-
BaA	-	-	-	-	✓
BkF	-	-	-	-	✓
BbF	✓	✓	✓	✓	✓
BaP	-	-	✓	✓	✓
IcdP	-	-	-	-	-
BghiP	-	-	-	-	-
DBahA	-	-	-	-	✓

✓ The analyte interacts with the reagent phase and emits fluorescence on solid surface.

- The analyte does not interact with the reagent phase and/or does not emit fluorescence.

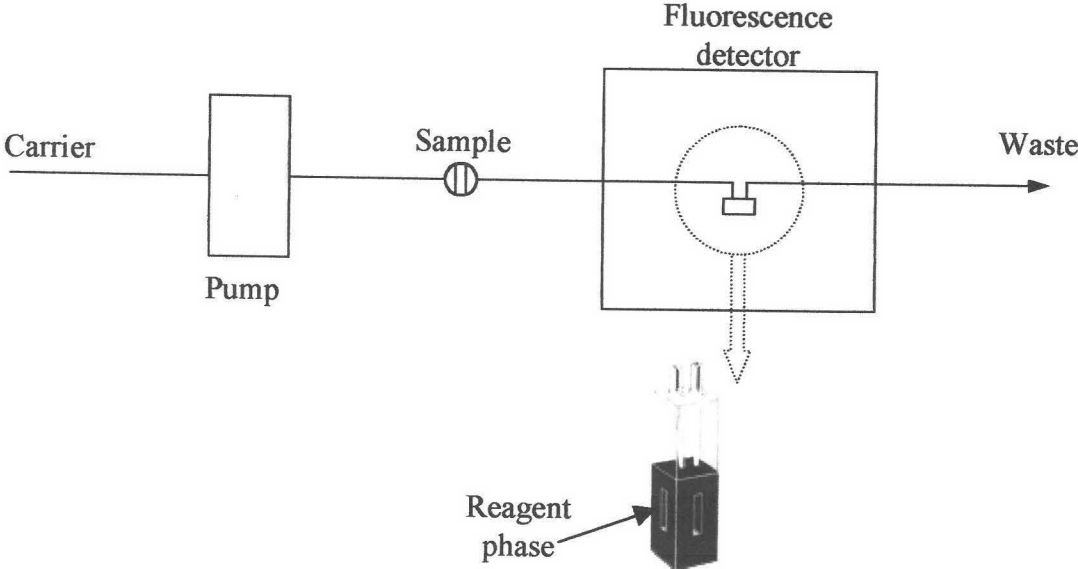
Caption figures.

Fig. 1. Flow manifold used.

Fig. 2. Effect of pH on the solid-surface fluorescence intensity in ■ ethanol, ■ acetone, □ acetonitrile, ▨ dimethylformamide, ▩ 1,4-dioxane and ▪ methanol. [PAH] = 600 ng mL⁻¹, 10% of organic solvent.

Fig. 3. Characterization of PAHs by solid-surface fluorescence. [PAH] = 600 ng mL⁻¹, 10% of organic solvent.

Figure 1



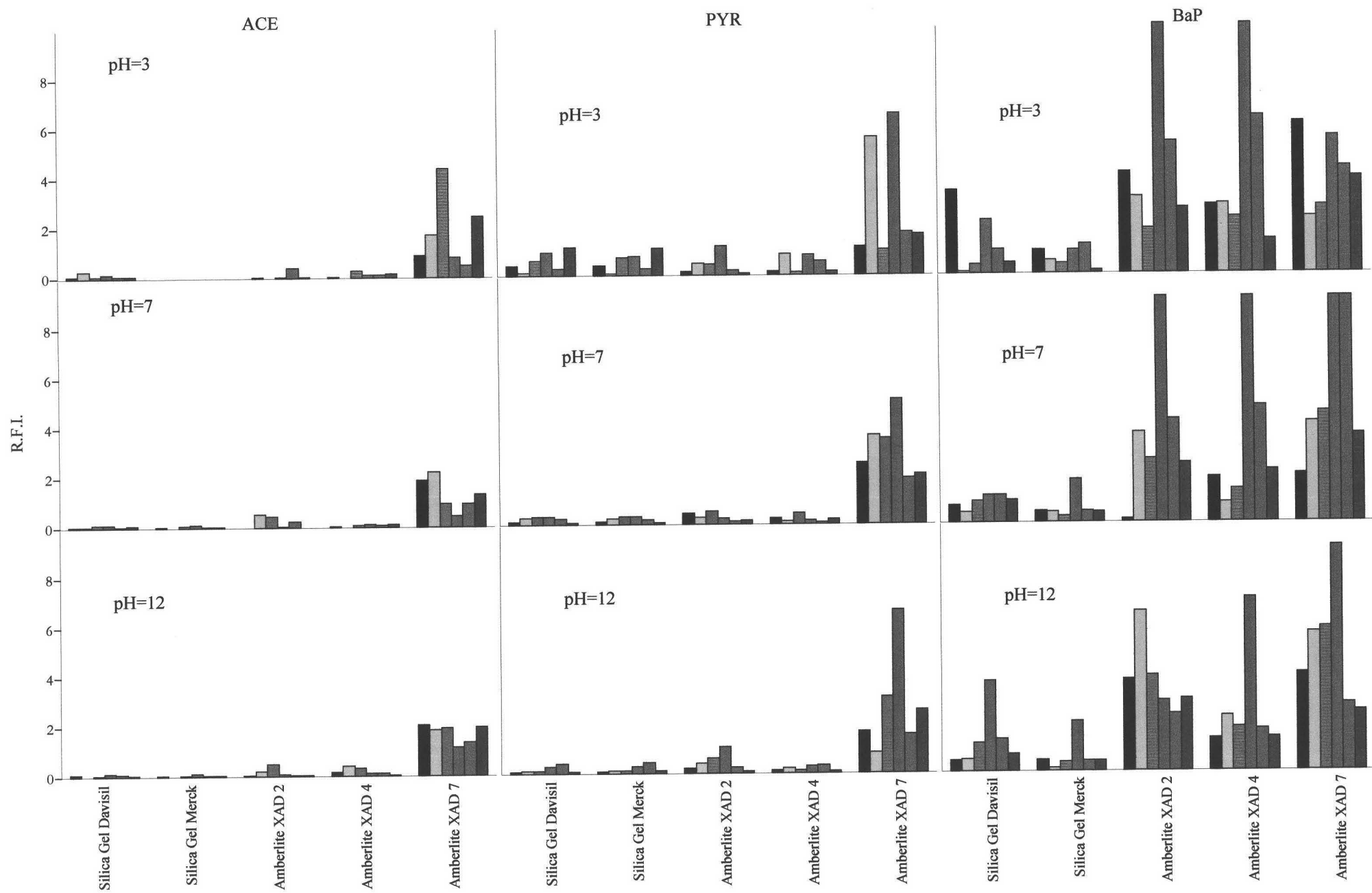


Figure 2

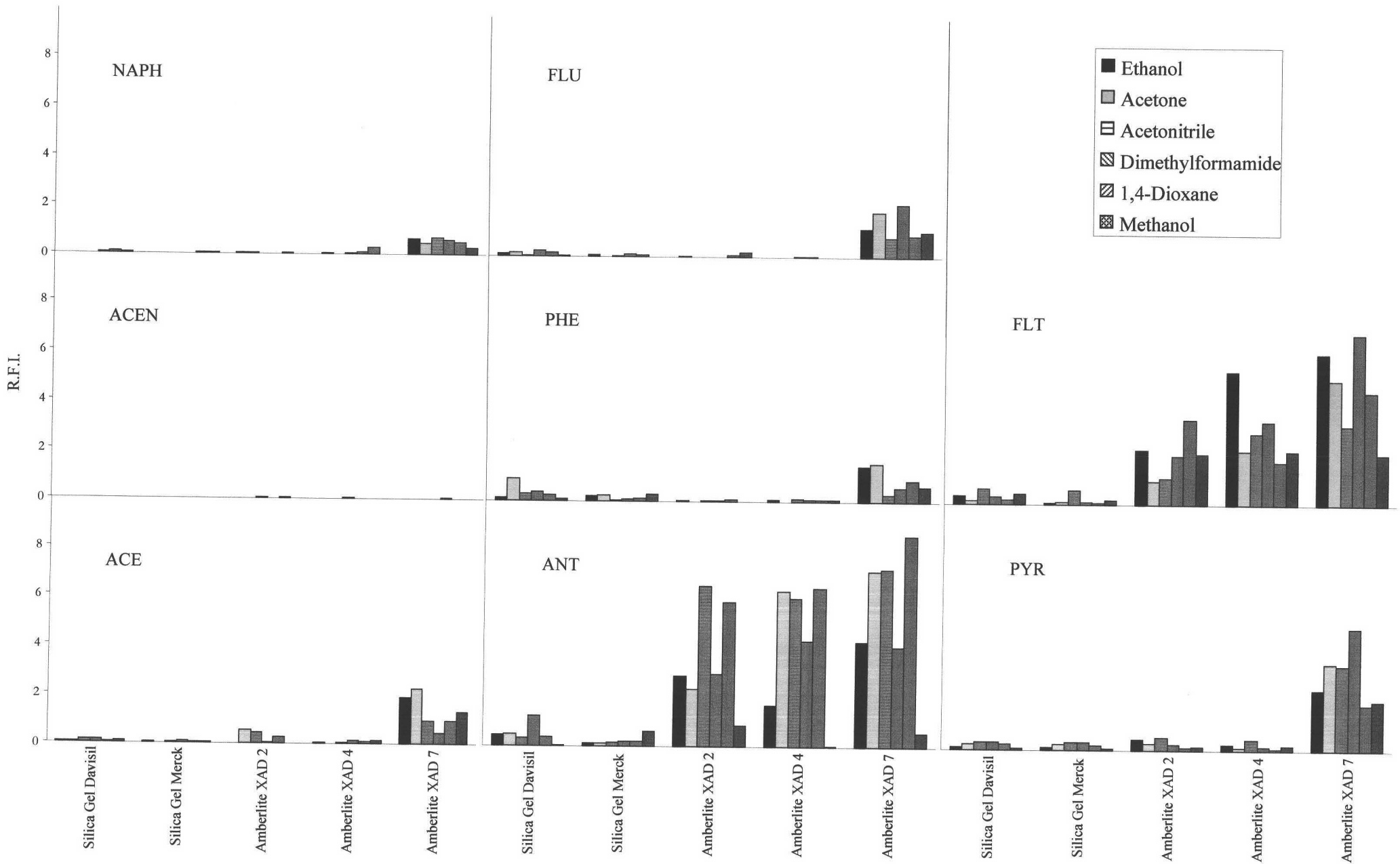


Figure 3

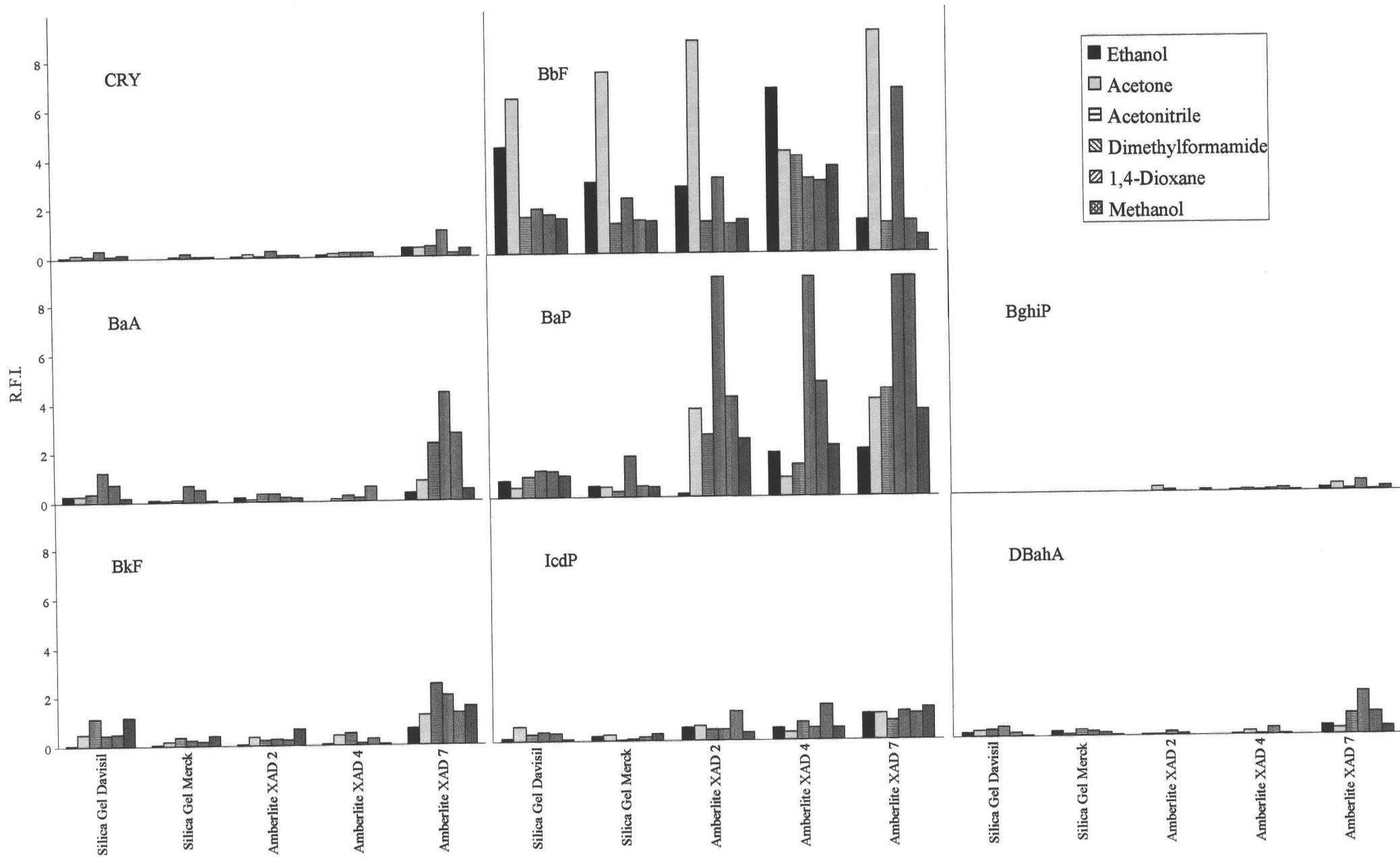
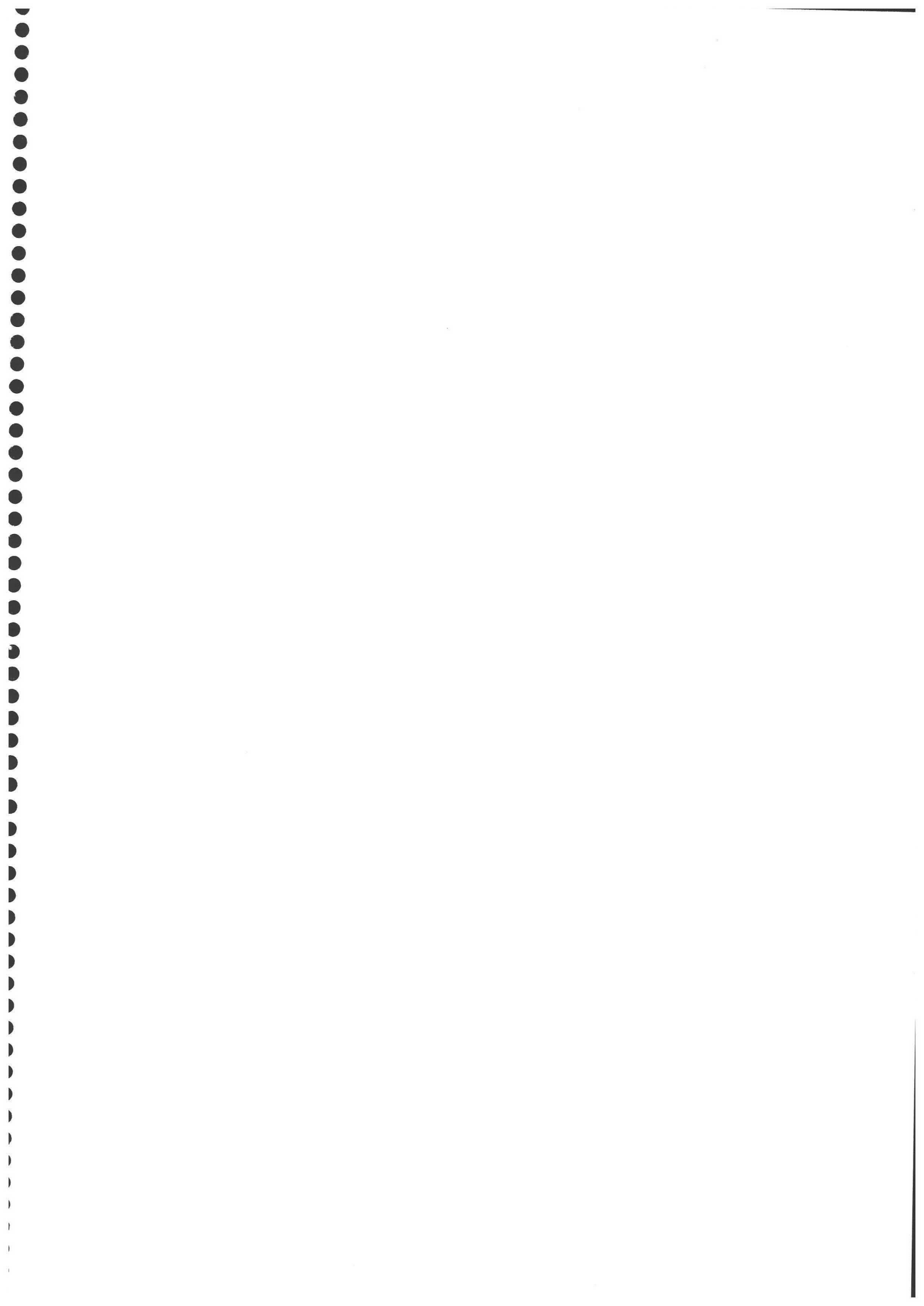


Figure 3
(Continuation)





Biblioteca Universitaria de Granada



0106680