



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Universidad de Extremadura

Facultad de Ciencias

TESIS DOCTORAL

**NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y OTROS
PRINCIPIOS ACTIVOS EN ALIMENTOS, FORMULACIONES ZOOSANITARIAS Y
FLUIDOS BIOLÓGICOS**

Diego Bohoyo Gil

Badajoz, 2005

***Edita: Universidad de Extremadura
Servicio de Publicaciones***

Caldereros 2. Planta 3^a
Cáceres 10071
Correo e.: publicac@unex.es
<http://www.unex.es/publicaciones>

**NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y OTROS PRINCIPIOS
ACTIVOS EN ALIMENTOS, FORMULACIONES ZOOSANITARIAS Y FLUIDOS
BIOLÓGICOS**

por

Diego Bohoyo Gil

VISADO en Badajoz a 20 de Octubre de 2005

Fdo.- Dra. Dña. Maria del Carmen Mahedero García
Profesora Titular del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

Fdo.- Dr. Don Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo
Catedrático del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

Fdo.- Dra. Dña. Nielen Mora Diez
Profesora Contratada Doctor del Departamento de Química Analítica
Facultad de Ciencias. Universidad de Extremadura.

Memoria de Investigación presentada para optar al Grado de Doctor, dentro del Programa de Doctorado “Ciencias Químicas”, bienio 2001-2003, coordinado por el Departamento de Química Inorgánica de la Universidad de Extremadura.

Fdo.: Diego Bohoyo Gil



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

Campus Universitario
Ayda. de Elvas, s/n
06071-BADAJOS
Teléfono 924 289 300/924 289 375
FAX 924 289 375
E-mail: quiana@unex.es

ARSENIO MUÑOZ DE LA PEÑA CASTRILLO, Catedrático y Director del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura

INFORMA:

Que el trabajo que se presenta en esta TESIS DOCTORAL, con el título de **“NUEVOS MÉTODOS DE DETERMINACIÓN DE ANTIBIÓTICOS Y OTROS PRINCIPIOS ACTIVOS EN ALIMENTOS, FORMULACIONES ZOOSANITARIAS Y FLUIDOS BIOLÓGICOS”**, ha sido realizado bajo la dirección de la Dra. Dña. **M^a del Carmen Mahedero García**, el Dr. Don **Arsenio Muñoz de la Peña Castrillo** y la Dra. Dña. **Nielene Mora Diez** en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Extremadura y reúne todos los requisitos para poder optar al Grado de Doctor en Ciencias Sección de Químicas.

Badajoz, 20 de Octubre de 2005

Este Trabajo ha sido realizado gracias a la financiación de la Junta de Extremadura y del Fondo Social Europeo, mediante la concesión de una beca predoctoral

JUNTA DE EXTREMADURA

JUNTA DE EXTREMADURA



Objeto de la Tesis Doctoral

El presente Trabajo de Investigación tiene como objeto el desarrollo de nuevos métodos de determinación analítica de distintos antibióticos y principios activos de interés. La técnica de trabajo utilizada en todos los métodos analíticos es la luminiscencia molecular. Los compuestos determinados incluyen antibióticos de la familia de las tetraciclinas y sulfamidas; antiinflamatorios y anticancerígenos. Los métodos se han aplicado a muestras de interés alimentario (mieles), formulaciones zoonosanitarias y fluidos biológicos (orina y suero). Se han utilizado distintas estrategias instrumentales (fluorescencia fotoinducida), químicas (fluorescencia sensibilizada, medios micelares, ciclodextrinas) y quimiométricas (técnicas de derivadas, métodos de calibración multivariante) para el establecimiento de los métodos de análisis. Entre estos últimos podemos citar métodos de primer orden (PLS), segundo orden (PARAFAC, SWATLD, BLLS/RBL, n-PLS, Unfolded-PLS) y tercer orden (PARAFAC, TLLS/RTL y Unfolded-PLS/RTL). Los métodos desarrollados presentan un indudable interés desde el punto de vista de su aplicación agroalimentaria y farmacológica, al permitir nuevos procedimientos de análisis sencillos y sensibles. Los métodos TLLS y Unfolded-PLS/RTL, que permiten la utilización de datos de cuatro vías, han sido desarrollados en este Trabajo. Dichos métodos suponen un avance importante dentro de los métodos quimiométricos de calibración multivariante y un campo de investigación de muy reciente actualidad y aún en desarrollo, siendo los únicos métodos alternativos a PARAFAC para datos de cuatro vías.

INTRODUCCIÓN. PRESENTACIÓN DE CAPÍTULOS.....	21
APARATOS, REACTIVOS Y PROGRAMAS INFORMÁTICOS.....	25

Capítulo 1.- DETERMINACIÓN DE DEMECLOCICLINA Y METACICLINA EN FLUIDOS BIOLÓGICOS USANDO FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA POR LANTÁNIDOS (FSL).

1.- TETRACICLINAS

• Introducción	30
• Origen y química	31
• Propiedades fisicoquímicas	33
• Tipos de tetraciclina	34
• Mecanismo de acción	35
• Espectro antibacteriano	35
➤ Demeclociclina	
• Introducción y estructura	36
• Antecedentes bibliográficos	37
➤ Metaciclina	
• Introducción y estructura	39
• Antecedentes bibliográficos	39

2.- LUMINISCENCIA MOLECULAR

• Fundamentos.....	43
<i>Diagrama de Jabloski</i>	45
<i>Estado triplete</i>	47
<i>Acoplamiento spín-orbital</i>	47

➤ FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA POR LANTÁNIDOS (FSL)	
• Fundamento	49
• Factores que afectan a FSL.....	53
• Antecedentes bibliográficos.....	55
3.- DETERMINACIÓN DE DEMECLOCICLINA Y METACICLINA POR FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA POR LANTÁNIDOS	
• Estudios previos.....	57
• Estabilidad de disoluciones.....	58
• Influencia de la presencia de EDTA	59
• Influencia del pH	60
• Influencia de la concentración de tampón	61
• Influencia de la naturaleza del surfactante.....	62
• Influencia de la concentración de surfactante.....	64
• Influencia de la concentración de Eu (III)	65
• Influencia de la concentración de demeclociclina. Estequiometría del complejo	66
• Recta de calibrado y parámetros de calidad	68
• Influencia de la concentración de metaciclina .Estequiometría del complejo metaciclina-Eu (III).....	76
• Recta de calibrado y parámetros de calidad	78
• Aplicaciones. Determinación en orina y suero	80
4.- CONCLUSIONES	86
Bibliografía.....	87

**Capítulo II.- ESTUDIOS LUMINISCENTES DE SULFATIAZOL Y SULFANILAMIDA.
DETERMINACIÓN EN FÁRMACOS Y MIELES.**

1.- SULFAMIDAS

- Propiedades fisico-químicas93
- Mecanismos de acción94
- Síntesis y clasificación95
- Mezclas de sulfamidas, toxicidad y efectos secundarios95
- ✓ Análisis de sulfamidas por fluorescencia inducida
fotoquímicamente.....97

2.- FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE (PIF)

- Fundamentos teóricos 99
- Reacciones fotoinducidas..... 102
- Instrumentación..... 103
- Aplicaciones de fluorescencia inducida fotoquímicamente 107
- Análisis de sulfatiazol y sulfanilamida 109

3.- ESPECTROSCOPIA DE DERIVADAS 111

4.- ESTUDIO DE SULFATIAZOL MEDIANTE FLUORESCENCIA INDUCIDA
FOTOQUÍMICAMENTE

- Elección del disolvente 115
- Espectros de excitación y emisión 116
- Influencia del contenido de agua y del tiempo de irradiación 117
- Influencia del pH 122
- Influencia de la concentración de tampón 124
- Estabilidad del fotoproducto..... 125
- Estabilidad de las disoluciones 126
- Influencia de la concentración de sulfatiazol..... 127
- Recta de calibrado. Parámetros de calidad 128

5.- DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL MEDIANTE UTILIZACIÓN DE SEÑALES DERIVADAS DE LA FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE	
• Influencia del filtrado y de $\Delta\lambda$	130
• Selección de la longitud de onda de medida.....	132
• Influencia de la concentración de ST.....	132
• Recta de calibrado. Parámetros de calidad	133
• Métodos operatorios	135
• Aplicación de los métodos.....	136
Determinación de sulfatiazol en fármacos	136
Determinación de sulfatiazol en mieles	137
6.- DETERMINACIÓN DE SULFANILAMIDA EN PRESENCIA DE SULFATIAZOL	
• Espectros de excitación y emisión.....	142
• Estabilidad de las disoluciones	143
• Influencia de la concentración de sulfanilamida.....	143
• Rectas de calibrado. Parámetros de calidad.....	144
• Determinación de sulfanilamida en presencia de sulfatiazol.....	146
Influencia del filtrado y de $\Delta\lambda$	148
Selección de la longitud de onda de medida.....	149
Influencia de la concentración de sulfanilamida.....	150
Recta de calibrado. Parámetros de calidad.....	151
Rango de aplicación.....	152
Recta de calibrado.....	154
Método operatorio.....	154
Aplicación. Determinación en fármacos.....	155
7.- CONCLUSIONES	156
Bibliografía	157

Capítulo III.- DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MIELES MEDIANTE MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEANDO DATOS DE PRIMER Y SEGUNDO ORDEN

1.- INTRODUCCIÓN	162
➤ Análisis Multivariante de Primer Orden	163
• Método CLS (análisis multicomponente clásico)	168
• Método ILS (Regresión inversa por mínimos cuadrados)	169
Descomposición espectral	
• Análisis por componentes principales (PCA)	170
• Método PCR o regresión por componentes principales	172
• Método PLS o mínimos cuadrados parciales	173
Optimización del número de factores (loadings)	175
• Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR y PLS.....	179
➤ Análisis Multivariante de Segundo Orden	
• Tipos de datos analíticos	180
• Datos multivariantes	184
• Técnica de desdoblamiento (Unfolding).....	185
• Modelos trilineales	186
PARAFAC	187
- Estructura.....	188
- Unicidad.....	190
N-PLS	192
• Número de componentes.....	194
• Aspectos relacionados con las características de PLS, N-PLS y PARAFAC	197
SWATLD	202
- Modelo y algoritmo	204

2.- DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MIELES MEDIANTE MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEANDO DATOS DE PRIMER Y SEGUNDO ORDEN.....	210
• Conjunto de calibración y conjunto de validación	212
• Análisis de las matrices de excitación-emisión fluorescentes	213
• Método de calibración y validación del conjunto de predicción	215
• Aplicación al análisis de sulfatiazol en muestras de mieles	216
• Selección del número de factores	219
• Parámetros de calidad.....	223
3.-CONCLUSIONES	226
Bibliografía.....	227

Capítulo IV.- ESTUDIOS ESPECTROFLUORIMÉTRICOS DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE SULFAMETOXAZOL Y SULFAGUANIDINA CON β -CICLODEXTRINA. DETERMINACIÓN EN ORINA Y MIEL

1.- INTRODUCCIÓN. CICLODEXTRINAS	
• Estructura y propiedades	231
• Formación de complejos de inclusión	237
• Toxicidad.....	241
• Aplicaciones industriales y farmacéuticas.....	242
• Aplicaciones analíticas	246
• Interacción de sulfamidas con ciclodextrinas	248
• Análisis de sulfametoxazol y Sulfaguanidina.....	251

2.- PARTE EXPERIMENTAL

- Influencia de la concentración de β -ciclodextrina..... 254
- Influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia de los complejos SMTX:
 β -CD y SGN: β -CD..... 256
- Influencia del contenido de etanol en el medio 258
- Influencia de la concentración de SMTX y SGN..... 259
- Estabilidad de las disoluciones de trabajo y de los complejos de inclusión
formados..... 260
- Rectas de calibrado. Parámetros de calidad 260
- Estequiometría y constante de formación de los complejos de inclusión SMTX:
 β -CD y SGN: β -CD..... 262
 - Cálculo de la estequiometría de los complejos en presencia y
ausencia de etanol
 - Método de Benesi-Hildebrand..... 265
 - Método de Scatchard..... 272
 - Cálculo de las constantes de formación de los complejos en presencia
y ausencia de etanol
 - Método de Benesi-Hildebrand 275
 - Método de Scatchard..... 276
 - Método de Regresión No Lineal 277
- Estructura de los complejos de inclusión 280
- Estudio mediante modelación molecular..... 281
- Determinación multivariante mediante PLS. Matriz de Calibración 285
 - Determinación del número óptimo de factores..... 289
 - Análisis de SGN mediante PLS..... 289
 - Cálculo de los parámetros de calidad 292
 - Análisis de SMTX mediante PLS 294
 - Cálculo de los parámetros de calidad 296
 - Determinación simultánea de SGN y SMTX en orina 298

✓ ESTUDIOS FLUORESCENTES DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN DE SGN: β -CD Y SMTX: β -CD EN PRESENCIA DE UREA

- Solubilización de β -CD en urea. Aplicaciones en luminiscencia molecular... 303
- Influencia de la concentración de β -ciclodextrina..... 308
- Influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia de los complejos SMTX:
 β -CD y SGN: β -CD..... 310
- Influencia de la concentración de SMTX y SGN..... 312
- Estabilidad de las disoluciones problemas y de los complejos de inclusión
formados..... 313
- Rectas de calibrado. Parámetros de calidad 314
- Estequiometría y constante de formación de los complejos de inclusión SMTX:
 β -CD y SGN: β -CD..... 315
 - Cálculo de la estequiometría de los complejos
 - Método de Benesi-Hildebrand..... 316
 - Método de Scatchard..... 319
 - Cálculo de las constantes de formación de los complejos
 - Método de Benesi-Hildebrand 320
 - Método de Scatchard..... 321
 - Método de Regresión No Lineal 322
- Estudio mediante modelación molecular..... 323

Determinación de SGN en mieles y determinación de ésta en presencia de SMTX en mieles, utilizando métodos de calibración de segundo orden, aplicando adición patrón (PARAFAC-IS)

- Análisis de las matrices excitación-emisión. Selección del rango de trabajo . 324
- Determinación de SGN en muestras de miel..... 326
 - Selección del número de factores 328

• Determinación de SGN en muestras de miel en presencia de SMTX333	
– Selección del número de factores.....	335
3.-CONCLUSIONES	340
Bibliografía.....	341

Capítulo V.- DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS MEFENÁMICO, MECLOFENÁMICO Y FLUFENÁMICO EN ORINA UTILIZANDO CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO ORDEN

1.- AGENTES ANTINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES	
– Clasificación.....	348
– Mecanismo de acción.....	348
– Efectos farmacológicos	349
– Farmacocinética	350
• Determinación de los ácidos meclofenámico, mefenámico y flufenámico.....	351
• BLLS	356
2.- DETERMINACIÓN DE LOS TRES ÁCIDOS	
• Estudios preliminares	360
• Estudio de linealidad. Rectas de calibrado	363
• Conjunto de calibración y conjunto de validación	364
• Análisis de las matrices de excitación-emisión fluorescentes. Selección de rangos espectrales.....	366
• Calibración multivariante empleando U-PLS y N-PLS	368
• Calibración multivariante empleando PARAFAC, SWATLD y BLLS	370
• Validación de métodos	370
• Determinación simultánea de los ácidos meclofenámico, mefenámico y flufenámico en muestras de orina.....	375

- Optimización de la extracción de los analitos en cloroformo	376
- Selección del número de factores	383
- Reproducibilidad	392
3.- CONCLUSIONES	395
Bibliografía	396

Capítulo VI.- DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS MECLOFENÁMICO Y FLUFENÁMICO EN ORINA UTILIZANDO SURFACTANTES Y CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE DE SEGUNDO ORDEN APLICANDO ADICIÓN PATRÓN (PARAFAC-IS Y SWATLD-IS)

1.- INTRODUCCIÓN. MEDIOS MICELARES

- Características y propiedades 401
- Aplicaciones analíticas 411

2.- PARTE EXPERIMENTAL

- Características fluorescentes de los ácidos mefenámico, meclofenámico y flufenámico en disolución acuosa..... 412
- Características fluorescentes en medios micelares 414
- Determinación de las constantes de acidez de los ácidos meclofenámico y flufenámico
 - Calibración del electrodo de membrana de vidrio..... 416
 - Valoraciones espectrofotométricas..... 416
 - Valoraciones espectrofotométricas en presencia de HTAB .. 427
 - Valoraciones espectrofluorimétricas 430
 - Valoraciones espectrofluorimétricas en presencia de HTAB 433

- Resultados y discusión	
Determinación de las constantes de ionización de MEC y FLU	
Estudios espectrofotométricos	436
Estudios espectrofluorimétricos	441
• Estudio del ácido meclofenámico en presencia de HTAB	
- Influencia de la concentración de HTAB	444
- Influencia del pH	445
• Estudio del ácido flufenámico en presencia de HTAB	
- Influencia de la concentración de HTAB	446
- Influencia del pH	447
• Estudio de linealidad. Rectas de calibrado	447
• Análisis de las matrices de excitación-emisión fluorescentes. Selección de los rangos espectrales	449
• Determinación de los ácidos meclofenámico y flufenámico en muestras de orina	
- Determinación del ácido flufenámico en muestras de orina..	453
Selección del número de factores.....	455
- Determinación del ácido meclofenámico en muestras de orina	461
Selección del número de factores.....	463
- Determinación de la mezcla de los ácidos meclofenámico y flufenámico	469
Selección del número de factores.....	471
3.- CONCLUSIONES	479
Bibliografía.....	480

**Capítulo VII.- MINIMOS CUADRADOS TRILINEARES Y UNFOLDED-PLS
ACOPLADOS CON TRILINEARIZACIÓN RESIDUAL (TLLS Y U-PLS/RTL)
NUEVAS HERRAMIENTAS QUIMIOMÉTRICAS PARA EL ANÁLISIS DE DATOS
INSTRUMENTALES DE CUATRO VÍAS**

1.- PTERIDINAS	482
• Características del ácido folínico o leucovorín.....	483
• Características del metotrexato.....	484
- Propiedades físicas y químicas	485
- Mecanismo de actividad quimioterápica	486
- Consideraciones terapéuticas.....	487
2.- ANALISIS MULTIVARIANTE DE TERCER ORDEN.....	489
3.- TEORÍA	
• PARAFAC	495
• TLLS	498
- Ventaja de segundo orden con TLLS	501
• UNFOLDED PLS/RTL.....	503
4.- CONJUNTOS DE CALIBRACIÓN Y DE VALIDACIÓN.....	504
5.- SIMULACIONES NUMÉRICAS.....	506
6.- SOFTWARE	510
7.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS	
• Simulaciones numéricas	511
• Sistema experimental.....	514
8.- CONCLUSIONES.....	518
Bibliografía.....	520

CONCLUSIONES..... 524

ANEXOS

Trabajos Publicados

- 1.- “Strategies for solving matrix effects in the analysis of sulfathiazole in honey samples using three-way photochemically induced fluorescent data” (*Talanta*, 2004, 65, 806)

- 2.- “Improvements in europium sensitized fluorimetric determination of demeclocycline and methacycline” (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 37, 1101)

- 3.- “Determination of sulphathiazole and sulphanylamine by photochemically induced fluorescence and first-derivative fluorescence” (*Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2005, 38, 349)

- 4.- “Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data” (*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2005)

- 5.- “Second Order Calibration of Excitation-Emission Matrix Fluorescence Spectra of N-phenylanthranilic Acid Derivatives Determination” (*Applied Spectroscopy*, en trámite de aceptación, 2005)

Trabajos Enviados

- 6.- “Fluorimetric simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in urine samples using second-order multivariate calibration and micellar medium” (*Analytica Chimica Acta*, Enviado)

Trabajos en redacción

- 7.- “Partial least squares multicomponent fluorimetric determination of the inclusion complexes of sulfaguanidine and sulfamethoxazole with β -cyclodextrin in urine”

Comunicaciones a Congresos

1.- “ X International Symposium on Luminiscence Spectrometry – Detection Techniques in Flowing Streams – Quality Assurance and Applied Analysis (ISLS 2002)”

Lugar de celebración y año.- Granada (España), Junio 2002

Tipo de participación.-Poster

Autores.- M.C. Mahedero, N. Mora, D. Bohoyo and F. Salinas

Título.- *Determination of sulfathiazole and sulphaniamide by photochemically induced fluorescence (RTPF) (F-40)*

2.- “10 th International Meeting on Recent Developments in Pharmaceutical Analysis (RDPA 2003)”

Lugar de celebración y año.- Cogne, Aosta (Italia), Junio 2003

Tipo de participación.-Poster

Autores.- M.C. Mahedero, N. Mora, D. Bohoyo and D. Gonzalez

Título.- : *Photochemically-induced fluorescent determination of sulfahiazole in Honey by using first-derivative signals and chemometrics (P-49)*

3.- “15 th International Symposium on Pharmaceutical and Biomedical Analysis (PBA 2004)”

Lugar de celebración y año.- Florencia (Italia), Mayo 2004

Tipo de participación.-Poster

Autores.- *M.C. Mahedero, D.Bohoyo, F.Salinas, T.Ardila, D.Airado and B.Roldán*

Título.- : *Determination of demeclocycline and methacycline by europium sensitized luminescence (P-291)*

4.- “EUROANALYSIS XIII “

Lugar de celebración y año.- Salamanca (España), Septiembre 2004

Tipo de participación.-Poster

Autores.- *M.C. Mahedero, N.Mora, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa, D. González and D.Bohoyo*

Título.- : *Comparison of two second-order methods for solving matrix effects in the analysis of sulfathiazole in honey samples using three-way data (P-219)*

5.- “9th Internacional Conference on Methods and Applications of Fluorescent Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF 9)”

Lugar de celebración y año.- Lisboa (Portugal), Septiembre 2005

Tipo de participación.-Poster

Autores.- *D.Bohoyo Gil, A. Muñoz de la Peña, A.Espinosa Mansilla, N.Mora Díez, A.C. Olivieri and G.M. Escandar*

Título.- : *Determination of mefenamic, flufenamic and meclofenamic acids in urine samples using excitation-emission matrices and second-order multivariate calibration (P-22)*

6.- “9th Internacional Conference on Methods and Applications of Fluorescent Spectroscopy, Imaging and Probes (MAF 9)”

Lugar de celebración y año.- Lisboa (Portugal), Septiembre 2005

Tipo de participación.-Poster

Autores.- *A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, D.Bohoyo Gil, A.C. Olivieri and J.A. Arancibia*

Título.- : *Trilinear least-squares coupled to residual trilinearization: a new chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data (P-132)*

A lo largo de esta Memoria se han desarrollado una serie de métodos de determinación analítica de diversos principios activos de interés, pertenecientes a diferentes familias, entre las que tenemos: tetraciclinas, sulfamidas, antiinflamatorios y anticancerígenos. La técnica de trabajo utilizada en todos los métodos analíticos es la luminiscencia molecular. Los métodos se han aplicado a muestras de interés alimentario (mieles), formulaciones zoosanitarias y fluidos biológicos (orina y suero). Se han utilizado distintas estrategias instrumentales (fluorescencia fotoinducida), químicas (fluorescencia sensibilizada, medios micelares, ciclodextrinas) y quimiométricas (técnicas de derivadas, métodos de calibración multivariante) para el establecimiento de los métodos de análisis. Entre estos últimos podemos citar métodos de primer orden (PLS), segundo orden (PARAFAC, SWATLD, BLLS/RBL, n-PLS, Unfolded-PLS) y tercer orden (PARAFAC, TLLS/RTL y Unfolded-PLS/RTL). Los métodos desarrollados presentan un indudable interés desde el punto de vista de su aplicación agroalimentaria y farmacológica, al permitir nuevos procedimientos de análisis sencillos y sensibles.

En el **Capítulo I** se ha desarrollado un método para la determinación individual de dos antibióticos perteneciente a la familia de las tetraciclinas, metaciclina y demeclociclina, en muestras de suero. En este capítulo se hace una introducción a la familia de las tetraciclinas así como a la luminiscencia molecular como técnica de análisis, haciéndose especial énfasis en la *fluorescencia sensibilizada por lantánidos*, por ser la primera vez que se utiliza esta técnica en nuestro Departamento. Esta técnica ha permitido la determinación de dichas tetraciclinas, débilmente fluorescentes, en muestras que presentan una matriz compleja, como es el suero, con recuperaciones satisfactorias en todos los casos.

En el **Capítulo II** los antibióticos estudiados pertenecen a la familia de las sulfamidas. Se desarrollan métodos para la determinación de sulfatiazol en formulaciones zoosanitarias y en muestras de miel, utilizando como señal analítica la fluorescencia inducida fotoquímicamente y la primera derivada de dicha señal. También se establece un método para la determinación de sulfanilamida en presencia de sulfatiazol. En la introducción del capítulo se hace referencia a la familia de las sulfamidas, se desarrolla la teoría de la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente y se hace una referencia a las técnicas de derivación.

En el **Capítulo III** se introducen los métodos de calibración multivariantes, tanto de primer (PLS) como de segundo orden (U-PLS, N-PLS, PARAFAC y SWATLD), haciendo especial énfasis en los métodos de calibración multivariante que hacen uso de datos de tres vías, PARAFAC y SWATLD, al utilizar dichos métodos por primera vez en esta Memoria. En nuestro caso, los datos de tres vías utilizados son las matrices de excitación-emisión inducidas fotoquímicamente. Los métodos se aplican a la determinación de sulfatiazol en mieles, soslayando los problemas que presentan las técnicas de derivadas desarrolladas en el capítulo anterior, debido a que estos métodos aprovechan la denominada “*ventaja de segundo orden*”. Cabe mencionar que es la primera vez que se aplican en el Departamento, estas técnicas multivariantes de segundo orden, en el análisis de muestras de origen alimentario y la primera vez que se combina la Fluorescencia Inducida Fotoquímicamente con los Métodos de Calibración de Segundo Orden.

En el **Capítulo IV** se continúa con el estudio de la familia de las sulfamidas. En este capítulo se hace uso de nuevo de técnicas quimiométricas multivariantes, tanto de primer orden (PLS), como de segundo orden. En este último caso, se aplica como innovación el método de la adición estandar (PARAFAC-IS). Para conseguir un aumento de la señal de fluorescencia y, en consecuencia, un aumento de sensibilidad, se hace uso de medios organizados como son las ciclodextrinas y, para aumentar la solubilidad de éstas en agua, se utiliza urea. Se realiza un estudio detallado de los complejos de inclusión formados, determinándose sus estequiometrías y sus constantes

de formación. En la introducción del capítulo se hace un pequeño resumen sobre las características, propiedades y aplicaciones de las ciclodextrinas, así como de la utilización de urea. Los métodos puestos a punto se aplican a la determinación simultánea e individual de estas dos sulfamidas en muestras de orina utilizando calibración multivariante de primer orden (PLS), realizándose un estudio de la interferencia de trimetropin en la determinación de sulfametoxazol. El otro método desarrollado se aplica a la determinación de sulfaguanidina en mieles y a la determinación de ésta en presencia de sulfametoxazol.

En el **Capítulo V** se comienza el estudio de una serie de antiinflamatorios, en concreto, los ácidos mefenámico, meclofenámico y flufenámico. Estos ácidos presentan una alta fluorescencia en disolventes orgánicos como cloroformo. Se propone un método para la determinación simultánea o individual en muestras de orina, previa extracción en cloroformo, aplicando diferentes métodos de calibración de segundo orden, tales como N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS. Se concluye que se obtienen resultados más precisos con los métodos PARAFAC, SWATLD y BLLS, debido a que son estos métodos los que aprovechan la *ventaja de segundo orden*. En la introducción del Capítulo se describen las características de los antiinflamatorios, pero, además, se desarrolla el método multivariante BLLS/RBL, por ser la primera vez que se utiliza a lo largo de esta Tesis.

En el **Capítulo VI** se continua el estudio de los antiinflamatorios, esta vez en disolución acuosa. Se realiza un estudio de las propiedades fluorescentes de los ácidos meclofenámico y flufenámico, en presencia del surfactante catiónico, bromuro de hexadeciltrimetilamonio (HTAB), así como la determinación de las constantes de ionización de dichos ácidos tanto por espectrofotometría como por espectrofluorimetría. Se desarrolla un método para la determinación individual o simultánea de dichos analitos en muestras de orina, aplicando métodos de calibración de segundo orden y utilizando el método de la adición patrón para evitar el problema del fondo que produce la orina (PARAFAC-IS y SWATLD-IS). En la introducción del capítulo se describen

las características, propiedades y aplicaciones de los medios micelares. Asimismo, se desarrolla una nueva rutina, bajo el entorno MATLAB, llamada *pkfit*, utilizada para el cálculo de los valores de las constantes de ionización, así como para la obtención de las diversas gráficas que permiten visualizar la evolución de los espectros de las analitos durante las valoraciones, los puntos isobésticos, la distribución de especies, así como los errores cometidos.

En el **Capítulo VII**, los analitos objeto de estudio son anticancerígenos, en concreto, leucovorín y metotrexato. En este capítulo se introducen los métodos de calibración de tercer orden que hacen uso de datos de cuatro vías. En nuestro caso, estos datos serán la evolución cinética de matrices de excitación-emisión. Más concretamente, se utilizarán los datos que se obtienen cuando se sigue la evolución cinética de los productos fluorescentes resultantes de la oxidación de estos analitos con permanganato potásico. También utilizaremos datos obtenidos de simulaciones tipo Monte Carlo. Los datos obtenidos se analizarán por los dos nuevos métodos de tercer orden desarrollados en este capítulo, TLLS/RTL y Unfolded-PLS/RTL; y se comparan con el ya existente PARAFAC, encontrándose resultados similares en todos los casos. Podemos concluir que los dos nuevos métodos propuestos *aprovechan la ventaja de segundo orden*, pudiéndose utilizar para la determinación de analitos en presencia de interferencias no modeladas. En la introducción del capítulo se resumen brevemente las características de estos dos analitos y se desarrollan detalladamente los métodos de tercer orden TLLS/RTL, Unfolded-PLS/RTL y PARAFAC. Los métodos TLLS/RTL y Unfolded-PLS/RTL, que permiten la utilización de datos de cuatro vías, han sido desarrollados en este Trabajo. Dichos métodos suponen un avance importante dentro de los métodos quimiométricos de calibración multivariante y un campo de investigación de muy reciente actualidad y aún en desarrollo, siendo los únicos métodos alternativas a PARAFAC para datos de cuatro vías.

APARATOS

- Espectrofotómetro UV/Visible MILTON-ROY Spectronic 3000-Array con detección diode array, microordenador PC 386 incorporado y software propio Rapidsan
- Espectrofluorímetro Perkin Elmer Modelo LS-50B conectado via RS-232 a un ordenador PC
- Espectrofotómetro de luminiscencia SLM Aminco Bowman Series 2, equipado con dos lámparas de descarga de Xe, una continua de 150 W y otra de pulsos de 7W. Está acoplado mediante una tarjeta GPIB (IEE-488) a un ordenador PC.
- Espectrofotómetro de luminiscencia Modelo Varian Cary Eclipse. El equipo consta de dos monocromadores Czerny-Turner (excitación-emisión), una lámpara de Xenon, selectores de filtro, atenuadores y dos tubos fotomultiplicadores como detectores. El fluorímetro está conectado mediante una tarjeta GPIB IEE- 488 a un ordenador PC.
- Baño termostático Selecta Mod. Frigiterm, capaz de regular la temperatura entre -10 °C y 100 °C, con una precisión de ± 0.1 °C.
- Lámpara de mercurio Osram de 200-W, con una fuente de energía Oriel Modelo 8500; cuyo diseño se muestra en la siguiente figura



- pH -metro “Crison” modelo micro-pH 2001, con sensibilidad de ± 0.01 unidades de pH, provisto de electrodo de vidrio y de calomelanos saturado.
- Balanza ER-60A, marca AND, con sensibilidad de ± 0.1 mg.
- Baño de ultrasonidos, P. Selecta
- Centrífuga Selecta, modelo Angular 6.
- Centrífuga Selecta, modelo Mixtasel.
- Sistema de obtención de agua ultrapura Milli-Q (módulos RIOs/elix y Milli-Q).

REACTIVOS Y DISOLUCIONES

Disoluciones reguladoras y disoluciones de tensioactivos

- Disoluciones reguladoras de pH 4.75 y 5.0 preparadas a partir de acetato de sodio y ácido acético (PANREAC), siendo su concentración final total de 0.5 M.
- Disoluciones reguladoras de pH 8.4 y 8.6, preparadas a partir de Tris-hidroximetilaminometano-HCl (Tris-HCl). Preparadas por dilución de Tris-hidroximetilaminometano (SIGMA) y ajustando el pH con HCl (SCHARLAU), siendo su concentración final de 0.1 M
- Disolución reguladora BORAX 0,065 M de pH 9.4
- Disoluciones de SDS, CTACl y CPC de concentración 0.100 M, preparadas por pesada de SDS, CTACl y CPC y disolución en agua desionizada.
- Disolución 0.025 M de Bromuro de Hexadeciltrimetilamonio (HTAB), preparada por pesada de HTAB y disolución en agua desionizada.

Disoluciones estándar

- Disolución de metaciclina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de metaciclina (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. La disolución se guarda en frasco color topacio en el frigorífico a 4°C .
- Disolución de demeclociclina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de demeclociclina (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada. La disolución se guarda en frasco color topacio en el frigorífico a 4°C .
- Disolución $1.25 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ de Eu (III), preparada por pesada exacta de nitrato de europio (SIGMA) y dilución con agua desionizada.
- Disolución de sulfatiazol $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de sulfatiazol (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada
- Disolución de sulfanilamida $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de sulfanilamida (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada
- Disolución de sulfametoxazol $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de sulfametoxazol (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.
- Disolución de sulfaguanidina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de sulfaguanidina (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.
- Disoluciones $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$ de α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, (2-hidroxi)-propil- β -ciclodextrina y heptakis-(2,6-di-O-metil)- β -ciclodextrina, por pesada en cada caso del producto comercial CYCLOLAB y disolución con agua ultrapura.
- Disolución 4M de Urea (PANREAC)
- Disolución de ácido flufenámico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de ácido flufenámico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con cloroformo.
- Disolución de ácido mefenámico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de ácido mefenámico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con cloroformo.
- Disolución de ácido meclofenámico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de ácido meclofenámico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con cloroformo.

Aparatos y reactivos

- Disolución de ácido flufenámico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de ácido flufenámico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada alcalinizada. La disolución se guarda en frasco color topacio en el frigorífico a 4°C .
- Disolución de ácido meclofenámico $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de ácido meclofenámico (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada alcalinizada. La disolución se guarda en frasco color topacio en el frigorífico a 4°C .
- Disolución de leucovorín $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de leucovorín (ACROS ORGANICS) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada.
- Disolución de metotrexato $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparada por pesada de 0.0100 g de metotrexato (SIGMA) y dilución hasta 100.0 mL con agua desionizada alcalinizada.
- Disolución 0.100 M de KMnO_4 previamente valorada con oxalato potásico.

Disolventes

- Metanol, acetonitrilo, acetona, etanol, grado gradiente para análisis (PANREAC)
- Cloroformo grado gradiente para análisis (SCHARLAU)

PROGRAMAS INFORMÁTICOS

- *Grapher 3.0*, 2-D Graphing system. Goldem Software Inc. Colorado, USA. 2001
- *MATLAB 5.3 Rev. 11*; *The MathWorks Inc.: Natick, M.A.*; 1999
- ***MVC1: “MVC1: an integrated Matlab toolbox for first-order multivariate calibration”*** (*Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 73, Issue 2, 28 October 2004, Pages 189-197*, Alejandro C. Olivieri, Héctor C. Goicoechea and Fernando A. Iñón)

- MVC2, A.C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina
- MVC3, A.C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina
- “*pkfit*”, A.C. Olivieri, Universidad Nacional de Rosario, Argentina
- ACOC: **“Univariate linear regression calibration software in MATLAB environment. Application to the laboratory practices by chemistry students”** (*The Chemical Educator, In Press, A. Espinosa Mansilla., A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez*)

1.- TETRACICLINAS

Las tetraciclinas son un grupo de antibióticos, que originalmente se obtuvieron de ciertos *Streptomyces spp*, presentes en muestras de suelos recogidas en diferentes partes del mundo. Los antibióticos son sustancias químicas específicas, derivadas o producidas por los organismos vivos que, incluso en pequeñas concentraciones, son capaces de inhibir los procesos vitales de otros organismos. El término antibiótico, que proviene de dos palabras griegas ($\alpha\nu\tau\iota + \beta\iota\omicron\varsigma$) y que literalmente significan contra la vida, fue acuñado por Paul Vuillemin en 1889. Los primeros antibióticos se aislaron de microorganismos, aunque en la actualidad algunos se obtienen incluso de plantas superiores y de animales. Hasta el momento se han descrito en bibliografía más de 3100 antibióticos, de los que aproximadamente 2400 proceden de microorganismos. Sin embargo, sólo unas docenas se han utilizado en medicina debido, entre otros motivos, a que la mayoría de antibióticos carecen de toxicidad selectiva y son tóxicos casi en igual medida para el parásito y para el huésped. La mayor parte de los antibióticos son producidos por microorganismos, aunque algunos provienen de modificaciones químicas de otros conocidos o de metabolitos microbianos. Además, algunos antibióticos se preparan en la actualidad totalmente por síntesis, por ejemplo el cloranfenicol. Cada una de estas sustancias actúa selectivamente sobre un grupo determinado de gérmenes (espectro de actividad), pero esta actividad puede disminuir para un determinado germen, como consecuencia de una especie de habituación de éste (resistencia). Es posible comprobar la actividad de los antibióticos sobre un germen patógeno por distintos métodos, lo que permite dirigir el tratamiento de una enfermedad infecciosa (antibiogramas).

Los antibióticos constituyen el grupo de fármacos que se prescribe con más frecuencia. Se emplean para los siguientes fines: tratamiento de infecciones sistémicas, circulatorias, respiratorias, urogenitales, gastrointestinales, oftálmicas, tejidos blandos, esqueléticas y tópicas; profilaxis de infecciones en sujetos sanos o enfermos; diagnóstico de malignidad (para ello se emplea la tetraciclina).

Entre los numerosos criterios que se han utilizado para clasificar los antibióticos, los principales son: biosíntesis, espectro de actividad y estructura química.

Muchos autores han presentado clasificaciones químicas de antibióticos, tomando como base la estructura química de los mismos. Sin embargo, ninguna es satisfactoria. Los antibióticos de interés químico se dividen en los siguientes grupos: penicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol y derivados, tetraciclinas, antibióticos polipeptídicos, antibióticos poliénicos, antibióticos macrólidos, antibióticos aminoglicosídicos, ansamicinas, antraciclinas, grupo de la lincomicina, antibióticos nucleósidos, antibióticos de la glutarimida, antibióticos varios.

ORIGEN Y QUÍMICA

Las tetraciclinas fueron descubiertas hace 50 años por Duggar y, actualmente, son un grupo de antibióticos muy ampliamente utilizados en todo el mundo. Estos antibióticos naturales y semisintéticos son derivados de cultivos de *Streptomyces*. Los dos primeros miembros se aislaron del *Streptomyces aureofaciens* (clorotetraciclina), en 1948 y *S. Rimosus* (Oxitetraciclina), en 1950. Se caracterizan por un esqueleto común de octahidronaftaceno formado por cuatro anillos condensados y por su amplio espectro de actividad. La tetraciclina es el prototipo de este grupo de antibióticos y se obtuvo por primera vez por hidrogenólisis de la 7-clorotetraciclina. En 1957 se describió la familia de la 6-desmetiltetraciclina. Más recientemente se han preparado por procedimientos semisintéticos nuevas tetraciclinas con mejores propiedades. Algunas tetraciclinas se han obtenido por síntesis total. En 1970 se describió la quelocardina, un nuevo antibiótico de la familia de las tetraciclinas.

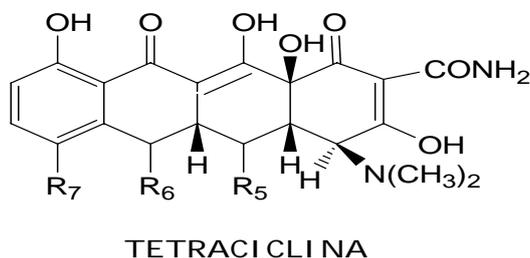


Figura I.1.- Estructura y configuración absoluta de las tetraciclinas

En la Figura I.1 se representa la estructura general y la configuración absoluta de las tetraciclinas. Poseen varios centros asimétricos, la propia tetraciclina tiene cinco. Las características esenciales para la actividad quimioterapéutica son:

- El grupo 2-amido; puede sustituirse uno de los átomos de hidrógeno sin pérdida de la actividad.
- La agrupación 4-dimetilamino; su eliminación ocasiona una sustancial pérdida de la actividad.
- La estereoquímica adecuada de las anteriores agrupaciones; las 4-epitetraciclinas son menos activas que las tetraciclinas naturales.
- La estereoquímica adecuada de los sustituyentes del carbono 5a; la epimerización o la deshidrogenación causa una fuerte disminución de la actividad.
- El sistema conjugado de los carbonos 10 al 12, en el que las funciones oxigenadas de las posiciones 10, 11 y 12 resultan esenciales para la actividad biológica; la alteración de esta agrupación cromófora da lugar a compuestos casi totalmente inactivos.

La tetraciclina químicamente se nombra como 4 - (dimetilamino) - 1, 4, 4a, 5, 5a, 6, 11, 12a - octahidro - 3, 6, 10, 12, 12a - pentahidroxi - 6 - metil - 1, 11 - dioxo - 2 - naftacenocarboxamida.

PROPIEDADES FISICOQUÍMICAS

Las tetraciclinas son compuestos anfóteros por poseer un grupo OH (ácido) en posición 10 y un grupo amínico terciario (básico) en posición 4. Muchas de ellas forman sales solubles en agua, tanto con ácidos como con bases fuertes. Las sales ácidas se forman por protonación del grupo dimetilamino unido al átomo de carbono 4; son estables. Las sales básicas se forman con hidróxido sódico y potásico; son inestables. El sistema cromóforo común les confiere color amarillo. En cada tetraciclina existen tres o incluso cuatro grupos ionizables distinguibles, como se puede ver en la Figura I.2. Los valores aproximados de pK_a son los siguientes: 3.3, 7, 9 y 13. El pK_1 corresponde a la desprotonación del OH del sitio A, el pK_2 es debido a la desprotonación del grupo dimetilamino, el pK_3 y el pK_4 se deben a los OH de los sitios C y D, no es posible distinguir cuál es de cada sitio [1].

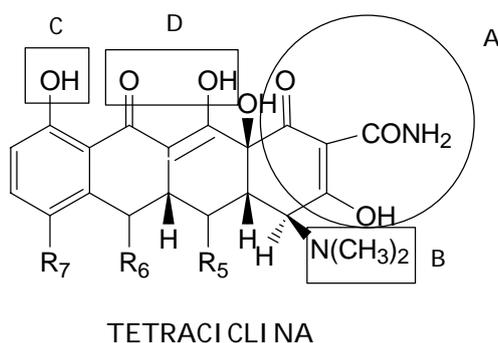


Figura I.2.- Posibles grupos ionizables de las tetraciclinas

Debido a la presencia de grupos que pueden formar varios puentes de hidrógeno intramoleculares, las tetraciclinas tiene propiedades quelantes y forman complejos insolubles con sales de hierro, calcio, magnesio o aluminio. Por tanto, para una mejor absorción no deben administrarse con leche o productos lácteos, antiácidos u otros productos que contengan estas sales.

En disoluciones con valores de pH (2 a 6) las tetraciclinas experimentan epimerización en el átomo de carbono 4, alcanzándose el equilibrio cuando se han formado aproximadamente cantidades iguales de ambos isómeros. Las epitetraciclinas son mucho menos activas que los isómeros naturales. Este hecho explica la disminución de actividad que se observa en disoluciones envejecidas.

Los ácidos y las bases fuertes inactivan a las tetraciclinas que poseen un grupo hidroxilo en la posición 6, formando anhidrotetraciclinas e isotetraciclinas, respectivamente. Los esfuerzos efectuados para superar esta inactivación han conducido al desarrollo de las 6-desoxitetraciclinas, que son más estables y poseen una acción más prolongada. Son ejemplos la metaciclina, la doxiciclina y la sanciclina.

TIPOS DE TETRACICLINAS

Las tetraciclinas pueden agruparse en tres tipos:

- 1) Tetraciclinas naturales: clorotetraciclina, oxitetraciclina, tetraciclina, demeclociclina.
- 2) Tetraciclinas semisintéticas con el grupo carboxamido inalterado: doxiciclina, metaciclina, minociclina, sanciclina.
- 3) Formas latentes de tetraciclinas. Esta latentización se consigue: por reacción de Mannich sobre la función amida, por formación de sales y por asociación molecular.

Las tetraciclinas de uso más frecuente suelen ser: doxiciclina, minociclina, tetraciclina, rolitetraciclina, demeclociclina, oxitetraciclina y metaciclina; sin embargo, existen otras: etamociclina, penimociclina, guameciclina, megluciclina, mepiciclina, apiciclina o clomociclina.

MECANISMO DE ACCIÓN

Las Tetraciclinas son generalmente antibióticos bacteriostáticos, aunque pueden tener acción bactericida a altas concentraciones o cuando se usan en contra de microorganismos susceptibles. Estos antibióticos, al parecer, ejercen su acción mediante la inhibición de síntesis proteica bacteriana, por su unión reversible a la subunidad 30S del ribosoma bacteriano y, de esta forma, bloquean la unión del aminoacil-tRNA al sitio aceptor en el complejo ribosoma-RNA. Adicionalmente las tetraciclinas parece que también se unen reversiblemente a la subunidad 50S. Existe también evidencia preliminar que sugiere que las tetraciclinas alteran la membrana citoplasmática de organismos susceptibles, permitiendo la salida de componentes intracelulares. A altas concentraciones, las tetraciclinas también inhiben la síntesis de proteínas en las células de los mamíferos.

Estos antibióticos se utilizan también con fines no terapéuticos: aumento de la velocidad de crecimiento de los animales de granja, conservación de alimentos, control microbiológico de fermentaciones.

ESPECTRO ANTIBACTERIANO

Las tetraciclinas son agentes bacteriostáticos de amplio espectro. Son efectivas en el tratamiento de las infecciones causadas por numerosas especies de bacterias Gram positivas y Gram negativas, espiroquetas, rickettsias, micoplasmas, clamidias...; pero

sus reacciones adversas y el desarrollo de cepas resistentes y de otros agentes antimicrobianos han reducido su utilización. La resistencia se establece en forma lenta y, generalmente, es cruzada con respecto a las otras tetraciclinas. Es difícil que se instale en el curso de un tratamiento, aunque existen proporciones importantes de las cepas de algunos microorganismos que se han hecho resistentes [2,3].

DEMECLOCICLINA

➤ *Introducción y estructura*

La demeclociclina (clortetraciclina dimetilada) es natural. La primera vez que se aisló fue en 1957, en la mutación de una cepa de *Streptomyces aerofaciens*. Tiene una vida media más larga que la tetraciclina y ha originado la mayor cantidad de trabajos que describen sus reacciones foto-tóxicas. Se ha usado con algún éxito en pacientes con síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética. En la Figura I.3 se muestra la estructura de la demeclociclina.

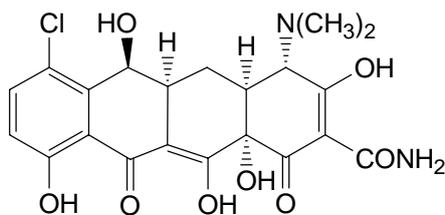


Figura I.3.- Estructura de la demeclociclina

➤ *Antecedentes bibliográficos sobre el análisis de demeclociclina*

En la siguiente tabla se resumen los antecedentes bibliográficos sobre el análisis de la demeclociclina. En la tabla se reúne la técnica utilizada, así como la aplicación realizada en algunos casos.

Tabla I.1.- Antecedentes bibliográficos sobre el análisis de demeclociclina

TÉCNICA	APLICACIONES	OBSERVACIONES	REF
Determinación mediante HPLC	Leche, huevos		4
	Tejido de pescado	Extracción en fase sólida	5
HPLC	Agua	Extracción en fase sólida-MS	6
Cromatografía de pares iónicos	Blanqueante dental	En fase reversa	7
Cromatografía electrocinética micelar			8
Cromatografía líquida	Productos farmacéuticos	Detección amperométrica	9
	Suero de animales de laboratorio		10
Cromatografía Líquida	Comida		11
	Fármacos	Columnas poliméricas y fase móvil ácida	12
	Plasma humano, orina		13
		En fase reversa	14
Quimioluminiscencia	Fármacos, miel	Oxidación con N-bromosuccinamida	15
Electroforesis capilar	Fármacos		16
		Uso del surfactante TritónX-100 y metil β-ciclodextrina	17
			18
			19
			20

Electroforesis en capa fina	Orina	Platos Silica Gel 60F254	21
Espectrofluorimetría sensibilizada	Leche bovina	Método de Carson	22
Análisis microbiológico	Leche sin tratar	Detección Bioluminiscente	23
Polarografía diferencial de pulsos		Análisis de mezclas	24
	Productos animales	Cromatografía de afinidad	25
	Plasma de pato	Extracción con acetato de etilo	26
	Plasma humano, saliva		27
	Tejido animal	Cromatografía de afinidad	28
HPLC	Orina	Columna de poliestireno-divinilbenceno	29
	Piscifactorías	Detección a 350 nm	30
			31
		En fase reversa	32
HPLC-MS	Comida	Ionización a presión atmosférica	33
		Detección mediante fluorescencia	34
TLC	Fármacos	Comparación con LC	35
			36
HPTLC		Detección densiométrica a 254 nm	37
	Medicamentos	En inyección de flujo	38
Espectrofotometría		Reactivo: Molibdato de sodio	39
		Usando vanadato de amonio	40

METACICLINA

La metaciclina es un miembro del grupo de las tetraciclinas, que fue descubierto en 1961. Su naturaleza es semisintética. Es una 6-desoxitetraciclina, lo que la hace resistente frente a ácidos y bases fuertes. En la Figura I.4 tenemos representada la estructura de la metaciclina.

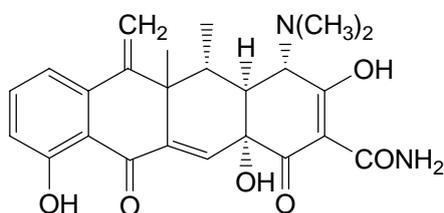


Figura I.4.- Estructura de la metaciclina

➤ *Antecedentes bibliográficos sobre el análisis de metaciclina*

Son varios los métodos descritos en la bibliografía para la determinación de metaciclina, en la siguiente tabla se encuentran recogidos algunos de ellos.

Tabla I.2.- Antecedentes bibliográficos sobre el análisis de metaciclina

TÉCNICA	APLICACIÓN	OBSERVACIONES	REF
Electrodo selectivo de iones (ISE)	Fármacos	Hidrocloruro de metaciclina	41
HPLC-MS	Leche	Utilización Sep-pack C18	42
HPLC	Antibióticos	HPLC en fase inversa	43
Electroforesis capilar (CE)			44
HPLC		Metaciclina, oxitetraciclina y sustancias relacionadas	45
Test microbiológico	Leche sin tratar		46
Cromatografía líquida	Fármacos	Determinación simultánea de 6-epi-doxiciclina	47
Cromatografía	Alimentos		48
Espectrometría de masas (MS)		Tetraciclina, Oxitetraciclina, Clorotetraciclina, minociclina (y metaciclina)	49
Cromatografía líquida con detección amperométrica	Fármacos		50
HPCE (Electroforesis capilar de alta resolución) y electrocromatografía capilar		Voltaje de 30 Kv y detección a 254 nm	51

Capítulo I.- *Determinación de metaciclina y demeclociclina en fluidos biológicos mediante FSL*

Cromatografía de afinidad	Leche	Análisis multicomponente	52
CE			53
TLC	Fármacos	Detección fluorimétrica	54
Cromatografía líquida en columna		Relleno de poli(estireno-divinilbenceno)	55
Cromatografía en capa fina			56
FIA			57
Espectrofotometría	Fármacos	Complejo rojo-anaranjado de estequiometría 1:1	58
Determinación colorimétrica	Fármacos	Alícuota tratada con 0,01 % CuCl	59
HPLC en fase inversa	Tejido bovino, plasma y orina	Determinación simultánea de seis tetraciclinas	60
HPLC	Antibióticos	Columna polimérica	61
HPLC	Miel	Análisis simultáneo de siete tetraciclinas	62
Extracción-fotometría			63
HPLC	Fármacos	Columna de poliestireno-divinilbenceno	64
Espectrofotometría			65

Cromatografía en columna	Fármacos	Detección a 254 nm	66
Método cinético de análisis			67

2.-LUMINISCENCIA MOLECULAR

Un primer paso en toda investigación es el conocimiento de la etimología de los términos que se introducen para designar un fenómeno. En nuestro caso, los vocablos LUMINISCENCIA y FLUORESCENCIA designan técnicas analíticas de gran interés que son la base de la Memoria que se presenta, por lo que incluimos aquí su etimología.

Fluorescencia es un bonito ejemplo de un término cuya etimología no es tan obvia como pueda parecer. De hecho, es extraño porque, a primera vista, contiene la palabra “fluor”, elemento que no es en absoluto fluorescente. Por contraste, la etimología de las palabras **fosforescencia** y **luminiscencia** son más evidentes, ambos términos contienen la palabra luz, del griego, y del latín, lumen, respectivamente.

Luminiscencia viene del latín *lumen*, luz, y en un principio, fue introducida como “luminescenz” por el físico e historiador Eilhardt Wiedemann, en 1888, para designar todos aquellos fenómenos luminosos que, en contraposición a la incandescencia, no son causados únicamente por un aumento de temperatura. Según él, la luminiscencia es luz fría mientras que la incandescencia es luz caliente.

El término **fluorescencia** fue introducido por Sir George Gabriel Stokes, físico y profesor de matemáticas en Cambridge a mediados del siglo XIX. En realidad, los primeros indicios que se tienen de la observación de fluorescencia fueron proporcionados por un físico español, Nicolás Monardes, en 1565. Descubrió un

peculiar color azul que procedía de una infusión de una madera llamada “lignum nephriticum”. Esta madera fue investigada más tarde por Boyle, Newton y otros científicos, pero no pudieron comprender el fenómeno que se producía.

Stockes, en su primer artículo [68], llamó al fenómeno observado “reflexión dispersiva”, pero en el pie de página escribió que no le gustaba ese término y que se sentía inclinado a inventar uno nuevo. Éste fue “fluorspar” que significa mineral que contiene fluoruro cálcico, fluorita, así como el término análogo de opalescencia se deriva del nombre del mineral. Ya en su segundo artículo [69], Stockes usa definitivamente la palabra fluorescencia.

Comprendemos entonces porqué fluorescencia contiene el término “fluor” que procede de “fluorspar”. Spar era el nombre inglés que se le daba en el siglo XVIII a las piedras que eran más o menos transparentes y que cristalizaban con una textura laminar [70]. Como estos materiales pueden ser fácilmente fundidos y ayudar a que otros se fundan, la palabra “fluor” [71] fue empleada a menudo para expresar fluidez. También se sabe que muchas de estas piedras son coloreadas, debido a la presencia de pequeñas cantidades de impurezas, que explicarían las propiedades fluorescentes, puesto que la fluorita, por sí misma, no es fluorescente.

FUNDAMENTOS

La luminiscencia molecular es una rama de la espectroscopía de emisión, en la que intervienen fundamentalmente los estados electrónicos de una molécula. Se basa en la detección óptica y el análisis espectral de la luz emitida por una sustancia, que sufre una transición desde un estado electrónico excitado a otro de energía más baja.

La mayor parte de las moléculas orgánicas contienen un número par de electrones. En el estado fundamental, éstos rellenan los diferentes orbitales, desde los de más baja energía, por pares. Por el principio de exclusión de Pauli, dos electrones en un orbital deben tener espines opuestos y el espín total S debe ser igual a cero. Debido a

esto, el estado fundamental no tiene un espín electrónico neto. Tal estado ha sido denominado como estado singlete.

La excitación de una molécula normalmente conlleva la promoción de un electrón desde uno de los orbitales ocupados más altos, a otro que previamente está desocupado y al cual se le denomina a veces "orbital virtual". Mientras que el estado fundamental es generalmente un singlete, el estado excitado puede ser un singlete o un triplete, dependiendo del estado final del espín del electrón que se ha promovido al orbital más alto. La Figura I.5 muestra un estado fundamental, y dos configuraciones de estados excitados. Los espines de los electrones que se encuentran en los orbitales desocupados ya no están restringidos por el principio de exclusión de Pauli. El estado singlete posee dos espines antiparalelos, mientras que el estado triplete tiene dos espines paralelos y un espín neto S de 1.

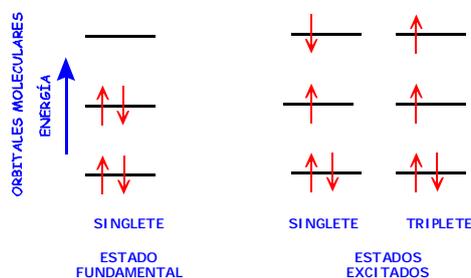


Figura I.5.- Diagrama esquemático de las disposiciones típicas en orbitales moleculares para los estados fundamental, singlete y triplete.

❖ *Diagrama de Jablonskii*

El diagrama de Jablonskii ilustra los mecanismos de desactivación que siguen a la excitación de una molécula a un estado excitado S_n . Los principales procesos fotoquímicos que ocurren se muestran en la Figura I.6.

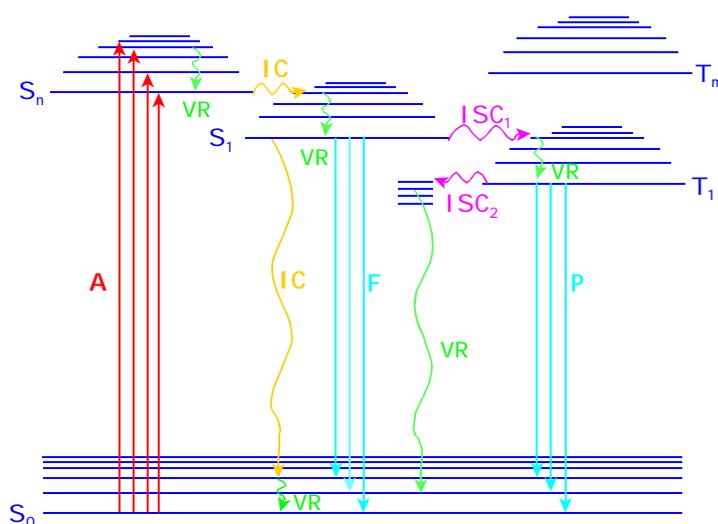


Figura I.6.- Diagrama de Jablonskii en el que se muestran las diferentes transiciones radiantes y no radiantes en una molécula después de su excitación a un estado singlete S_n (*A*, absorción; *F*, fluorescencia; *IC*, conversión interna; *ISC*, cruce entre sistemas; *P*, fosforescencia; *VR*, relajación vibracional).

Absorción (A)

En el equilibrio, una molécula se encuentra en el estado fundamental S_0 . Cuando absorbe energía se promueve desde S_0 a algún nivel vibracional de uno de los estados singletes excitados S_n (10^{-15} s.).

Relajación vibracional (VR)

La molécula en el estado excitado S_n se desactiva rápidamente en 10^{-13} a 10^{-11} s, mediante un proceso no radiante de relajación vibracional (VR), hasta los niveles vibracionales más bajos de los correspondientes estados electrónicos excitados. El exceso de energía vibracional se pierde en forma de energía térmica.

Conversión interna (IC)

A partir de un estado S_n , la molécula se desactiva rápidamente al nivel vibracional isoenergético de un estado electrónico más bajo, tal como S_{n-1} , mediante un proceso no radiante de conversión interna (IC). A continuación, se desactiva al nivel vibracional más bajo del estado S_{n-1} , por relajación vibracional (VR). Mediante una sucesión de procesos IC seguidos inmediatamente de procesos VR, la molécula se desactiva rápidamente al primer estado singlete excitado S_1 . Así, una molécula puede ser excitada hasta S_1 o a estados excitados de mayor energía, S_n , dependiendo de la energía de excitación que se utilice, pero la emisión solamente tiene lugar a partir del primer estado electrónico excitado (regla de Kasha).

Fluorescencia (F)

A partir de un estado S_1 , la molécula puede desactivarse a S_0 , sin emisión de radiación, mediante procesos IC y VR, o bien emitir un fotón sin cambio en la multiplicidad del espín. Esta transición $S_1 \rightarrow S_0$ es conocida como fluorescencia (F).

Cruce entre sistemas (ISC)

Una vez en el estado S_1 , la molécula puede sufrir una transición a algún nivel vibracional del estado triplete T_1 , por un mecanismo conocido como cruce entre sistemas (ISC). Este proceso no radiante conlleva un cambio en la multiplicidad del espín. A continuación, la molécula se relaja hasta el nivel vibracional más bajo de T_1 , mediante sucesivos procesos VR.

Fosforescencia (P)

Partiendo del estado T_1 , la molécula puede volver al estado fundamental S_0 , por un proceso de desactivación no radiante (ISC_2), o por la emisión de un fotón. Esta transición radiante es conocida como fosforescencia (P).

La desactivación no radiante que compite con bastante frecuencia con la fosforescencia, es el proceso de cruzamiento entre sistemas inverso (ISC_2). Este

proceso, que es frecuentemente dominante, determina el tiempo de vida de fosforescencia.

❖ *El estado triplete*

Dado que la energía asociada a un estado con los espines paralelos es siempre más baja que la del correspondiente estado con los espines antiparalelos (regla de Hund), los estados tripletes tienen niveles de energía menores que sus correspondientes estados singletes. En consecuencia, la emisión de fosforescencia ocurre a longitudes de onda más altas que la fluorescencia.

Las propiedades de los estados singletes y tripletes son significativamente diferentes. El estado singlete es diamagnético, mientras que el triplete es paramagnético. La denominación “singlete”, “triplete”, proviene de consideraciones de multiplicidad del desdoblamiento de los niveles de energía cuando una molécula se expone a un campo magnético. Bajo la aplicación de un campo magnético externo, el estado triplete con su momento magnético de espín, se desdobra en tres niveles energéticos Zeeman. Por el contrario, el estado singlete, que no posee momento magnético, no sufre ningún desdoblamiento.

❖ *Acoplamiento espín-orbital*

Las transiciones entre diferentes estados excitados de la misma multiplicidad ($S_n \rightarrow S_m$ ó $T_n \rightarrow T_m$) ocurren con facilidad, pero las transiciones entre estados de diferente multiplicidad están prohibidas según la mecánica cuántica, por la regla de selección de espín ($\Delta S = 0$).

Sin embargo, transiciones de espín prohibido, como son las singlete-triplete, ocurren bajo ciertas condiciones. Esto es posible debido al acoplamiento espín-orbital (S-O), que consiste en el acoplamiento del espín electrónico con el momento orbital angular, fenómeno que produce una mezcla mecánico-cuántica de estados de diferentes multiplicidades. Este mecanismo puede ser explicado por el hecho de que el movimiento orbital del electrón induce un campo magnético que interactúa con el campo magnético de espín. Esta interacción produce un cambio en la dirección del momento de espín angular del electrón [72]. El acoplamiento espín-orbital, realmente induce un cierto componente de carácter singlete en los estados tripletes y viceversa. Este proceso, por tanto, hace que las transiciones entre estados singletes y tripletes dejen de ser de espín prohibido.

➤ **FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA POR LANTÁNIDOS (FSL)**

Como hemos expuesto anteriormente, la fluorescencia es un método luminiscente, basado en la excitación por absorción de radiación, que consiste en la relajación radiante desde el más bajo nivel vibracional del estado singlete excitado, a cualquiera de los niveles vibracionales del estado fundamental. Hay que diferenciar entre procesos de relajación no radiantes y radiantes. Dentro de los procesos de relajación no radiantes nos encontramos la relajación vibracional, conversión interna, cruce de sistemas y conversión externa. Sin embargo, la fluorescencia y la fosforescencia son procesos de relajación radiantes. Hay varios tipos de métodos fluorescentes, entre ellos vamos a describir la fluorescencia sensibilizada por lantánidos.

La fluorescencia sensibilizada por lantánidos es una alternativa muy atractiva a la detección UV u a otras técnicas luminiscentes. Se utiliza para la detección de fármacos y principios activos, debido a características como: estrechas bandas de emisión (Figura I.7), grandes desplazamientos de Stokes y emisiones de larga vida media [73].

➤ Los lantánidos son los 14 elementos que siguen al Lantano en la tabla periódica. Tienen como propiedad el relleno electrónico progresivo del subnivel 4f. Esta configuración electrónica del nivel 4f juega un papel importante en la *transferencia de energía* de estos elementos, especialmente cuando están formando complejos con ligandos orgánicos [73]. En la Figura I.8 se muestra el diagrama teórico de la transferencia de energía. El ligando orgánico absorbe energía y se excita al estado singlete (S_1). Desde este estado hay dos posibilidades: la molécula vuelve de S_1 a S_0 , mediante una transición radiante (fluorescencia), o mediante un cruce de sistemas va a un estado triplete excitado (T_1). Una vez en el estado triplete excitado, el compuesto orgánico tiene dos posibilidades: la molécula va de T_1 a S_0 mediante un proceso radiante (fosforescencia) o sigue un proceso no radiante, pero en este caso, en presencia del ión lantánido, la energía se transfiere a ese ión metálico, el cual se excita y, posteriormente, emite una intensa de fluorescencia [74].

- Tb^{3+} y Eu^{3+} son los lantánidos más usados en aplicaciones analíticas. El espectro de emisión está formado por bandas estrechas .

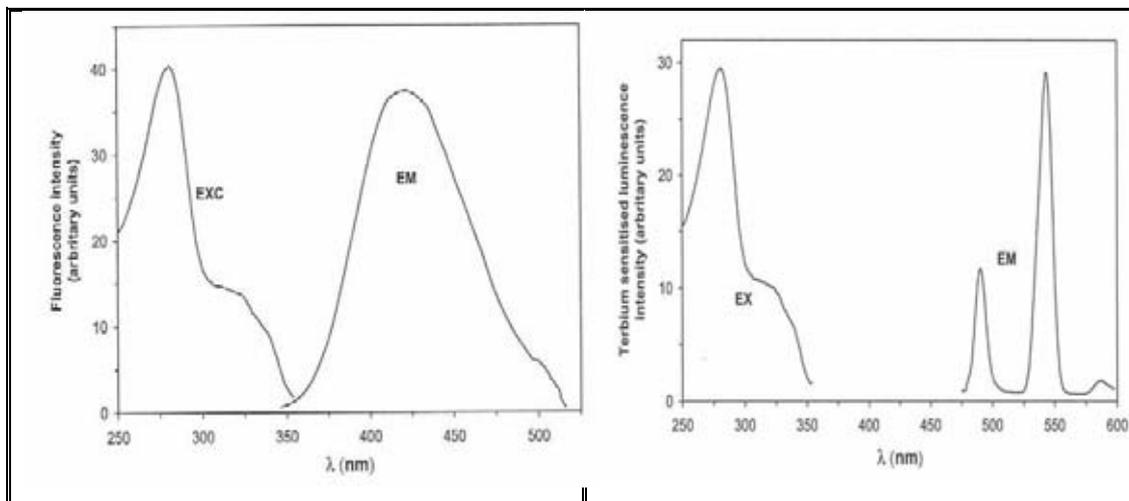


Figura I.7.- Espectros de excitación y emisión de oxitetraciclina en ausencia y presencia de $Tb(III)$

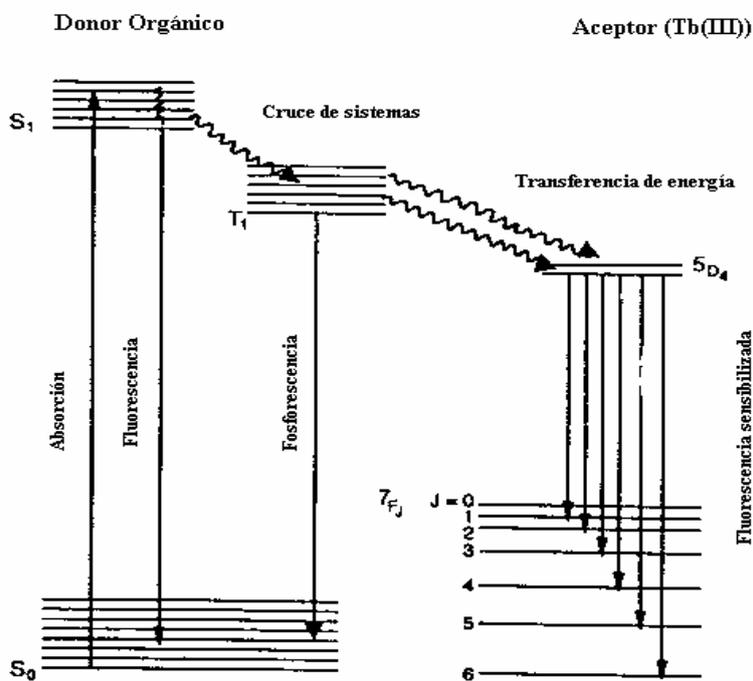


Figura I.8.- Mecanismo de transferencia de energía entre un donador orgánico y un ión metálico ($Tb(III)$)

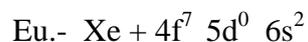
El espectro de emisión obtenido está formado por bandas estrechas; el número y la intensidad de los picos depende del estado de coordinación del ión (naturaleza del medio).

La sensibilidad más elevada la presentan las transiciones “hipersensibles” que son:

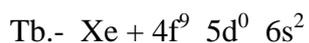
- ${}^5D_0 \Rightarrow {}^7F_2$ (613 nm) para Eu^{3+}
- ${}^5D_4 \Rightarrow {}^7F_6$ (490 nm) para Tb^{3+}

Los estados de oxidación de Europio y Terbio son:

Europio.- Eu^{2+} y Eu^{3+} , siendo la más estable y frecuente Eu^{3+}



Terbio.- Tb^{2+} y Tb^{3+} , siendo la más estable y frecuente Tb^{3+}



Los lantánidos presentan rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ) muy bajo, entre 10^{-2} y 10^{-3} .

Este rendimiento se puede aumentar en presencia de: AEDT, NTA (ácido nitrilotriacético), AAA (ácido aminoacético). El rendimiento aumenta al aumentar la constante de estabilidad del complejo, lo cual depende del tamaño del ligando, la estructura electrónica del ión y del pH.

El fenómeno de transferencia de energía se observa por primera vez por Weissman en 1942, entre salicilato y Tb(III) [75]. Su primera aplicación analítica se aporta en 1985, para la detección de un cromóforo en cromatografía líquida [76]. El proceso de transferencia de energía y la emisión fluorescente compiten siempre con otros procesos internos no radiantes, tanto del ligando como del ión. Se emplean agentes sinérgicos y medios micelares para proteger el quelato de otros aceptores de energía. De este modo, se minimizan los procesos de desactivación no radiante. La transferencia de energía puede ser de dos tipos: intramolecular e intermolecular.

La transferencia de energía *intramolecular* tiene lugar cuando el ión lantánido forma complejo con un ligando orgánico, como son las β -dicetonas, es el caso de la tenoiltrifluoroacetona (TTFA) y la 2-naftoiltrifluoroacetona (NTFA). Como ya hemos comentado, el proceso de absorción tiene lugar entre los niveles de energía del ligando orgánico. A continuación, mediante un cruce de sistemas, se transfiere energía intramolecularmente desde el estado triplete del ligando al ión lantánido y éste emite la señal luminiscente [73].

Cuando la transferencia de energía del donador al ión tiene lugar por un mecanismo colisional, el proceso de transferencia de energía es *intermolecular* [73].

La intensidad fluorescente del ión lantánido depende de dos factores. Primero, la eficacia de la transferencia de energía depende de la diferencia entre el estado triplete del compuesto orgánico y el estado resonante del ión. La energía del estado triplete debe ser parecida, pero mayor que la del nivel resonante. Segundo, la probabilidad de la desactivación no radiante del nivel resonante debe ser más baja que la probabilidad de transición radiante. En la práctica, sólo Sm(III), Dy(III), Tb(III) y Eu(III) se usan como aceptores energéticos, ya que presentan una gran fluorescencia. Generalmente, los dos últimos iones son los más usados, porque presentan mayores tiempos de decaimiento y, por tanto, grandes intensidades de fluorescencia [73].

FACTORES QUE AFECTAN A LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA

Entre algunos de los factores que influyen tenemos: ligandos con grupos donores de electrones, agentes sinérgicos, surfactantes, pH, co-luminiscencia, átomos pesados.

✓ Ligandos con grupos donores de electrones

Se forman quelatos estables con ligandos que contienen grupos donores de electrones negativamente cargados. El Tb(III) tiene un número de coordinación 9; para sensibilizar la fluorescencia del terbio se usa, por ejemplo, el ácido dipicolínico, DPA (ligando tridentado), ácido 2,6-piridinadicarboxílico. El DPA tiene dos grupos donores de electrones fuertes ($-\text{COO}^-$) y un grupo donador débil, el N del anillo de la piridina. Los grupos donores débiles (que contienen N u O neutros, sólo enlazan cuando están en ligandos multidentados que contienen al menos 1 o 2 grupos donores, con átomos de oxígeno negativamente cargados). Las β -dicetonas producen complejos con números de coordinación 6 u 8, por lo que al unirse con el terbio, dejan sitios libres, que puede ocupar el agua, produciendo una atenuación (quenching) de la fluorescencia. Este efecto negativo se previene usando un segundo ligando que remueva las moléculas de agua de la esfera de coordinación del ión.

✓ Agentes sinérgicos

Se suele utilizar TOPO (óxido de tri-n-octilfosfina), que tiene propiedades de coordinación y puede llenar los lugares vacíos de la esfera de coordinación. El AEDT se suele usar para prevenir la hidrólisis del Terbio en disoluciones alcalinas, además de usarse como ligando con propiedades sinérgicas. Otros agentes sinérgicos que pueden utilizarse son: difenil guanidina (DPG), tenoiltrifluoroacetona (TTA),

α - α -bipiridina (BP), benzoilacetona (BA), fenantrolina (Phen), ácido trimésico (ácido benceno-1,3,5-tricarboxílico)(TMA).

✓ *Surfactantes*

La presencia de un surfactante en el sistema puede evitar el quenching, por coordinación del ión lantánido con moléculas de agua y protege el quelato contra procesos no radiantes. Algunos surfactantes usados son: Triton X-100 (no iónico), dodecil sulfato sódico, SDS (aniónico), bromuro de cetiltrimetilamonio, CTMAB (catiónico).

✓ pH

La intensidad fluorescente del ión lantánido se ve favorecida a pHs neutros o alcalinos ya que a estos valores de pH se favorecen la ionización de las moléculas, permitiendo la formación de fuertes quelatos. A pHs muy alcalinos se produce la precipitación de hidróxidos de lantánido.

✓ Co-luminiscencia

La co-luminiscencia es el resultado de un gran aumento de excitación en el ión mediante absorción de luz por quelatos de iones no emisivos, como son Y(III) y Gd(III). Esto envuelve una transferencia de energía de fluorescencia sensibilizada inter-quelato y su eficiencia puede incrementarse fuertemente empleando un surfactante.

✓ Átomos pesados

Es conocido que los átomos pesados pueden aumentar el acoplamiento spin-orbital y, por tanto, la probabilidad del cruce entre sistemas.

Comercialmente, las sales de lantánidos son cloruros o nitratos. Los cloruros se utilizan mucho, porque son solubles en agua y compatibles con la mayoría de disolventes orgánicos. Los cloruros son mejores que los nitratos en el caso de la transferencia de energía intermolecular. El calor atenúa o aumenta la fluorescencia, dependiendo del tipo de energía de transferencia. La temperatura incrementa las colisiones entre el analito y el ión lantánido, favoreciendo el proceso de transferencia de energía. Sin embargo, en la detección de tetraciclinas utilizando Tb(III), la temperatura atenúa la fluorescencia. También, en mecanismos de transferencia de energía intramolecular, la señal decrece al aumentar la temperatura. El medio micelar facilita la transferencia de energía y disminuye la atenuación debida al agua, ya que proporciona un medio más viscoso y menos polar que la mayor parte de las disoluciones acuosas [74].

La fluorescencia sensibilizada por lantánidos se utiliza para determinar ácidos nucleicos, nucleótidos, proteínas, tetraciclinas y otros compuestos orgánicos.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS SOBRE LA TÉCNICA DE FLUORESCENCIA SENSIBILIZADA POR LANTÁNIDOS (FSL)

En la siguiente tabla se hace un pequeño resumen sobre los antecedentes bibliográficos de la técnica FSL. En ella se pueden ver los diferentes analitos estudiados, así como las diferentes aplicaciones llevadas a cabo.

Tabla I.3.- Antecedentes bibliográficos sobre la técnica de fluorescencia sensibilizada por lantánidos

COMPONENTES	APLICACIONES	OBSERVACIONES	REF
Grepafloxacino	Orina humana, comprimidos	FIA Sistema Ce(IV)-Na ₂ SO ₃ - Lantánido(III)-grepafloxacino	77
Ciprofloxacino	Productos farmacéuticos	FIA Complejo Eu(III)-ciprofloxacino	78
Grepafloxacino	Orina humana, suero	Complejo Tb(III)-grepafloxacino Medio micelar SDS	79
Ácido benzoico, sacarina	Bebidas refrescantes	Técnica en flujo detenido Tb(III) en Imidazol	80
Ácido p-aminobenzoico	Medicamentos	Método cinético en la modalidad de flujo detenido Tb(III)-p-aminobenzoico	81
Bromadiolona	Agua de riego	Método cinético en la modalidad de flujo detenido Tb(III)(en imidazol)-bromadiolona	82
Medicamentos, xenobióticos		HPLC	83
Medicamentos, componentes biológicos		HPLC Electroforesis capilar	84
Ácido carmínico	Bebidas refrescantes de naranja	Modalidad de flujo detenido Eu(III)-ácido carmínico	85
Ácido salicílico, diflunisal	Suero sanguíneo	Modalidad de flujo detenido Lantánido: Tb(III) EDTA, CTAB	86
Ácido nalidíxico, norfloxacino	Suero humano	Modalidad de flujo detenido Lantánido: Tb(III) EDTA	87
Tetraciclina, doxitetraclina	Suero	Modalidad de flujo detenido Lantánido: Eu(III)	88
Tetraciclina, clorotetraciclina, doxitetraclina			89

En el presente capítulo se ha llevado a cabo el estudio mediante fluorescencia sensibilizada con el lantánido Eu (III), de las tetraciclinas metaciclina y demeclociclina. Este estudio ha concluido con la determinación de ambas individualmente en orina y suero, consiguiendo recuperaciones satisfactorias en todos los casos.

3.- DETERMINACIÓN DE DEMECLOCICLINA Y METACICLINA POR FLS

ESTUDIOS PREVIOS

Inicialmente y para comprobar la posible formación del complejo de transferencia de carga entre la demeclociclina (DM) y metaciclina (MT) con Eu (III), se fijaron las condiciones químicas de formación de los complejos entre este ión y otras tetraciclinas, referencia del trabajo de *Nadine Arnaud y Joseph Georges de Analyst* [1]. De este modo, se preparó una muestra que contenía $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DM ($2.4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$), pH 9, fijado por adición de 3 mL de tampón TRIS-HCl de pH 9, concentraciones de Eu (III) y EDTA ambas de 10^{-5} M y 1.3 mL de CTACl al 1%. En las mismas condiciones se preparó una muestra de DM en ausencia del ión Eu (III). Estas mismas condiciones experimentales se aplicaron para el estudio de MT.

A continuación, se registraron los espectros de excitación y emisión que se recogen en la Figura I.9. En ellos se puede observar que, en las condiciones empleadas, DM y MT forman complejos con el ión Eu (III), con máximos de excitación y emisión de 396 y 615 nm, respectivamente.

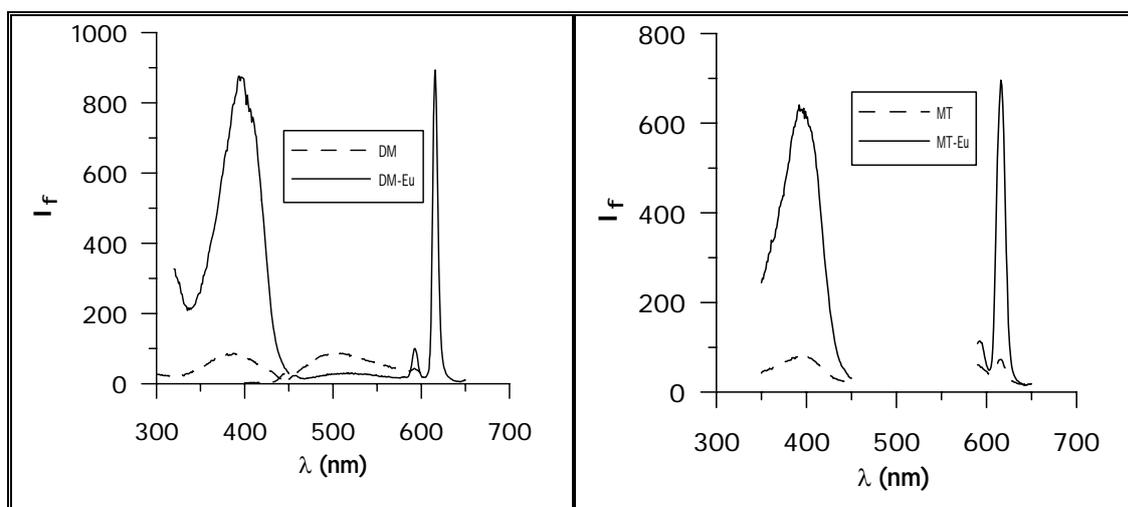


Figura I.9.- Espectros de excitación y emisión de DM y MT y de los complejos DM-Eu(III) y MT-Eu(III)

ESTUDIO DE ESTABILIDAD DE DISOLUCIONES

Se realizó el estudio de la estabilidad de la disolución de DM y MT, en función del tiempo. Se preparó una disolución $2.4 \cdot 10^{-6}$ M en las condiciones operatorias fijadas anteriormente, a la que se le registraron los espectros de emisión a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos muestran que las disoluciones de DM y MT son estables al menos durante 13 días.

También se llevó a cabo el estudio de la estabilidad de las disoluciones de los complejos DM-Eu y MT-Eu, en función del tiempo. Se prepararon dos muestras que contenían $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de tetraciclina, 3 mL de tampón TRIS-HCl de pH 9, concentraciones de Eu (III) y EDTA ambas de 10^{-5} M y 1.3 mL de CTACl al 1%. A esta muestra se le registraron los espectros de emisión, a diferentes tiempos, y se observó que las disoluciones de DM eran estables, guardadas en el frigorífico, al menos 6 días, mientras que las de MT lo eran al menos 9 días.

INFLUENCIA DE LA PRESENCIA DE EDTA

A fin de comprobar la influencia de la presencia de coligando, se prepararon muestras a pH 8 y 9, manteniendo siempre las mismas concentraciones de reactivos empleadas en la experiencia anterior, en presencia y ausencia de EDTA. El EDTA se utiliza simultáneamente con Eu (III) y en la misma concentración, para prevenir la formación de hidróxidos de europio en medios alcalinos [1]. También puede actuar como coligando, excluyendo las moléculas de agua de la esfera de coordinación del lantánido.

Los resultados obtenidos, representados en la Figura I.10, ponen de manifiesto que en presencia de EDTA, el complejo presenta una intensidad de fluorescencia mayor, por lo que las experiencias sucesivas se llevarán a cabo en presencia de éste.

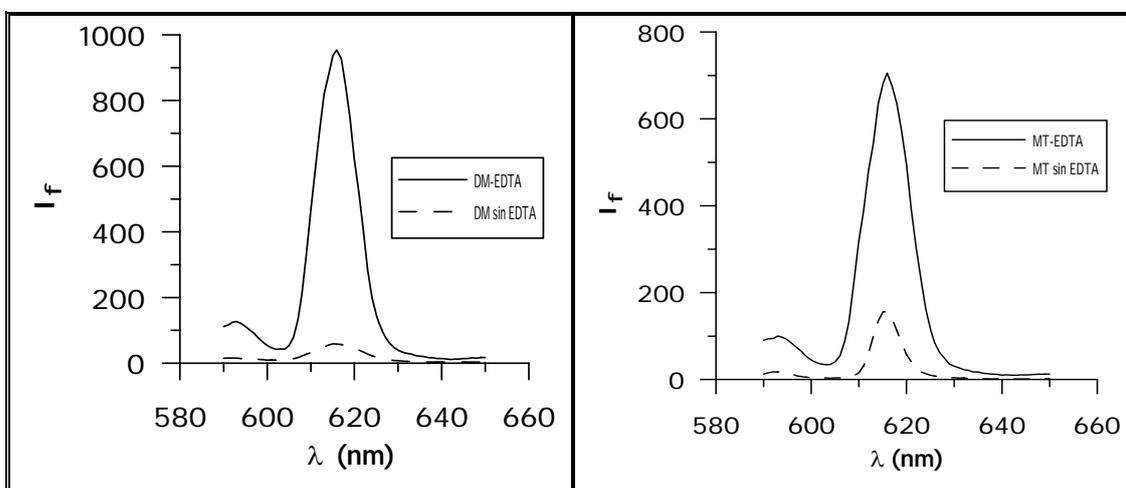


Figura I.10.- *Influencia de la presencia de EDTA en la intensidad de fluorescencia*

INFLUENCIA DEL pH

Para llevar a cabo el estudio de la influencia del pH, se prepararon disoluciones conteniendo $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.4 \cdot 10^{-6}\text{M}$) de demeclociclina y metaciclina, así como las concentraciones de Eu (III), EDTA y CTACl empleadas anteriormente. El pH de estas muestras se fue variando por adición de 3 mL de tampón, de pHs comprendidos entre 7 y 10.1.

En las Figuras I.11 y I.12 se han representado los espectros de emisión y la intensidad de fluorescencia, en función del pH.

Los resultados obtenidos muestran que el pH no produce cambios espectrales siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de 396 y 615 nm, respectivamente.

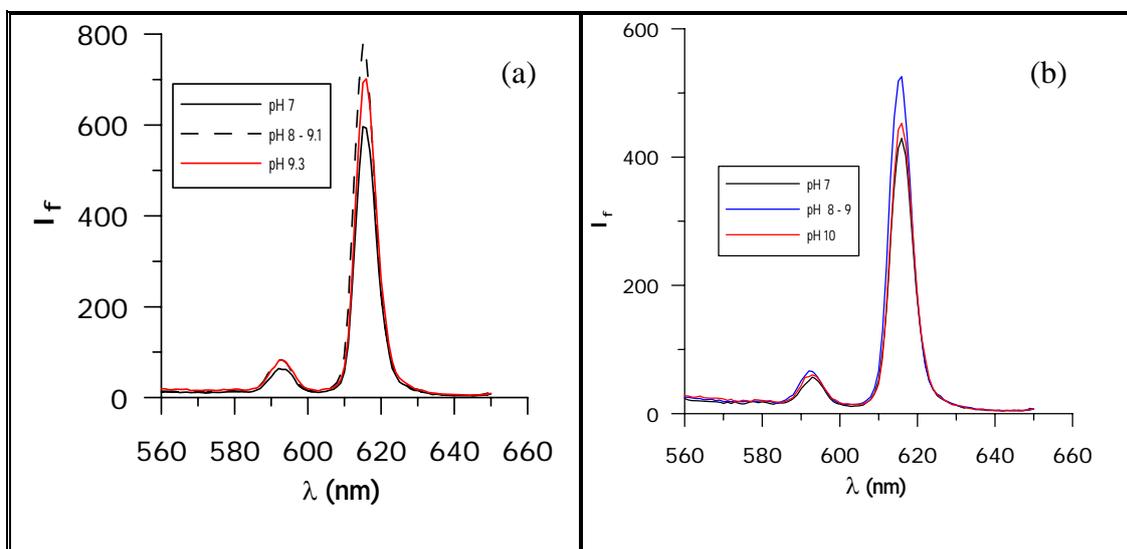


Figura I.11.- Espectros de emisión de los complejos *DM-Eu* (a) y *MT-Eu* (b) en función del pH

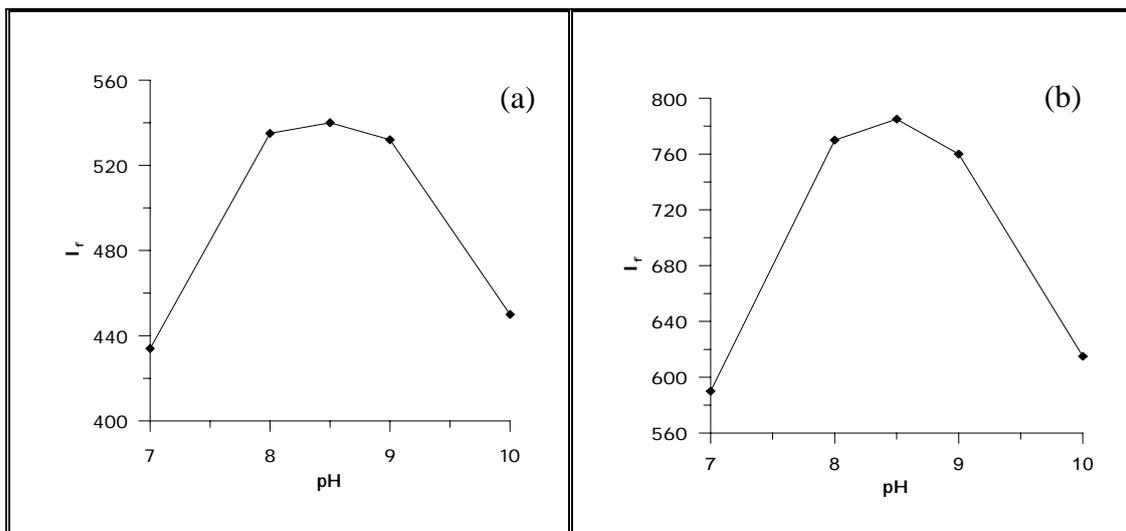


Figura I.12.- *Intensidad de fluorescencia de los complejos MT-Eu (III) (a) y DM-Eu (III) (b) en función del pH*

Si nos fijamos en la Figura I.12, la intensidad de fluorescencia, sin embargo, aumenta a medida que lo hace el pH hasta que éste alcanza un valor de 8.2, permaneciendo prácticamente constante para valores comprendidos entre pH 8.2 y pH 9.0, y disminuyendo en medios más alcalinos.

En las posteriores experiencias se empleará como medio de trabajo un pH de aproximadamente 8.4, fijado por adición de tampón TRIS-HCl.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE TAMPÓN

En las condiciones fijadas, se llevó a cabo el estudio de la concentración de tampón. Para ello se preparó una serie de muestras a las que se le adicionaron volúmenes crecientes de tampón TRIS-HCl de pH 8.36 y de concentración 0.06 M. Se registraron los espectros de emisión, excitando a 396 nm. En la Figura I.13 se muestra la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia a 615 nm en función del volumen de tampón añadido, siendo ésta máxima y prácticamente constante para volúmenes de tampón superiores a 1 mL.

De acuerdo con los resultados, en experiencias sucesivas se fijará el pH por adición de 2 mL de tampón TRIS-HCl 0.5 M de pH 8.36.

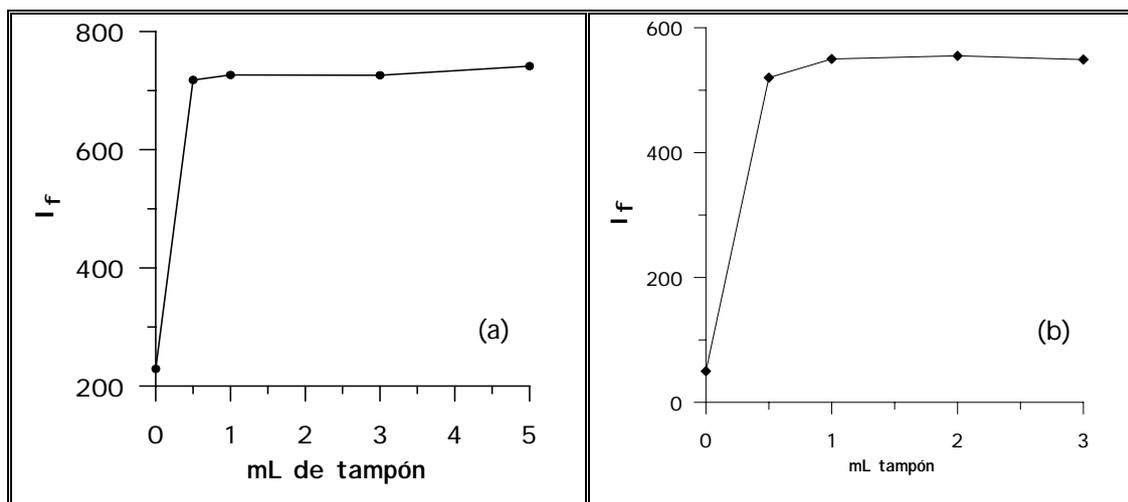


Figura I.13.- Intensidad de fluorescencia de los complejos DM-Eu (a) y MT-Eu (b) en función de la concentración de tampón

INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DEL SURFACTANTE

El surfactante actúa formando micelas. Éstas proporcionan un medio caracterizado por ser más viscoso y menos polar que la mayor parte de las disoluciones acuosas, por tanto, se espera que en presencia de surfactante haya un aumento de la señal luminiscente. (Roger D. Jee; *Analyst*)

Igualmente se estudió la influencia de la naturaleza del surfactante. Se utilizaron tres tipos de surfactantes: CTACl (Cloruro de cetiltrimetilamonio), CPC (Cloruro de cetilpiridinio monohidrato) y SDS (Dodecil sulfato sódico). Las disoluciones contenían $1.2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DM y MT, pH fijado por adición de 2 mL de

tampón TRIS-HCl de pH 8.36, concentraciones de Eu (III) y EDTA ambas de 10^{-5} M y 1.3 mL de surfactante al 1%.

Los resultados se muestran en la siguiente figura:

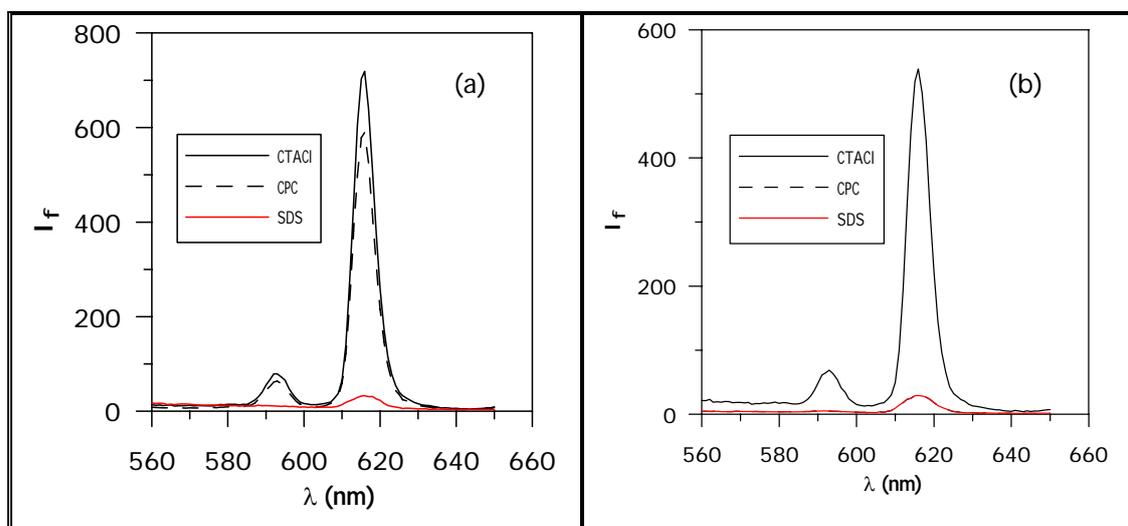


Figura I.14.- *Espectros de emisión de los complejos DM-Eu (a) y MT-Eu (b) en función de la naturaleza del surfactante*

En la Figura I.14 se puede comprobar que la naturaleza del surfactante tampoco produce cambios espectrales, siendo las longitudes de onda de excitación y emisión de 396 y 615 nm, respectivamente.

Como ya preveíamos, utilizando CTACl se obtiene mayor intensidad de fluorescencia. En su presencia, la desprotonación de los grupos OH, es probablemente más fácil, permitiendo la formación de un nuevo complejo con mejores propiedades luminiscentes.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE

Para estudiar la influencia de la concentración de surfactante se prepararon una serie de muestras a las que se le adicionaron volúmenes crecientes de CTACl al 1%. Se registraron los espectros de emisión, excitando a 396 nm. En la Figura I.15 se muestra la representación gráfica de la intensidad de fluorescencia a 615 nm, en función del volumen de surfactante añadido, siendo ésta máxima y prácticamente constante para volúmenes de CTACl superiores a 0.8 mL.

De acuerdo con los resultados, en las posteriores experiencias se fijará la concentración de CTACl añadiendo 1 mL de CTACl al 1%, por lo que la concentración de surfactante en las muestras preparadas será del 0.04%.

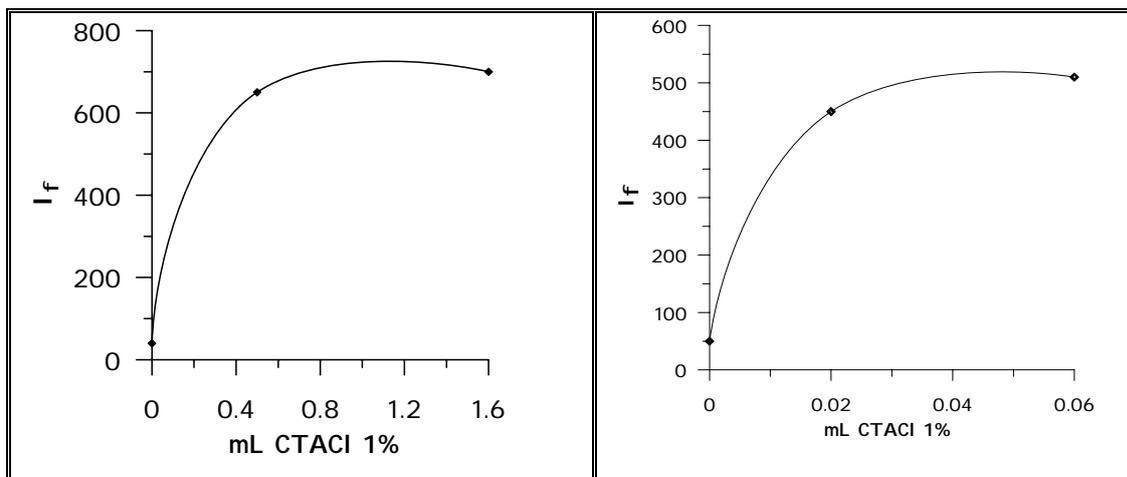


Figura I.15.- *Influencia de la concentración de surfactante*

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE EUROPIO (III)

Una vez optimizadas la concentración de tampón y de surfactante, se continúa el estudio optimizando la concentración de Eu (III). Para ello, se preparó una serie de muestras a las que se le adicionaron volúmenes crecientes de Eu (III) de concentración $1.25 \cdot 10^{-3} \text{M}$. Las relaciones de concentración $[\text{Eu (III)}] / [\text{DM}]$ y $[\text{Eu(III)}] / [\text{MT}]$ ensayadas fueron 0.6, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 15 y 20.

Se registraron los espectros de emisión, excitando a 396 nm, no observándose cambios espectrales. En la siguiente Figura se han representado las intensidades de fluorescencia a 615 nm, en función de la concentración de Eu (III).

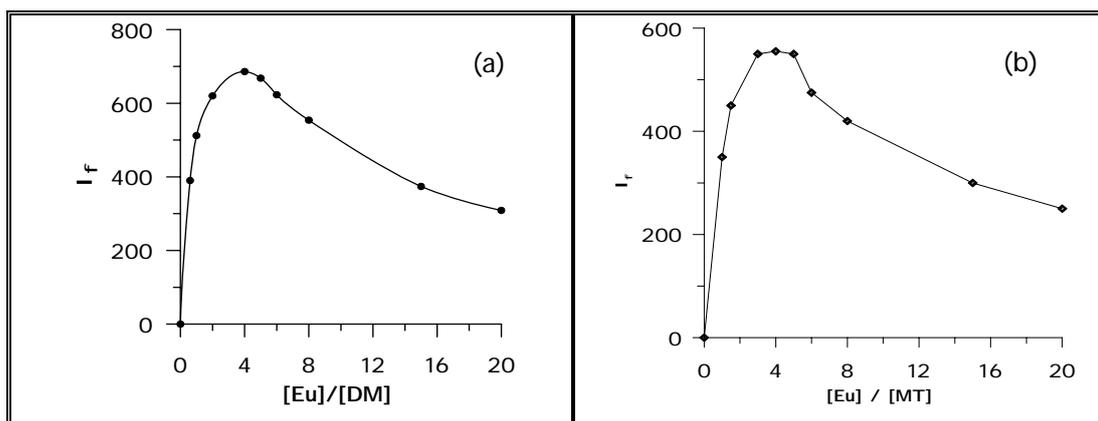


Figura I.16.- *Intensidad de fluorescencia de los complejos DM-Eu y MT-Eu en función de la concentración de Eu (III)*

Teniendo en cuenta que la concentración de tetraciclina es $2,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$, se elige una concentración de Eu (III) de 10^{-5}M , ya que la relación óptima es $\text{Eu} / \text{DM} \approx 4$. Es la misma que hemos utilizado en todos los experimentos anteriores y la que seguiremos utilizando. También podemos observar en la Figura I.16 como, a partir de una relación $\text{Eu} / \text{DM} \approx 5$, empieza a disminuir la intensidad de fluorescencia. En un caso extremo, como es la relación Eu / DM y $\text{Eu} / \text{MT} \approx 20$ se aprecia una

atenuación o quenching de fluorescencia por el denominado efecto de filtro interno o auto-absorción.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE DEMECLOCICLINA. ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO

Por último, se estudió la influencia de la concentración de demeclociclina. Se prepararon muestras manteniendo fijas las variables optimizadas anteriormente, es decir, 1 mL de CTACl al 1%, 2 mL de tampón TRIS-HCL 0.1 M de pH 8.36, 1 mL de EDTA y 0.2 mL de Eu (III) ambos de concentración 10^{-5} M y, lo único que variaba, era la concentración de demeclociclina en cada muestra. La disolución madre de demeclociclina era de $102 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($2.04 \cdot 10^{-4}$ M). Las muestras que se prepararon contenían 1, 2, 3.5, 4, 5, 6 y $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de DM. Se registraron los espectros de emisión, excitando a 396 nm. En la siguiente Tabla se recogen las medidas de fluorescencia para cada valor de concentración estudiado:

Tabla I.4.- Influencia de la concentración de DM

[DM] $\mu\text{g mL}^{-1}$	1	2	3.5	4	5	6	10
I_F	180.5	356.2	637.7	714.9	845.0	861.5	865.7

Se representaron los espectros de emisión medidos a 615 nm en función de la concentración de demeclociclina, no observándose cambios espectrales. En la Figura I.16 se representan los valores de intensidad de fluorescencia en función de la concentración de DM.

En la Figura I.17 se puede observar que el rango de linealidad es hasta aproximadamente $4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de demeclociclina. Aprovechando la gráfica de la

Figura I. 17, se estudió la estequiometría del complejo mediante el método de Joe y Jones, como se puede ver el la Figura I.18.

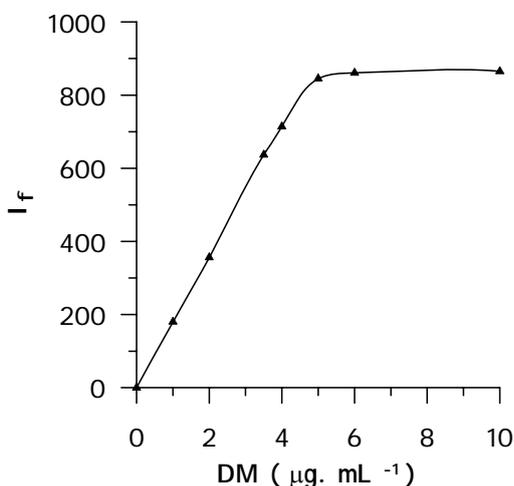


Figura I.17.- *Intensidad de fluorescencia del complejo DM-Eu (III) en función de la concentración de DM*

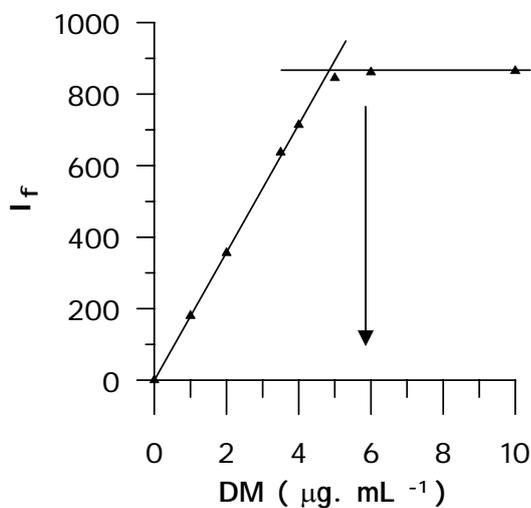


Figura I.18.- *Estequiometría del complejo*

A partir del punto de corte de los dos tramos rectos, se observa la estequiometría del complejo. En ese punto, la concentración de Eu (III) es 10^{-5} M y la de demeclociclina $4.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ($9.575 \cdot 10^{-6}$ M), por lo que la estequiometría del complejo es 1:1.

RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

La recta de calibrado se estableció preparando por triplicado, disoluciones de tetraciclina de concentración creciente, preparadas en las condiciones operatorias descritas. Se decidió construirla hasta una concentración máxima de 100 ng. mL⁻¹ para las posibles aplicaciones a muestras reales. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura I.19, ponen de manifiesto que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal con la concentración; estos resultados se confirmaron por el análisis de varianza (ANOVA). Los datos fueron tratados con el programa informático ACOC [90].

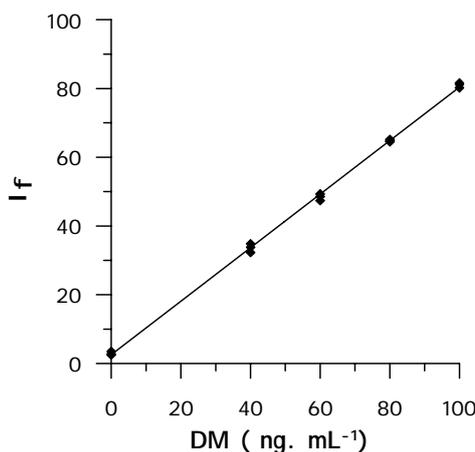


Figura I.19.- Recta de calibrado

El cálculo de la ecuación de la recta de calibrado, se ha realizado aplicando el modelo estadístico de la regresión lineal ordinaria, que permite, no sólo encontrar dicha ecuación con el menor error a partir de las medidas experimentales, sino que nos da una medida de la imprecisión de este cálculo. Dicha ecuación, que relaciona la concentración de analito (x) con la señal analítica (y), viene expresada como:

$$y = a + bx \quad (1)$$

La aplicación de este algoritmo implica la aceptación de tres supuestos:

- a) Los errores se tienen que producir únicamente en la medida de la señal instrumental.
- b) El error en la medida de la señal debe seguir una distribución normal
- c) El error absoluto de la medida de la señal instrumental debe ser constante e independiente de la concentración de la disolución patrón (condición de homocedasticidad).

Con los datos experimentales obtenidos, se han calculado los valores de la pendiente, **b**, y de la ordenada en el origen, **a**, partiendo de las ecuaciones correspondientes (expresiones 2 y 3) [91,92]. Hay que destacar que deben de tomarse las parejas de valores de forma individual y no calcular la media de las señales para cada patrón de concentración.

$$b = \frac{\sum_{i=1}^n [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})} \quad (2)$$

$$a = \bar{y} - b\bar{x} \quad (3)$$

En la expresión (2) y_i representa el valor de la señal instrumental obtenida para una concentración x_i de una disolución patrón, y \bar{x} e \bar{y} son respectivamente los valores medios del grupo de concentración y de señales empleadas en la calibración.

Asimismo, se ha calculado la desviación estándar de regresión, $S_{y/x}$, de y sobre x , mediante la ecuación (4).

$$s_{y/x} = \sqrt{\frac{1}{n-2} \sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2} \quad (4)$$

donde \hat{y}_i es el valor de la señal calculada a partir de la ecuación de regresión correspondiente a una concentración x_i , y n es el número total de puntos utilizados en la construcción de la recta de calibración; la desviación estándar de regresión, $S_{y/x}$, mide la dispersión de las señales analíticas medidas alrededor de la recta de calibrado ajustada, indicando un valor de $S_{y/x}$ de cero que todos los valores medidos están sobre la recta de regresión. Su valor indica el error experimental que afecta a la regresión de los datos y puede considerarse, en primera aproximación, una medida de la bondad del ajuste de los datos experimentales a la recta.

A partir del valor de la desviación estándar de regresión, $s_{y/x}$, se calcula la desviación estándar de la pendiente, S_b , a través de la ecuación 5, que es una medida del error que se comete en la determinación de la pendiente de la recta de regresión

$$s_b = s_{y/x} \sqrt{\frac{1}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (5)$$

La desviación estándar de la ordenada en el origen, s_a , que es una medida del error que se comete en la determinación de la ordenada en el origen, se calcula a través de la ecuación 6.

$$s_a = s_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n x_i^2}{n \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (6)$$

Para expresar linealidad se emplea el coeficiente de determinación, r^2 :

$$r^2 = \frac{\sum (\hat{y}_i - \bar{y})^2}{\sum (y_i - \bar{y})^2} \quad (7)$$

Valores de r^2 próximos a uno, no implican necesariamente una calidad elevada en los datos analíticos. En la literatura podemos encontrar una expresión alternativa de linealidad [93], como una relación entre la pendiente y la desviación estándar de la pendiente, es decir, la desviación estándar relativa de la pendiente expresada en %:

$$\text{linealidad}(\%) = \left(1 - \frac{s_b}{b}\right) \times 100 \quad (8)$$

Parámetros de calidad

Los parámetros de fiabilidad del método: linealidad, sensibilidad, precisión y límites de detección y determinación han sido determinados mediante el modelo de regresión lineal, a partir del conjunto de datos obtenidos en la experiencia de calibrado. En el cálculo del límite de detección se ha utilizado el criterio de Clayton [94] y el de Winefordner y Long [95].

Linealidad.- Se define a partir de la desviación estándar relativa de la pendiente, DER (b), que se calcula por el cociente del valor de s_b entre b , según la siguiente expresión:

$$\text{Linealidad}(\%) = (1 - s_b/b) \times 100 \quad (9)$$

Sensibilidad.- Como medida de la sensibilidad, se ha hecho uso de una expresión derivada del análisis de la regresión, cuyo valor es característico del calibrado del método instrumental, y permite ser utilizado como criterio de comparación (4), definiéndose como la relación entre la desviación estándar de regresión, $S_{y/X}$, y la pendiente, b .

$$\text{Sensibilidad analítica} = s_{y/x} / b \quad (10)$$

Límite de detección.- En la definición propuesta por la IUPAC [96,97], el límite de detección se define como tres veces la desviación estándar relativa de la señal analítica correspondiente al “blanco”, dividido por la pendiente de la recta de calibrado.

$$LD = 3S_{\text{blanco}}/b$$

Con esta definición, en realidad, se está calculando la desviación estándar de la concentración correspondiente al blanco, y no se toma en consideración la imprecisión del valor de la pendiente. Este modelo ha sido ampliamente discutido en un documento del *Analytical Methods Committee* [98], y en un trabajo crítico de Long y Winefordner [95], en el que se propone un modelo de cálculo basado en la propagación de errores, a utilizar cuando la imprecisión de la pendiente y del término independiente son del mismo orden de magnitud que la correspondiente a la medida de la señal analítica.

Teniendo en cuenta estas consideraciones hemos calculado directamente el valor de S_x , utilizando los valores de la señal del “blanco”, medidos para establecer la recta de calibrado [95, 99, 100]. De esta forma, el límite de detección se calcularía, como se indica en la ecuación

$$LD = 3 S_{\text{blanco}} \quad (11)$$

Asimismo, hemos utilizado el modelo propuesto por Clayton y col. [94] que permite calcular un límite de detección con garantías de probabilidad sobre el falso positivo (error estadístico α) y falso negativo (error estadístico β).

Se obtiene, igualmente, utilizando el valor de la desviación estándar de los blancos, estimada sobre la concentración, S_{co} . Este valor, se ha obtenido, como ya hemos indicado, a partir de la aplicación del modelo de regresión con réplicas para cada valor de concentración.

Los dos tipos de probabilidades que considera Clayton para evaluar el procedimiento analítico son:

- Probabilidad de falso positivo; probabilidad de afirmar que está presente el analito cuando no es cierto (Error α)
- Probabilidad de falso negativo; probabilidad de afirmar que no hay analito cuando sí lo hay (Error β)

En la definición de la IUPAC, mediante las sucesivas repeticiones del blanco analítico, se obtiene una estimación de la señal media, y_0 y de la desviación estándar, s_0 . De este modo, es posible disponer de un intervalo de confianza unilateral para la medida teórica de la señal del blanco al nivel de significación α . El intervalo de señales cumple la siguiente ecuación:

$$y_0 + k s_0$$

correspondiéndose ésta con el valor que toma la señal de detección, y_d , donde k toma diferentes valores en función de α (para $\alpha = 0.05$, $K=3$).

Según esto, dada una muestra problema, la probabilidad de tener una señal por encima de y_0 y, por tanto, de afirmar que en ella hay analito, es α ; es decir, la regla de la IUPAC solo evalúa la probabilidad de un falso positivo en el análisis de la muestra problema, pero no evalúa la probabilidad de un falso negativo. Si existe la misma distribución normal para el blanco analítico que para una muestra con la concentración x_d , correspondiente a la señal de detección y_d (límite de detección de la IUPAC), se deduce que vale 0.5 la probabilidad de tener una señal por debajo de y_d , resultando que la probabilidad de falso negativo es del 50 % [99].

El límite de detección propuesto por Clayton resuelve este inconveniente considerando la misma probabilidad para el falso positivo y negativo ($\alpha=\beta=0.05$), obteniéndose para éste, un valor más elevado que el obtenido siguiendo el criterio de la IUPAC.

Se calcula según la expresión

$$LD = S_{co} \Delta(\alpha, \beta)$$

donde el valor $\Delta(\alpha, \beta)$, se encuentra tabulado en función del número de grados de libertad ($n-2$) y del nivel de significación seleccionado, para los errores α y β . En nuestro caso, hemos utilizado unos valores de $\alpha = 0.05$ y $\beta = 0.05$.

Cuando no se dispone de la señal del blanco, el límite de detección se calcula mediante la siguiente expresión (12):

$$LD = 3s_{y_0} / b \quad (12)$$

donde s_{y_0} , viene dado por la ecuación (13):

$$S_{y_0} = S_{y/x} \sqrt{\frac{1}{m} + \frac{1}{n} + \frac{(-\bar{x})^2}{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}} \quad (13)$$

Límite de determinación.- El límite de determinación o cuantificación se calcula sustituyendo en la ecuación (12) el valor de 3 por 10 [96,98], tal y como se indica en la siguiente ecuación:

$$LQ = 10 S_{\text{blanco}} \quad (14)$$

En técnicas, como HPLC, en las que no se dispone de la señal del blanco, la expresión que se emplea para la obtención de este límite viene dado por (15):

$$LQ = 10 S_{y_0} / b \quad (15)$$

donde S_{y_0} se calcula mediante la expresión (13).

Repetitividad.- La repetitividad de las medidas permite tener una idea de la precisión del método propuesto. Ésta mide el grado de incertidumbre que podemos esperar, de los resultados analíticos obtenidos a partir de un calibrado. Matemáticamente, la precisión viene dada por la desviación estándar relativa, calculada dividiendo la desviación estándar, s_x , entre el valor medio de la concentración determinado, y expresada en forma de porcentaje (DER %).

Para evaluarla, la IUPAC proponía preparar una serie de muestras que contenían un valor de concentración que, por lo general, correspondía al valor intermedio dentro del intervalo establecido en la recta de calibrado. A partir de las señales obtenidas, se calculaban las concentraciones mediante la recta de calibrado y se determinaba la desviación estándar relativa, DER(%), para la concentración elegida.

Los parámetros de calidad obtenidos para la recta de calibrado se recogen en la Tabla I.5.

Tabla I.5.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	778.8
Ordenada en el origen (a)	2.5
Desviación típica de la pendiente (S_b)	6.7
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.4
Desviación típica estimada (error estándar)	0.8
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999
Linealidad (1 - DER (b)) %	99
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.001
Limite de determinación (IUPAC)	0.01
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.002
LOD (Clayton)($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.003

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE METACICLINA. ESTEQUIOMETRÍA DEL COMPLEJO

Con los datos experimentales obtenidos en el estudio de la influencia de la concentración de Eu(III), se procedió, asimismo, a determinar la estequiometría del complejo formado entre la metaciclina y el Eu(III) mediante un método gráfico, el “método de Yoe y Jones” (Figura I.20).

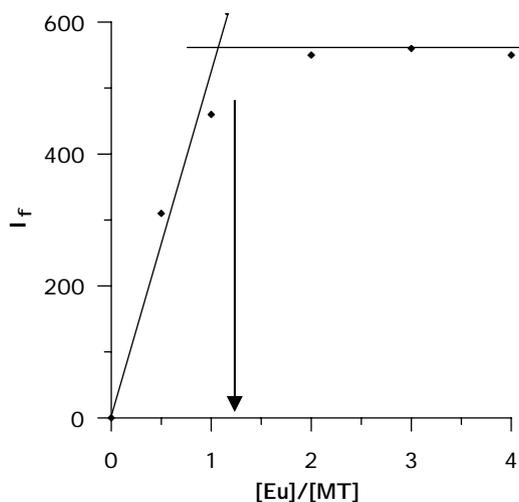


Figura I.20.- Estequiometría del complejo

En la Figura I.20 puede observarse que la estequiometría del complejo formado es 1:1 Eu(III):MT.

Con el fin de estudiar el rango de linealidad del método, se procedió a registrar el espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$) fluorescente de diferentes muestras conteniendo concentraciones crecientes de metaciclina, en las condiciones químicas anteriormente optimizadas, es decir, 2 mL de tampón TRIS-HCl 0.1 M de pH 8.36, 1 mL de CTACl al 1%, 1 mL de EDTA y 0.2 mL de Eu (III) ambos 10^{-5} M .

En la Figura I.21 se encuentra representada la intensidad de fluorescencia medida sobre el espectro de emisión ($\lambda_{\text{exc}} = 396 \text{ nm}$) a 615 nm en función de la concentración de metaciclina. Se aprecia un comportamiento lineal de la intensidad de fluorescencia hasta una concentración de $4 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de metaciclina.

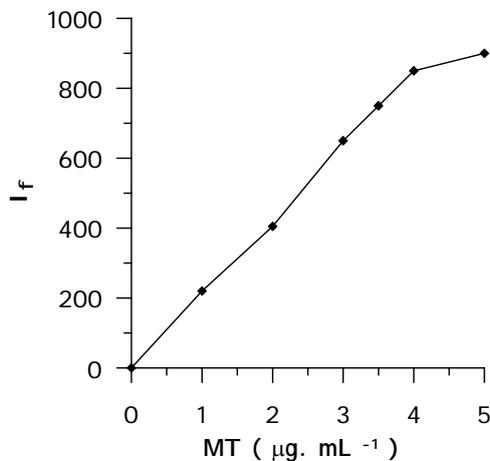


Figura I.21.- *Intensidad de fluorescencia del complejo MT-Eu (III) en función de la concentración de MT*

RECTA DE CALIBRADO Y PARÁMETROS DE CALIDAD

La recta de calibrado se estableció preparando por triplicado, disoluciones de tetraciclina de concentración creciente en las condiciones operatorias descritas. Se decidió construirla hasta una concentración máxima de 100 ng. mL⁻¹ para las posibles aplicaciones a muestras reales. Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura I.22, ponen de manifiesto que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal con la concentración de MT; estos resultados se confirmaron por el análisis de varianza (ANOVA). Los datos fueron tratados con el programa informático ACOC, encontrando los parámetros de calidad que se recogen en la Tabla I.6.

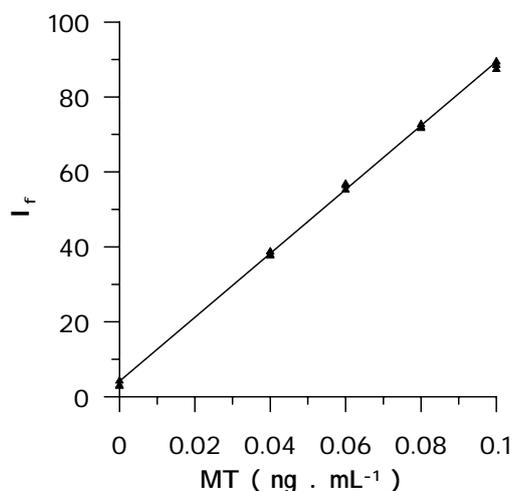


Figura I.22.- Recta de calibrado

Tabla I.6.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	852.9
Ordenada en el origen (a)	4.1
Desviación típica de la pendiente (S_b)	7.1
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.4
Desviación típica estimada (error estándar)	0.9
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999
Linealidad (1 - DER (b)) %	99
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.001
Limite de determinación (IUPAC)	0.01
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.002
LOD (Clayton)($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.003

Las condiciones óptimas seleccionadas para ambos analitos son las siguientes: un volumen de 2 mL de tampón TRIS-HCl 0.1M de pH 8.36, un volumen de 1 mL de CTACl al 1%, 1 mL de EDTA y 0.2 mL de Eu(III) ambos 10^{-5} M.

DETERMINACIÓN EN ORINA Y SUERO

De la búsqueda bibliográfica se encuentran como niveles terapéuticos de las tetraciclinas en orina unos valores de 300-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ y en suero de 1-5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Se buscaron también los tratamientos de dichas muestras, encontrando para la orina que con una dilución adecuada puede eliminarse el fondo mientras que para el suero casi siempre suele utilizarse una desproteinización previa.

✓ *ORINA*

Se probaron las diluciones 1:10, 1:50, 1:100, 1:1000 con objeto de encontrar aquella con la que se consiga que la señal producida por el fondo de la orina sea lo menor posible. Después de observar los espectros obtenidos se decidió elegir una dilución 1:1000. Al aplicar esta dilución la concentración de nuestro analito en el matraz de trabajo estaba en torno a los ng mL^{-1} con lo que se podrá hacer uso de la recta de calibrado establecida.

A continuación se pasó a intentar determinar nuestros analitos en diferentes muestras de orinas, obtenidas de diferentes compañeros del laboratorio no tratados con ningún fármaco que pudiese provocar interferencias. El procedimiento seguido es el que se detalla a continuación:

- ☞ Se toman 0.1 mL de orina
- ☞ Se contaminan con nuestro analito
- ☞ Se mantienen durante 30 minutos sin diluir para favorecer las interacciones entre la orina y el analito
- ☞ Se diluye a 100 mL
- ☞ A partir de esta disolución se preparan las respectivas muestras de trabajo aplicando nuestras condiciones operatorias

A continuación se registran los espectros de emisión del blanco de orina, de un patrón y de la orina contaminada con esa concentración de tetraciclina.

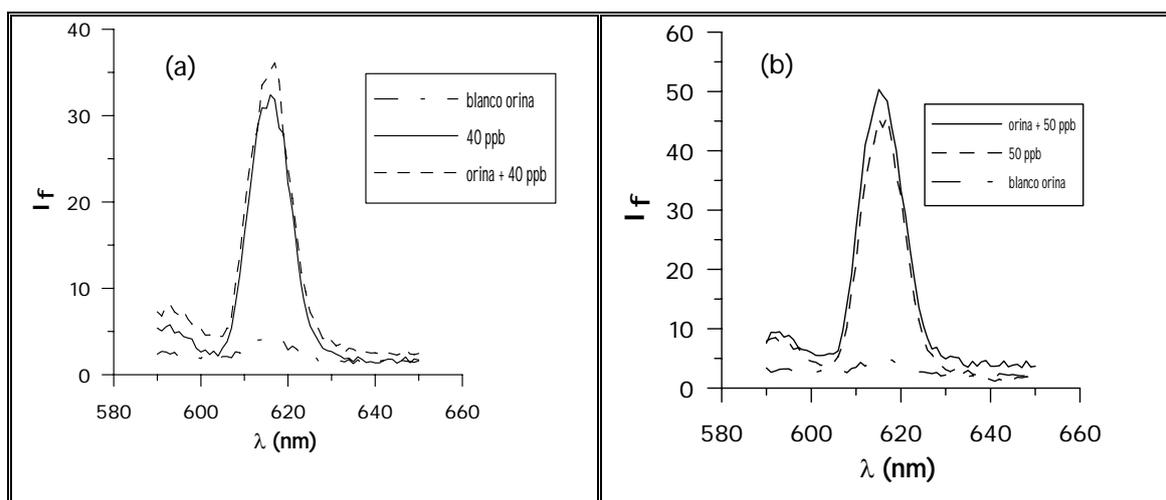


Figura I.23.- Determinación de DM y MT en orina

Los resultados obtenidos muestran que la señal obtenida para la orina contaminada es similar a la del patrón puro, por lo que una vez comprobado que no existe efecto por parte de la matriz, el método a seguir será: se toma la muestra de orina, se contamina con el analito, se deja reposar y después se diluye. A partir de esta disolución se prepara la correspondiente muestra de trabajo, a la que se le registra el correspondiente espectro de emisión. La medida de la intensidad de fluorescencia obtenida se sustituye en la correspondiente recta de calibrado, obteniéndose así la concentración de demeclociclina y metaciclina en orina.

Las recuperaciones obtenidas en el análisis de 4 orinas de diferentes personas quedan reflejadas en la siguiente tabla:

Tabla I.7.- Recuperaciones obtenidas para la determinación de DM en orina por FLS

Muestra	Añadido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperación (%)
<i>Orina 1</i>	200	220 \pm 10	110
	250	271 \pm 2	108
	300	315 \pm 9	105
<i>Orina 2</i>	200	215 \pm 10	107
	250	240 \pm 8	96
	300	307 \pm 10	102
<i>Orina 3</i>	200	217 \pm 8	108
	250	234 \pm 6	94
	300	292 \pm 9	97
<i>Orina 4</i>	200	187 \pm 7	94
	250	230 \pm 9	92
	300	312 \pm 8	104

Tabla I.8.- Recuperaciones obtenidas para la determinación de MT en orina por FLS

Muestra	Añadido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperación (%)
<i>Orina 1</i>	200	219 \pm 2	109
	250	257 \pm 7	103
	300	319 \pm 4	106
<i>Orina 2</i>	200	213 \pm 9	106
	250	243 \pm 8	97
	300	314 \pm 10	105
<i>Orina 3</i>	200	220 \pm 10	110
	250	267 \pm 6	107
	300	334 \pm 6	110
<i>Orina 4</i>	200	219 \pm 4	109
	250	264 \pm 9	106
	300	328 \pm 7	109

Los resultados obtenidos permiten concluir que las recuperaciones son bastantes satisfactorias en todos los casos, siendo algo más elevadas en el caso de que la concentración añadida sea más pequeña debido seguramente al mayor efecto de la orina.

Dada la gran dilución a la que se debe someter a la orina para poder determinar directamente nuestro analito, el método descrito presenta un interés práctico limitado, con lo que el siguiente objetivo será la determinación de ambos analitos en muestras de suero.

✓ SUERO

Una vez determinadas DM y MT en orina, se pasó a intentar determinar éstos mismos antibióticos en suero plasmático. Estas muestras procedían del Hospital Infanta Cristina, permanecían congeladas hasta el momento del análisis. En este punto se descongelaban a temperatura ambiente las cantidades necesarias para llevar a cabo el análisis.

En primer lugar se intentó determinarlos en suero con sólo aplicar una dilución a éste, pero después de probar varias diluciones se concluyó que era imposible, ya que el suero producía una gran señal de fondo. Por tanto, se decidió probar con un tratamiento con acetonitrilo para desproteinarlo. Después de varios ensayos, el procedimiento elegido para dicha determinación fue el que se detalla a continuación:

- Se toman 0.5 mL de suero plasmático
- Se contamina con nuestro analito
- Se deja en reposo para favorecer las interacciones
- Se añade 1 mL de ACN
- Se centrifuga la muestra durante 10 minutos a 6500 r.p.m
- Se toma 1mL del sobrenadante y se preparan las disoluciones de trabajo según el método operatorio propuesto.

En estas condiciones se registraron los espectros de emisión del blanco de suero, del patrón y del suero contaminado con la misma concentración que el patrón. Estos espectros se recogen en la siguiente Figura.

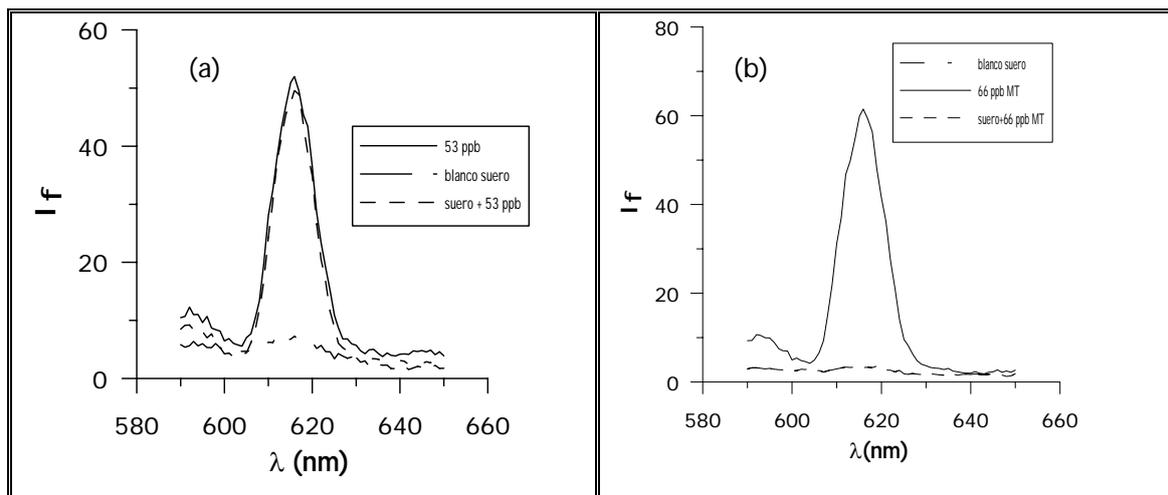


Figura I.24.- *Determinación de DM (a) y MT (b) en suero plasmático*

Se observa que la señal obtenida para el suero contaminado es similar a la del patrón puro, por lo que el método a seguir será el siguiente. Una vez comprobado que no existe efecto por parte de la matriz, se toma la muestra de suero y se sigue el procedimiento correspondiente. A la muestra de trabajo se le registra el correspondiente espectro de emisión; el valor de intensidad de fluorescencia se sustituye en la correspondiente recta de calibrado, obteniéndose así la concentración de demeclociclina y metaciclina en suero.

El método fue aplicado a 4 muestras de sueros, encontrando las recuperaciones que se recogen en la siguiente tabla:

Tabla I.9.- Recuperaciones para la determinación de DM en suero plasmático por FLS

Muestra	Añadido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperación (%)
<i>Suero 1</i>	3	3.10 ± 0.06	103
	4	4.08 ± 0.03	102
	5	5.10 ± 0.07	102
<i>Suero 2</i>	3	2.89 ± 0.09	96
	4	4.20 ± 0.05	105
	5	4.90 ± 0.07	98
<i>Suero 3</i>	3	2.94 ± 0.04	98
	4	3.88 ± 0.02	97
	5	5.20 ± 0.07	104
<i>Suero 4</i>	3	3.20 ± 0.08	106
	4	3.90 ± 0.09	97
	5	5.30 ± 0.03	106

Tabla I.10.- Recuperaciones para la determinación de MT en suero plasmático por FLS

Muestra	Añadido ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Encontrado ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Recuperación (%)
<i>Suero 1</i>	3	3.20 ± 0.09	106
	4	3.77 ± 0.02	94
	5	4.90 ± 0.05	98
<i>Suero 2</i>	3	2.89 ± 0.10	96
	4	4.01 ± 0.10	100
	5	5.19 ± 0.09	104
<i>Suero 3</i>	3	3.15 ± 0.07	105
	4	3.85 ± 0.07	96
	5	4.90 ± 0.05	98
<i>Suero 4</i>	3	2.90 ± 0.08	97
	4	4.29 ± 0.07	107
	5	4.80 ± 0.07	96

Los resultados obtenidos permiten concluir que las recuperaciones son bastantes satisfactorias en todos los casos.

4.- CONCLUSIONES

En este Capítulo se presenta un método, como alternativa a los métodos cromatográficos, que puede utilizarse en análisis de rutina, para la determinación individual de metaciclina y demeclociclina en muestras de suero, haciendo uso de fluorescencia sensibilizada por lantánidos. Se utilizan simultáneamente EDTA y Europio, para prevenir la formación de hidróxidos de europio en soluciones alcalinas, actuando el EDTA como co-ligando para excluir las moléculas de agua de la esfera de coordinación del lantánido. El uso de sistemas micelares, particularmente CTACl, provee un entorno caracterizado por la baja polaridad y la alta viscosidad de la fase acuosa, que aumenta de manera simple la luminiscencia sensibilizada de las tetraciclinas con Europio (III), mejorando los límites de detección. Además, el estudio realizado puede ser útil como un estudio preliminar para el desarrollo de un método cromatográfico para la determinación de estas tetraciclinas, utilizando la fluorescencia sensibilizada con europio, como sistema de detección.

- 1.- Arnaud, N, Georges J., *Analyst*, 2001, 126, 694
- 2.- Compendio Esencial de Química farmacéutica; A. Korolkovas, J.H. Burckhalter; Editorial Reverté, S.A.
- 3.- <http://www.farmacoweb.com>; Dra. Sánchez, Dpto. de Ciencias Fisiológicas
- 4.- Bruno, F., Curini, R., Corcia, A., Nazzari, M., Pallagrosi, M.; *Rapid-Commun-Mass-Spectrom.*, 2002; 16, 1365
- 5.- Rogstad, A., Hormazabal V., Yndestad, M.; *J-Liq-Chromatogr*, 1988; 11, 2337
- 6.- Zhu, J., Snow, D.D., Cassada, D.A., Monson, S.J., Spalding, R.F.; *J-Chromatogr.-A.*; 2001; 928, 177
- 7.-Tanase, S., Tsuchiya, H., Yao, J., Ohmoto, S., Takagi, N., Yoshida, S.; *J-Chromatogr.-B: -Biomed-Appl.*; 1998; 706, 279
- 8.- Chen, Y.C., Lin, C.E.; *J-Chromatogr.-A.*; 1998; 802, 95
- 9.- Kazemifard, A.G., Moore, D.E.; *J-Pharm-Biomed-Anal.*; 1997; 16, 689
- 10.-Hoogmartens, J.; *Pharmeuropa*; 1993; 5, 149
- 11.- Gastearena, I., Dios-Vietez, M.C., Segura, E., Goni, M.M., Renedo, M.J., Fos, D.; *Chromatographia*;1993; 35, 524
- 12.-Oka, H., Ito, Y., Matsumoto, H.; *J-Chromatogr.-A.*; 2000; 882, 109
- 13.-Bryan, P.D., Stewart, J.T.; *J-Pharm-Biomed-Anal.*; 1994; 12,675
- 14.-Nieder, M., Jaeger, H.; *Chromatographia*; 1988; 25, 526
- 15.-Nelis, H.J.C.F., De-Leenheer, A.P.; *J-Chromatogr.*; 1980; 195, 35
- 16.-Halvatzi, S.A., Timotheu-Potamia, M.M., Calokerinos, A.C.; *Analyst*; 1993; 118, 633
- 17.-García-Ruiz, C., Crego, A.L., Lavandera, J.L., Marina, M.L.; *Electrophoresis*; 2001; 22, 2775
- 18.-Li, Y.M., Van-Shepdael, A., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Pharm-Biomed-Anal.*; 1997; 15, 1063
- 19.-Li, Y.M., Van-Shepdael, A., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Chromatogr.-A.*; 1996; 740,119
- 20.-Tavares, M.F.M., McGuffin, V.L.; *J-Chromatogr.-A.*; 1994; 686,129
- 21.-Kondo, F., Yamaguchi, R.; *Shokuhin-Eiseigaku-Zasshi*; 1988; 29, 185
- 22.-Croubels, S., Van-Peteghem, C., Baeyens, W.; *Analyst* ;1994; 119,2713

- 23.-Kurittu, J., Lonnerberg, S., Virta, M., Karp, M.; *J-Agric-Food-Chem.* 2000, 48, 3372
- 24.-Cutie, A.J., Mills, J., Jochsberger, T.; *Drug-Dev-Ind-Pharm*, 1980, 6, 77
- 25.-Cooper, A.D., Stubbings, G.W.F., Kelly, M., Tarbin, J.A., Farrington, W.H.H., Shearer, G.; *J-Chromatogr.-A.* 1998, 812, 321
- 26.-Santos, M.D.F., Vermeersch, H., Remon, J.P., Schelkens, M., De-Backer, P., Ducatelle, R., Haesebrouck, F.; *J-Chromatogr.-B:-Biomed-Appl* 1996, 682,301
- 27.-Orti, V., Audran, M., Gibert, P., Bougard, G., Bressolle, F.; *J-Chromatogr.-B: - Biomed-Appl* 2000, 738,357
- 28.-Stubbings, G., Tarbin, J.A., Shearer, G.; *J-Chromatogr.-B: -Biomed-Appl.*; 1996; 679, 137
- 29.-LeDuc, B.W., Greenblatt, D.J., Freidman, H.; *J-Chromatogr.-B: -Biomed-Appl.*; 1989; 82, 474
- 30.-Rogstad, A., Weng, B.; *J-Pharm-Sci.*;1993; 82, 518
- 31.-Weng, N., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Pharm-Biomed-Anal.*; 1989; 7, 1691
- 32.-Aszalos, A., Haneke, C., Hayden, M.J., Crawford, J.; *Chromatographia*; 1982; 15, 367
- 33.-Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y., Oka, H.; *J-Chromatogr.-B: - Biomed-Appl*; 1999,732, 55
- 34.-Naidong, W., Hua, S., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC*; 1994, 7, 297
- 35.-Naidong, W., Hauglustaine, C., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC*; 1991, 4, 63
- 36.-Naidong, W., Cachet, T., Roets, E., Hoogmartens, J.; *J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC*; 1989, 2, 424
- 37.-Kang, J.S., Ebel, S.; *J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC*; 1989, 2, 434
- 38.-Sultan, S.M., Suliman, F-EO, Duffuaa, S.O., Abu-Abdoun, -II; *Analyst*, 1992; 117, 1179
- 39.-Jelkic-Stankov, M., Stankov, D., Malesev, D., Radovic, Z.; *Mikrochim-Acta*; 1991, I, 65
- 40.-Abdel-Khalek, M.M., Mahrous, M.S.; *Talanta*; 1983, 30, 792
- 41.-Aboul Enein H.Y., Sun X.X., Sun C.J.; *Sensors*. 2002, 2,424

- 42.- Jia W., Sun L., Shi X.G., Chen X.Y., Zhong D.F.; *Shenyang-Yaoke-Daxue-Xuebao*. 2002; 19, 96
- 43.- Wang L., Zhang X.S., Xu Z.X., Shao X.G.; *Sepu*. 2002, 20,
- 44.- Castellanos Gil E., Dehouck P., Van Schepdael A., Roets E., Hoogmartens J; *Electrophoresis*. 2001, 22, 497
- 45.- Fan B., Yuan W.W., Tian G.; *Yaowu-Fenxi-Zazhi*. 2001; 21, 31
- 46.- Kurittu J., Lonngberg S., Virta M., Karp M.; *J-Agric-Food-Chem*. 2000; 48, 3372
- 47.- Monser L., Darghouth F.; *J-Pharm-Biomed-Anal*. 2000; 23,353
- 48.- Oka H., Ito Y., Matsumoto H.; *J-Chromatogr-A*. 2000; 882, 109
- 49.- Kamel A.M., Brown P.R., Munson B.; *Anal-Chem*. 1999; 71, 968
- 50.- Kazemifard A.G., Moore D.E.; *J-Pharm-Biomed-Anal*. 1997; 16, 689
- 51.- Pesek J.J., Matyska M.T.; *J-Chromatogr-A*. 1996; 736, 313
- 52.- Carson M.C., Breslyn W.; *J-AOAC-Int*. 1996; 79,29
- 53.- Tavares M.F.M., McGuffin V.L.; *J-Chromatogr-A*. 1994; 686, 129
- 54.- Naidong W., Hua S., Roets E., Hoogmartens J.; *J-Planar-Chromatogr-Mod-TLC*. 1994, 7,297
- 55.- Naidong W., Verresen K., Roets E., Hoogmartens J.; *J-Chromatogr*. 1991, 586,61
- 56.- Naidong W., Hua S., Verresen K., Roets E., Hoogmartens J.; *J-Pharm-Biomed-Anal*. 1991, 9,717
- 57.- Liu W., Jiang H., Du A.; *Yaoxue-Xuebao*. 1991; 26, 391
- 58.- Saha U., Sen A.K., Das T.K., Bhowal S.K.; *Talanta*. 1990; 37,1193
- 59.-Saha U.; *J-Assoc-Of-Anal-Chem*. 1989; 72, 242
- 60.- Kondo F., Morikawa S., Tateyama S.; *J-Food-Prot*. 1989; 52, 41
- 61.- Yasin A., Jefferies T.M.; *J-Pharm-Biomed-Anal*. 1988; 6,867
- 62.- Oka H., Ikai Y., Kawamura N., Uno K., Yamada M., Harada K., Suzuki M.; *J-Chromatogr*. 1987; 400, 253
- 64.- Sergeev G.M., Dorofeeva I.V., Stepanova L.G.; *Zh-Anal-Khim*. 1986; 41,1694
- 65.- Dihuidi K., Kucharski M.J., Roets E., Hoogmartens J., Vanderhaeghe H.; *J-Chromatogr*. 1985; 325, 413
- 66.- Narayana G.L.; *Indian-J-Chem-Sect-A*. 1981; 20, 1228
- 67.- Regosz A., Zuk G., Sowinska Dalecka A.; *Pol-J-Pharmacol-Pharm*. 1981; 33, 129

- 68.- Stockes, G.G., *Phil. Trans.*, 1852, 142, 463
- 69.- Stockes, G.G., *Phil. Trans.*, 1853, 143, 385
- 70.- Marquer P.J., *Dictionaire de Chymie*, 1779, 462
- 71.- Marquer P.J., *Dictionaire de Chymie*, 1779, 464
- 72.- McGlynn S.P., Azumi T., Kinoshita M., “*Molecular Spectroscopy of the Triplet State*” Prentice-Hall, Englewood Cliffs: N.J., 1969
- 73.-Georges, J., *Analyst* 1993,118; 1481
- 74.-Rieutord, A., Prognon, P., Brion, F., Mahuzier, G., *Analyst*, 1997,122, 59R
- 75.-Weissman, S. I., *J. Chem. Phys.* 1942, 10, 214
- 76.-Dibella, E. E., Weisman, J. B., Joseph, M. J., Schultz, J. R., Wenzel, T. J., *J. Chromatogr.* 1985, 328, 101
- 77.-Ocana, J.A., Callejón, M., Barragán, F.J., de la Rosa, F.F., *Anal-Chim-Acta.* 2003, 482, 105
- 78.-Cuenca-Trujillo, R.M., Ayora-Canadá, M.J., Molina-Díaz, A., *J-AOAC-Int.* 2002, 85, 1268
- 79.-Ocana, J.A., Callejón, M., José-Barragán, F. ; *J-Pharm-Sci.* 2001, 90, 1553
- 80.-Aguilar-Caballos, M.P., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Analyst* (Cambridge, UK). 1999, 124, 1079
- 81.-Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Talanta.* 1998, 45, 829
- 82.-Sendra, B., Panadero, S., Gómez-Hens, A., *Anal-Chim-Acta.* 1997, 355, 145
- 83.-Rieutord, A., Prognon, P., Brion, F., Mahuzier, G.; *Analyst* (Cambridge, UK). 1997; 122, 59R
- 84.-Rieutord, A., Prognon, P., Mahuzier, G.; *Analisis.* 1996; 24, 349
- 85.-Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D.; *Fresenius’-J-Anal-Chem.* 1997; 357, 80
- 86.-Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Anal-Chim-Acta.*1996, 329, 135
- 87.-Panadero, S., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Anal-Chim-Acta.* 1995, 303, 39
- 88.-Izquierdo, P., Gómez-Hens, A., Pérez-Bendito, D., *Anal-Lett*, 1994, 27, 2303
- 89.-Hirschy, L.M., Dose, E.V., Winefordner, J.D.; *Anal-Chim-Acta.* 1983; 147, 311
- 90.- ACOC: “*Univariate linear regression calibration software in MATLAB environment. Application to the laboratory practices by chemistry students*” (The

Chemical Educator, In Press, Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D.)

- 91- Hwang J.D., Winerdforner J.D., *Progr. Analyt. Spectrosc.*, 1988, 11, 209
- 92.- Miller J.C., Miller J.N., “*Estadística para Química Analítica*”, Addison-Wesley. Iberoamericana, Wilmington, USA, 1993
- 93.- Cuadros Rodríguez L., García Campaña A. M., Jiménez Linares C., Román Ceba M. Estimation of performance characteristics of an analytical method using the data set of the calibration experiment. *Analytical Letters*. 1993, 26 1243
- 94.- Clayton C.A., Hines J.W., Elkins P.D., *Anal. Chem.* 1987, 59, 2506
- 95.- Long G.L., Winefordner J.D., *Ibid*, 1983, 55 ,712
- 96.-“Nomenclature, Symbols, Units and their usage in Spectrochemical Analysis II” *Spectrochim. Act.* 1978, 33, 242
- 97.- “Guidelines for Data Adquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry”, *Anal. Chem.* 1978, 52, 2242
- 98.- Analytical Methods Committee, *Analyst*, 1988, 113, 1469
- 99.- Miller J.N., *Analyst*, 1991, 3, 116
- 100.- Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.*, 1993, 28, 1243

1.-SULFAMIDAS

Uno de los tipos de antibióticos ampliamente utilizados en medicina y veterinaria para el tratamiento de las infecciones bacterianas son las sulfonamidas, sulfamidas o "sulfas".

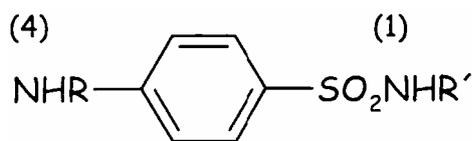
La primera sulfamida sintetizada fue la **sulfanilamida (SAN)**, la preparó Gelmo, en 1908, como parte de una investigación de colorantes azoicos y, durante muchos años, se utilizó sólo como producto intermedio en la industria de colorantes. Aunque se descubrió su actividad antibacteriana hacia 1930.

Las sulfamidas son rápidamente absorbidas, siendo la intensidad y rapidez de esta absorción similar en todas ellas (70-90% de la dosis administrada). Su liposolubilidad y la presencia de grupos metoxi en la estructura condiciona su permanencia en el organismo. Una vez absorbidas, difunden bien en los tejidos y fluidos orgánicos, alcanzando concentraciones terapéuticas en riñón, orina, hígado, bilis, pulmón, cerebro, saliva, sudor y leche, atravesando fácilmente las barreras placentaria y hematoencefálica. En el tracto gastrointestinal son rápidamente absorbidas, con la excepción de las denominadas sulfamidas intestinales. En plasma la ventana terapéutica está establecido entre 30 y 150 $\mu\text{g mL}^{-1}$, en orina [1] entre 500 y 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, variando la concentración efectiva en sangre entre 6 y 15mg/100mL [2].

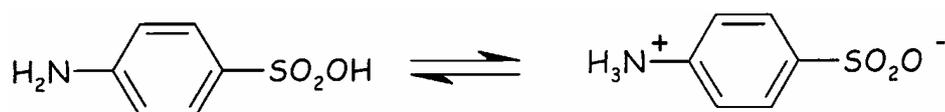
Este grupo de antibióticos constituye el primer tratamiento eficaz para infecciones bacterianas y provocan una revolución en quimioterapia, al introducir y comprobar el concepto de "antagonismo metabólico", de gran utilidad en química farmacéutica para explicar el mecanismo de acción de muchos fármacos y diseñar racionalmente nuevos agentes terapéuticos.

Se han sintetizado unos mil quinientos derivados, y compuestos relacionados con la SAN, con el objeto de obtener nuevas y más eficaces sulfamidas. Posteriormente, la modificación de éstos ha conducido a muchos fármacos con propiedades farmacológicas, tales como: antibacterianos (SAN), leprostáticos (sulfonas), diuréticos (sulfonamidas heterocíclicas, bencenodisulfonamidas, tiacidas, etc...)

La estructura general de las sulfamidas se recoge en la Figura II.1:



Son derivados del ácido sulfanílico, que existe en forma molecular y en forma ionizada:



Los átomos de nitrógeno sulfonamídico y anilínico se designan como N¹ y N⁴, respectivamente, y, en función de las sustituciones por nuevos radicales que se hagan en R, en R' o en ambos a la vez, se obtienen distintos derivados. Como principio general, para el mantenimiento de la acción antibacteriana la estructura fundamental de las sulfamidas no puede modificarse, pues al ser antagonistas competitivos del ácido para-aminobenzoico, su estructura debe mantenerse muy similar a la de este metabolito esencial. Así, debe contener: un anillo bencénico con sólo dos sustituyentes orientados en para, un grupo amino en la posición 4 (o un grupo azo, nitro o amino sustituido que en vivo pueda dar lugar al grupo 4 - amino), y un grupo sulfonamido monosustituido (excepto en las sulfonas y algunos derivados especiales).

Las sustituciones en el radical sulfónido (SO₂) no alteran la actividad bacteriostática, sino que modifican las propiedades farmacocinéticas, de tal manera que para mantener la actividad antibacteriana es esencial que el grupo amino en posición 4 quede libre

PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

La mayoría de las sulfamidas se presentan en forma de polvos cristalinos, blancos o amarillentos, de sabor amargo, poco solubles en agua, algo más en alcohol etílico, acetona y N-N'- dimetilformamida e insolubles en cloroformo y éter sulfúrico. Sus disoluciones son estables y pueden hervirse sin pérdida de actividad.

Son sustancias de naturaleza anfótera que le confieren los grupos amino y sulfonamido. El carácter de ácido débil de éste último hace que, en presencia de bases, formen sales algo más solubles en agua.

MECANISMO DE ACCIÓN

Las sulfamidas presentan una acción bacteriostática al actuar sobre bacterias en fase de crecimiento, como antimetabolitos por inhibición competitiva en la síntesis de ácido fólico. Al ser su estructura análoga a la del ácido p-aminobenzoico (PABA), inhiben competitivamente la incorporación de éste a la pteridina, para formar el ácido tetrahidropteroico, presentando una gran afinidad por la tetrahidropteroico-sintetasa. La consecuencia de esta alteración de la síntesis de ácido fólico es una disminución de nucleótidos, con inhibición del crecimiento bacteriano [3].

Son quimioterapéuticos de amplio espectro frente a cepas de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, e inhiben los enzimas responsables de la condensación del pirofosfato de la 2 - amino - 4 - oxo - 6 - hidroximetildihidropteridina, con el ácido p-aminobenzoico.

El antagonismo de su efecto antimicrobiano por el PABA, ya que compiten por las mismas enzimas responsables de la síntesis del ácido fólico [4], o bien la disminución de la sensibilidad de estas enzimas por la sulfamida [5], son los mecanismos a los que se debe la resistencia de los microorganismos a estos fármacos. Estos mecanismos condicionan resistencia cruzada entre todas las sulfamidas, pero no con el resto de antibióticos y quimioterápicos.

Para una sulfamida, el valor de la constante de disociación ácido-base [6] influye sobre su actividad quimioterapéutica, que será máxima en aquellas con valores de pK comprendidos entre 6.0 y 7.5. No obstante, esta hipótesis no es aplicable a todos estos fármacos, dado que muchos de ellos poseen una gran actividad encontrándose su pK fuera del citado intervalo. También la actividad se ha relacionado con su capacidad de combinación con las proteínas plasmáticas por fuerzas de tipo hidrófobo y de atracción iónica, aunque es la parte sin combinar la importante desde el punto de vista de actividad.

Por último, en cuanto a la distribución de cargas, Foemzler y Martin [2] observaron una relación cualitativa entre actividad y la carga formal π sobre N, de tal forma que, a medida que aumenta esta carga, aumenta la actividad.

SÍNTESIS Y CLASIFICACIÓN

La síntesis de sulfamidas puede llevarse a cabo por varios métodos de los que dos, por ser directos, son los más empleados. Por reacción de la acetanilida con ácido clorosulfónico, se obtiene cloruro de sulfonilo que, al reaccionar con la amina apropiada, da un intermedio que por hidrólisis ácida o alcalina, origina la sulfamida. La otra vía consiste en partir del cloruro de p-nitrobenzenosulfonilo que reducido por vía química o catalítica, origina la sulfamida deseada. Industrialmente, la síntesis se lleva a cabo por condensación del cloruro de sulfonilo, sustituido en posición para, con una amina heterocíclica, en piridina anhidra o mezclas de bases piridínicas que pueden captar el ácido clorhídrico que se libera en el proceso de condensación.

Para clasificar las sulfamidas pueden atenderse a criterios tales como espectro de actividad, duración de la acción, uso terapéutico y estructura química. Atendiendo a este último aspecto, existen numerosos derivados según que las sustituciones de un átomo de hidrógeno se hagan en el grupo amida R', en el grupo amino R o en ambos a la vez.

Cuando la clasificación se hace desde el punto de vista de su aplicación terapéutica, existen sulfamidas sistémicas, intestinales, urinarias, oftálmicas y de usos especiales. Por último, sus características farmacocinéticas permiten distinguir entre sulfamidas de eliminación rápida, media, lenta y ultralenta.

MEZCLAS DE SULFAMIDAS, TOXICIDAD Y EFECTOS SECUNDARIOS

Dada la insolubilidad de las sulfamidas en agua, su administración produce cristaluria. Se han comercializado diversas combinaciones con el objeto de reducir la incidencia de ésta. Las más corrientes son la trisulfapirimidina, combinación a partes iguales de sulfadiazina,

sulfamerazina y sulfametacina, o bien la combinación de sulfadiazina y sulfameracina, también a partes iguales. El fundamento de su empleo consiste en que cada compuesto, administrado a una tercera parte de la dosis total, se comporta independientemente desde el punto de vista de la solubilidad.

Algunas preparaciones farmacéuticas contienen un sulfafármaco en combinación con un inhibidor de la dihidrofolato reductasa, como son pirimetamina o trimetoprin. Esta combinación potencia el efecto bacteriostático de la sulfamida, ya que bloquea por dos puntos distintos las vías metabólicas de los microorganismos.

Las disoluciones de sales sódicas de las sulfamidas, con excepción de la sulfacetamida sódica, poseen un pH elevado, por lo que, cuando se inyectan, precipitan en sangre en forma de ácido libre, dañando los tejidos.

Su administración puede presentar ciertos fenómenos de intolerancia como son: alteraciones hematológicas, de la función hepática, renal, de las mucosas, metabólicas, neurológicas y trastornos digestivos. Como con otros muchos fármacos, en sujetos sensibilizados pueden aparecer fenómenos de hipersensibilidad de muy diversa índole, como son, fiebre, artralgias, sudoración, reacciones asmáticas, conjuntivitis, miocarditis, neumonitis y hepatitis, entre otras. En consecuencia, están contraindicadas en casos de hipersensibilidad conocida, así como durante el primer trimestre y dos últimas semanas del embarazo.

Dado que a lo largo de este capítulo son numerosas las sulfamidas que se van a citar, y a fin de no hacer esta Introducción excesivamente extensa, en la siguiente tabla se han reunido las diferentes sulfamidas y abreviaturas con las que se designaran cada una de ellas.

Tabla II.1.-Abreviaturas empleadas en la designación de sulfamidas

Sulfamida	Designación	Sulfamida	Designación
Sulfatiazol	ST	Sulfaguanidina	SGN
Sulfanilamida	SAN	Sulfacetamida	SAC
Sulfadiacina	SDZ	Sulfapiridina	SPY
Sulfameracina	SMRZ	Pirimetamina	PRM
Sulfametoxazol	SMTX	Sulfafurazol	SFZ
Sulgin	SLN	Sulfametacina	SMT
Sulfadimetoxina	SDMX		

ANÁLISIS DE SULFAMIDAS. FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE

La fluorescencia inducida fotoquímicamente ha sido empleada en el análisis de sulfamidas. Así, en 1975, Pawlaczyk y col [7] investigan la naturaleza de los productos formados tras la irradiación UV de **SAN** y **SAC**. Dichos autores observan que el grupo amino aromático es el responsable de la formación de productos coloreados, mientras que el amídico de la sulfamida da lugar a iones amonio. En 1982, Ahmad [8] caracteriza los fotoproductos de estas sulfamidas como la azobenceno -4,4'- disulfonamida y azoxybenzeno-4,4'-disulfonamida, fotoproductos mayoritarios y el ácido azobenceno-4-4'-disulfónico, como minoritario.

En 1992, las sulfamidas: **SMZ**, **SMRZ**, **SG**, **SAC**, **SAN**, **SPY** y **SDZ**, son estudiadas por Mahedero y col. [9]. Los resultados de dicho estudio muestran que las no heterocíclicas, **SAN**, **SAC** y **SG** son altamente fluorescentes y la señal de fluorescencia disminuye rápidamente cuando sus soluciones son sometidas a irradiación UV. Por su parte, las otras, todas ellas heterocíclicas, no son fluorescentes o lo son muy débilmente, originando la irradiación UV un gran aumento de sus señales de fluorescencia. Los autores proponen métodos para la determinación mediante RTPF de **SMZ**, **SMRZ**, **SPY** y **SDZ**. Así mismo, comprueban que los tiempos de irradiación dependen del disolvente empleado [10].

Estos autores determinan SAC, tanto en fármacos como en leche, usando como señal analítica la intensidad de fluorescencia obtenida tras irradiar las muestras durante 10 minutos [11]. Analizan así mismo, la presencia de SMRZ y SDZ en fármacos, haciendo uso de un método de primera derivada, a partir de los espectros de orden cero obtenidos por RTPF [12]. Con el mismo método determinan SPY [13] en leche. La SMTZ se determina en leche [11] y también mediante un sistema FIA [14], empleando detección fotoquímica-fluorimétrica.

Por último, ponen a punto métodos para determinar SDZ [15] en fármacos, usando RTPF como sistema de detección en FIA: SMXZ [16] en leche y fármacos y mezclas binarias de sulfamidas, aplicando calibración multivariante PLS [17].

2.-FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE

Aunque los fundamentos de la fluorescencia son conocidos desde antiguo, el primer espectrofluorímetro se fabrica en 1955, y con él comienza la aplicación de esta técnica al análisis químico. A partir de aquí, se produce un crecimiento espectacular de la misma.

El mayor interés de la técnicas fluorimétricas reside en su elevada selectividad y en la gran sensibilidad, que generalmente presentan, frente a otros métodos de espectroscopia molecular.

Dado que el número de sustancias fluorescentes es mucho menor que el de compuestos absorbentes, en términos generales, las determinaciones fluorimétricas son más selectivas que las basadas en la absorción de luz, puesto que la mayor parte de las moléculas excitadas por absorción se desactivan, a través de diferentes procesos no radiantes. En consecuencia, el número de sustancias que se desactivan con una emisión fluorescente es relativamente escaso. De otra parte, además de estos procesos de absorción y relajación, pueden tener lugar reacciones de ruptura molecular [18-20] cuando la excitación se realiza con una radiación muy intensa.

Las reacciones fotoquímicas y en concreto las fotolíticas, pueden dar lugar a varios procesos. Así, se pueden formar fotoproductos, que presenten fluorescencia, a partir de analitos inicialmente no fluorescentes, fotoproductos más o menos fluorescentes que los originales o bien puede tener lugar desaparición de la fluorescencia de los analitos originales. Se observará una pérdida de fluorescencia si el fotoproducto formado es menos fluorescente que el analito [21,22]. Sin embargo, en la mayoría de los casos, se observa un aumento [23-25]. La medida de esta señal conlleva un aumento de sensibilidad, lo que permite la detección de compuestos débilmente fluorescentes [26-28] o no fluorescentes [29].

La inducción fotoquímica de la señal fluorescente, en analitos débilmente o no fluorescentes, ha dado lugar a la aparición de la fluorescencia fotoquímica o fluorescencia inducida fotoquímicamente a temperatura ambiente, RTPF [30], empleada para el análisis de sustancias, tanto en disolución como retenidas en soporte sólido. Asimismo, se ha utilizado en combinación con cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) [25], cromatografía en capa fina [31-33] y análisis por inyección en flujo (FIA) [34]. En el caso de HPLC, la RTPF se ha empleado también como sistema de detección o en sistemas con derivatización postcolumna [25].

FUNDAMENTOS TEÓRICOS

Los aspectos teóricos de la RTPF, que tratan fundamentalmente de las leyes de la cinética fotoquímica involucrada y de la relación entre concentración inicial de analito e intensidad de fluorescencia del fotoproducto, han sido estudiados por pocos autores [20-22].

En disolución diluida, si la absorbancia es inferior a 10^{-2} , la velocidad de fotorreacción de un analito viene dada por la expresión:

$$v = -\frac{dC_A}{dt} = \frac{dC_B}{dt} = \sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot C_A \quad (I)$$

donde el sumatorio afecta aquellas longitudes de onda incidentes que producen fotorreacción, siendo las otras variables:

Φ_{λ_p} .- Rendimiento cuántico de la fotorreacción a cada λ .

I_{0,λ_p} .- Intensidad incidente a cada λ .

a_{λ_p} .- $2.303 \times \epsilon_A$. Dónde ϵ_A es la absortividad molar a cada λ .

b .- Camino óptico.

C_A .- Concentración del analito.

C_B .- Concentración del fotoproducto.

Si se admite que I_{0,λ_p} es constante y mucho mayor que C_A , la expresión (I) se puede transformar en la ecuación de primer orden (II):

$$(C_A)_t = (C_A)_0 10^{\left(-\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot t\right)} \quad (\text{II})$$

Al irradiar la solución de un analito se pueden observar dos efectos: una disminución de la señal de fluorescencia si éste era fluorescente y el fotoproducto formado no lo es; este caso es el menos frecuente y de menos aplicación. Por contra, puede generarse un aumento de la fluorescencia de un analito originalmente no fluorescente o que presentase una señal muy débil, éste es el caso de mayor aplicación en química analítica, puesto que permite la determinación de compuestos débilmente fluorescente o no fluorescentes mediante la formación de un fotoproducto fuertemente fluorescente; su fundamento teórico se expone a continuación.

En una reacción fotoquímica simple, como es la transformación de una sustancia A, en el fotoproducto, B, transcurrido un tiempo t , la concentración de éste, $(C_B)_t$, será:

$$(C_B)_t = (C_A)_0 - (C_A)_t \quad (\text{III})$$

y teniendo en cuenta la ecuación (II), se llega a la expresión:

$$(C_B)_t = (C_A)_0 \left[1 - 10^{\left(-\sum_{\lambda_p} \phi_{\lambda_p} \cdot I_{0,\lambda_p} \cdot a_{\lambda_p} \cdot b \cdot t \right)} \right] \quad (IV)$$

De otra parte, la intensidad de fluorescencia I_{FB} del fotoproducto será:

$$I_{FB} = f(\theta)g(\lambda') \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} \cdot I_{0,\lambda_{FB}} \cdot a_{\lambda_{FB}} \cdot b \cdot C_B \quad (V)$$

donde $f(\theta)$ es el factor geométrico y $g(\lambda')$ la respuesta del detector. Las variables restantes tienen el mismo significado que en la expresión (I) pero referidos al fotoproducto.

A intensidad de la radiación incidente constante, la intensidad de fluorescencia del fotoproducto sólo depende de C_B , su concentración, y las variaciones de I_{FB} , corresponden a las variaciones de la concentración C_B del fotoproducto. Si se define:

$$K = \sum_{\lambda_{FB}} \phi_{FB} \cdot I_{0,\lambda_{FB}} \cdot a_{\lambda_{FB}} \cdot b$$

$$\chi = f(\theta)g(\lambda') \cdot K$$

a señal de fluorescencia del fotoproducto será:

$$(I_{FB})_t = \chi(C_B)_t = \chi(C_A)_0 [1 - 10^{-kt}] \quad (VI)$$

Empleando el mismo tiempo para cada medida de fluorescencia, al representar la señal de fluorescencia del fotoproducto, I_{FB} , frente a la concentración de analito inicial $(C_A)_0$, obtendremos una línea recta. En consecuencia, si la fotorreacción de un analito no fluorescente o débilmente fluorescente, origina un fotoproducto fluorescente, la RTPF

permite su determinación, sobre todo cuando éste presenta un alto rendimiento cuántico de fluorescencia $\Phi_{\lambda_{FB}}$.

REACCIONES FOTOINDUCIDAS

El número de reacciones inducidas fotoquímicamente en las que pueden producirse variaciones de fluorescencia es amplio. No obstante, para que una de estas reacciones sea desde el punto de vista analítico interesante, debe reunir una serie de requisitos que raramente se cumplen simultáneamente, por lo que se tratará de encontrar las condiciones para obtener los resultados óptimos para cada analito. Estas irán en el sentido de que el analito presente una fuerte absorción en el UV-visible, para que tenga lugar la reacción fotoquímica. Numerosas reacciones secundarias se evitarán si la radiación absorbida por el analito es de una longitud de onda (λ) que no sea significativamente absorbida por el fotoproducto, que habrá de ser estable química y térmicamente, al menos el tiempo suficiente para realizar las medidas. El proceso de fotoconversión deberá tener un alto rendimiento y el rendimiento cuántico de fluorescencia del fotoproducto será tanto mayor que el del analito, cuanto mayor sea el aumento de rigidez estructural de aquel.

De otra parte, los componentes de la matriz pueden originar interferencias que se evitarán en la medida en la que se encuentren condiciones operatorias en las que estos componentes no originen productos fluorescentes o bajo la irradiación pierdan la posible fluorescencia nativa.

Entre las reacciones que pueden producirse por irradiación UV, las que más aplicación encuentran en los métodos de análisis basados en fluorescencia inducida son, *reacciones de fotociclación, fotoisomerización, fotolisis, fotorreducción y fototoxidación.*

Una gran parte de las primeras conducen a la formación, de fenantreno, antraceno o derivados [35-39], mientras que las *de fotoisomerización* [40] conducen a derivados de naftaleno.

Las *reacciones de fotolisis* son numerosas, encontrándose en complejos [41] y en varios tipos de pesticidas [42,43].

Mediante reacciones de *fotorreducción*, es posible la determinación de quinonas no fluorescentes como la vitamina K [23,44] o herbicidas derivados de dinitroanilinas no fluorescentes [29].

Por último, una reacción de *fotooxidación* es empleada para la determinación de varias fenotiazinas [45,46] y de compuestos donores de átomos de hidrógeno como alcoholes, aldehídos y éteres [47].

INSTRUMENTACIÓN

En un equipo para medida de fluorescencia fotoinducida, el componente diferenciador de un espectrofluorímetro clásico es el fotorreactor, siendo ésta la parte fundamental del sistema.

En la actualidad no existen comercializados instrumentos para PIF, como tales, por lo que diferentes fotorreactores han sido diseñados, con el paso de los años, por los propios investigadores.

Los primeros fotorreactores estaban constituidos por lámparas de mercurio de media o alta presión, refrigeradas por agua, o bien por lámparas de xenón o xenon-Hg refrigeradas por aire. En todos los casos el analito circulaba por el interior de un capilar de cuarzo arrollado sobre la lámpara que permitía, dada su buena transparencia a la radiación UV, la irradiación del analito. Uno de los primeros diseños de fotorreactor es el que se esquematiza en la Figura II.2.

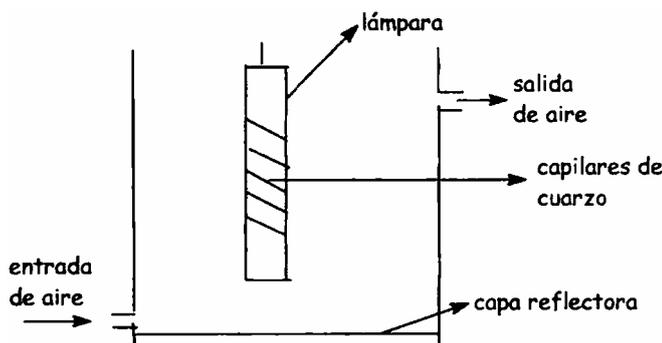


Figura II.2.- Esquema de uno de los primeros fotorreactores.

La fragilidad y dificultad de manejo del cuarzo llevó a Scholten, en 1980, a proponer el teflón (politetrafluoroetileno, PTFE) como material para los capilares. Su transparencia a la radiación UV es debida a múltiples procesos de reflexión que hacen que la radiación pase a través de los poros del polímero. Se encuentra comercializado en diferentes diámetros, su costo es bajo y los resultados encontrados en HPLC muestran que los picos son más simétricos y sufren menos ensanchamiento que los obtenidos con capilares de cuarzo, mientras que las señales de fluorescencia son similares.

Por todas estas razones, finalmente, el cuarzo fue sustituido por el teflón y en 1983, Lang diseña el primer fotorreactor con capilares de este material. Éstos están enrollados sobre un cilindro de cuarzo, en cuyo interior se encuentra la lámpara que se mantiene a 25 °, refrigerando con agua.

Uno de los inconvenientes del uso del teflón estriba en que se liberan cantidades significativas de F^- y H^+ cuando la temperatura se acerca a los 50 °C. La liberación de F^- es función del tiempo de residencia del analito en el capilar y puede dar lugar a un aumento de la señal de fondo y una variación de la fluorescencia del compuesto en estudio.

Para minimizar el efecto de la temperatura y simplificar su construcción, se propuso el uso de las lámparas de baja presión. Así, en 1982, para llevar a cabo una fotorreducción de alcoholes, aldehídos, éteres, aminas, etc... que conducen a productos de reducción altamente fluorescentes, se diseñó un fotorreactor, como el esquema que se muestra en la Figura II.3, en el que los capilares están tejidos sobre unas barras que se soportan en un cilindro de cuarzo, dentro del cual se encuentra la lámpara.

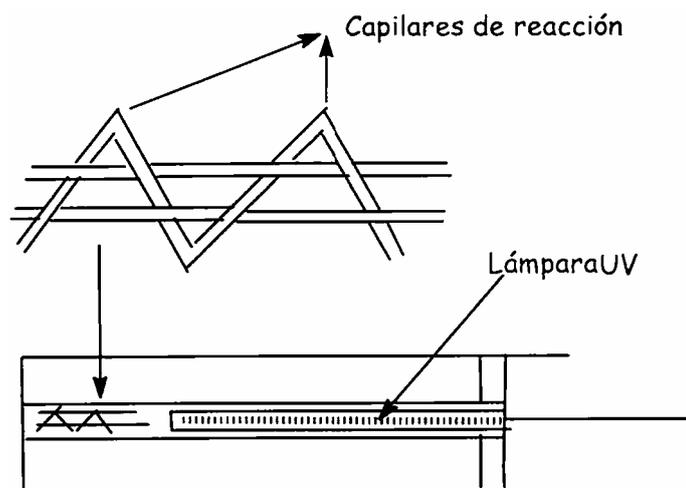


Figura II.3.- Esquema de un fotorreactor con lámparas de baja presión.

Son numerosos los casos en que las reacciones fotoquímicas son utilizadas como derivatizaciones post-columna en HPLC, consiguiéndose grandes aumentos de sensibilidad y selectividad. Un esquema general del montaje HPLC-PIF consta de tres elementos conectados en serie: columna, fotorreactor y fluorímetro, con un diseño como el de la Figura II.4.

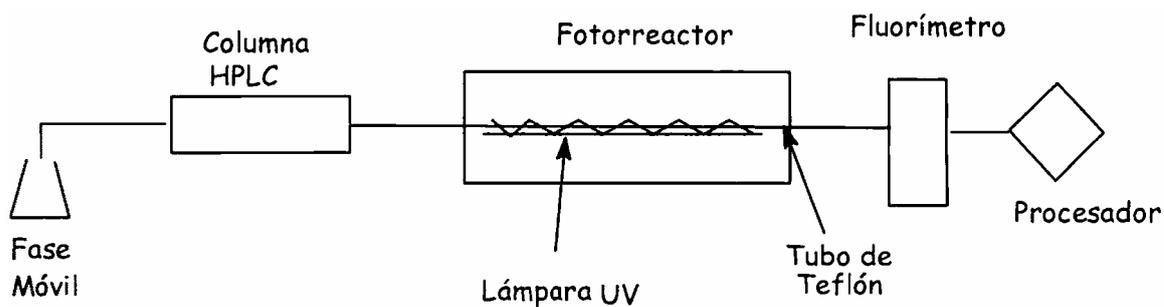


Figura II.4.- Esquema del acoplamiento HPLC-PIF.

A veces, los fotorreactores se introducen dentro de una camisa, que mediante paso de N_2 , evita la difusión de oxígeno a través de los poros del teflón, Figura II.5.

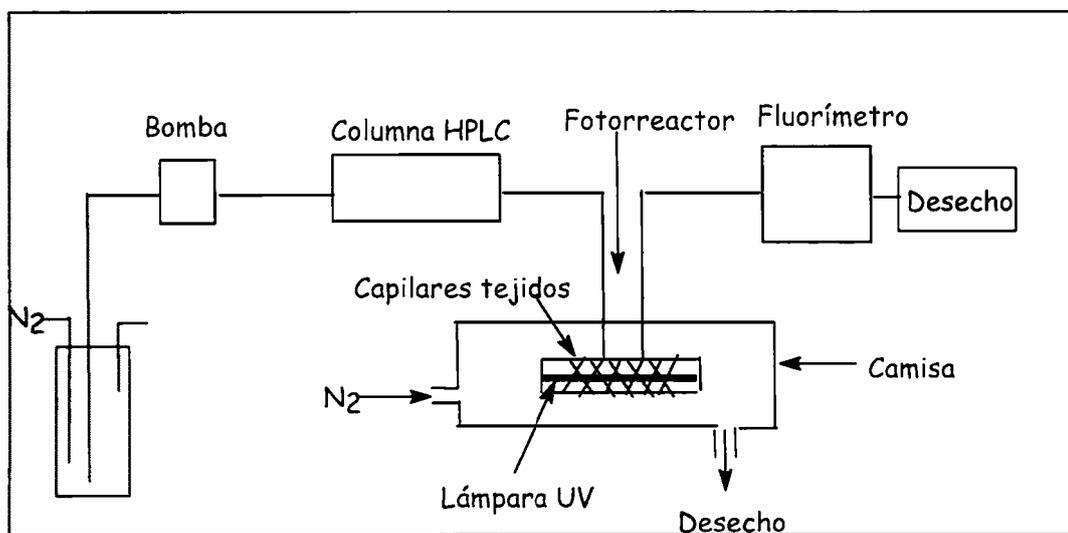


Figura II.5.- Esquema del diseño de un fotorreactor con paso de N_2

Por último, Arakawa [48], en 1983, propone el uso de un fotorreactor en el que se emplea una lámpara de Hg de baja presión y concéntrico a ella un cilindro de cuarzo. Sobre él va enrollado el capilar de teflón por el que circula la solución en estudio, tal y como se esquematiza en la Figura II.6.

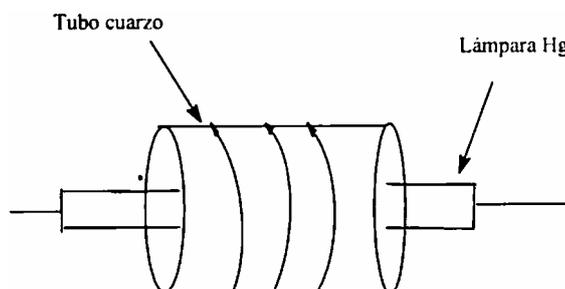


Figura II.6.- Esquema del diseño de un fotorreactor con lámpara de Hg de baja presión.

APLICACIONES DE LA FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE

La fluorescencia inducida fotoquímicamente ha sido aplicada a diferentes áreas que podríamos señalar como: generales, análisis farmacológico, clínico, de residuos de pesticidas o química ambiental.

Como aplicaciones generales, se pueden citar las dirigidas a la determinación de difenilamina [49], indoles [48] y de los iones Fe(III), Ni(II), Hg(II) y Co(II) por la formación de complejos con el n-butil-2-naftilmetilditiocarbamato [19].

Mediante HPLC con detección fluorescente, previa generación de fluorescencia por fotorreducción de naftoquinona, antraquinona y derivados nitrados de hidrocarburos aromáticos [50] es posible la determinación de compuestos alifáticos oxigenados como alcoholes, aldehídos y éteres [26].

Con relación a las aplicaciones dirigidas al análisis farmacológico, además de los métodos propuestos para la determinación de sulfamidas que ya se han descrito, se encuentran en bibliografía aplicaciones referidas a otros principios activos, tales como antimaláricos, analgésicos y fenotiazinas entre otros. En la siguiente tabla, se han reunido los métodos más recientes, así como los posibles acoplamientos con HPLC o FIA y sus aplicaciones.

Tabla II.2.- Aplicaciones de la RTPF al análisis de principios activos en fármacos.

<i>Principio activo</i>	<i>Observaciones /Aplicación</i>	<i>Ref.</i>
AAS, cloroquina y teofilina	Soporte sólido	51
TRF. 5-hidroTRF. 3-hidroxitiramina, quinina, triptamida, vitamina K. fenotiazinas, fenilbutazona, lorazepan	Diferentes medios y pHs	21 23 45 52, 53
Dietilesti Ibestrol, estrógeno, digoxina, hidrocortisona, tamoxifen, vitaminas, antihistamínicos, clobazam.	HPLC /muestras biológicas	52, 27, 28, 39, 44, 54, 55, 56
Clorpromacina, prometacina, perfenacina.	FIA, Stop Flow/ fármacos	57
Varias fenotiazinas.	FIA Complejos de inclusión	46, 58. 59.60
Isómeros catecolamina	HPLC/ orina	61
Ambroxol, AAS, 1,4-benzodiacepina, mianserina	HPLC/ muestras biológicas y plasma	62,63

AAS.- Ácido acetilsalicílico; TRF.- Triptofano

Otro de los campos de aplicación de esta técnica es el análisis de pesticidas. En éste también son varias las familias analizadas. En la siguiente tabla se han recogido los métodos más recientes, indicando en su caso la utilización de técnicas cromatográficas y la posible aplicación a muestras reales.

Tabla II.3.- Aplicación de RTPF al análisis de pesticidas.

Pesticida	Observación / Aplicación	Ref.
Der. clorados de fenol, fenilcarbamatos, Fenilamidas, Derivados de Fenilurea	HPLC	42,43
Dinitroanilinas	Fotorreducción quinónica	29
Diurón. linurón, neburón e isoproturón.	En solución: inclusión en β -CDs.	64-66
Benzoilurea	RTPF. aguas de ríos	67
Fenilureas	β -CD y HP- β -CD. Agua de río	68
Fenilureas	HPLC	69
Sulfonilureas	Primera derivada; MM; FIA/ Agua de río	70-73
Clorofenoxiácidos, ácido 2,4-diclorofenoxiacético y mecoprop	M.M; FIA / Agua	74,75

β -CDs,- β -ciclodextrinas-, MM.- Medio micelar

Recientemente , Aaron y col. [76] han publicado un review en el que recogen los métodos luminiscentes, entre ellos RTPF, aplicados al análisis de pesticidas y su aplicación a muestras ambientales.

ANÁLISIS DE SULFATIAZOL Y SULFANILAMIDA

Los métodos fluorimétricos propuestos para la determinación de ST son escasos. En 1983, Thomas y Col [77] lo analizan en una mezcla con otras cuatro sulfamidas en alimentos, mediante cromatografía en capa fina. La placa se desarrolla con fluorescamina en solución

acetónica, llevándose a cabo la detección con fluorescencia. La misma técnica es aplicada a la determinación del antibiótico en miel [78].

La cromatografía líquida de alta resolución, HPLC, ha sido empleada para la determinación de esta sulfamida con detección fluorimétrica. Así, el análisis en hígado congelado se realiza mediante HPLC con detección fluorimétrica a 500 nm, empleando fosfato como fase móvil [79]. Previo tratamiento con fluorescamina, es viable la determinación en miel [80].

La mezcla ST-SMTZ, en piensos para cerdos, se resuelve con derivatización postcolumna y detección a 450 nm [81]. Los porcentajes de recuperación están comprendidos entre el 97 y 100%.

El análisis de SAN, empleando técnicas fluorescentes, al igual que el de ST, se lleva a cabo mediante HPLC. En 1996, Vinas y col. [82] la determinan, en alimentos en presencia de otras cuatro sulfamidas, derivatizando con OPA-ME. La detección se realiza a 302 nm con recuperaciones del 95%. En tejido de salmón, la derivatización se lleva a cabo con fluorescamina [83].

Mediante análisis por inyección secuencial, SIA, y detección quimioluminiscente, Praekova y col. [84] desarrollan un método para SAN y ST, entre otras sulfamidas, previa oxidación con permanganato potásico en medio sulfúrico.

Mezclas de sulfamidas, en las que se encuentren las dos en estudio, se han resuelto empleando, fundamentalmente, métodos cromatográficos, con detección UV.

Schwaiger y col. [85] resuelven mezclas de sulfamidas en miel, entre ellas SAN y ST con detección fluorescente. Se hace uso de la reacción con fluorescamina para la derivatización, y en el caso de ST, dado que el producto que con éste origina la glucosa de la miel no es fácilmente extraíble, previamente se somete la muestra a una hidrólisis ácida para determinar el ST total.

3.-ESPECTROSCOPIA DE DERIVADAS

Dada una señal analítica, $S = f(\lambda)$, la representación gráfica de $dS/d\lambda$ en un determinado intervalo de longitud de onda recibe el nombre de "espectro derivado". Por tanto, el espectro derivado de primer orden es la representación gráfica de la pendiente del espectro de orden cero, a cada longitud de onda del intervalo medido. Es posible la representación de derivadas de orden superior, en general $d^n S/d\lambda^n$ que darán lugar a los correspondientes espectros de orden "n".

La señal analítica, S, puede ser una señal, como hemos dicho, función de λ , pero la técnica de derivadas también es aplicable a señales analíticas a una λ dada.

Cuando S mantiene una relación lineal con la concentración de analito, C, a una λ dada

$$S = K \cdot C$$

en el espectro derivado

$$\frac{dS}{d\lambda} = \frac{dK}{d\lambda} \cdot C$$

donde $\frac{dK}{d\lambda}$ es una constante para cada longitud de onda.

Si S es la intensidad de emisión de fluorescencia I_f , función de la longitud de onda, que a un valor dado guarda una relación lineal con la concentración de analito

$$I_f = K \cdot C$$

el espectro derivado sería

$${}^1D_{I_f} = \frac{dI_f}{d\lambda} = K \cdot C$$

donde K' tiene un valor para cada longitud de onda y, en consecuencia

$$\left[{}^1D_{I_f} \right]_{\lambda} = K'_{\lambda} \cdot C$$

la amplitud de la señal derivada, en este caso primera, a una longitud de onda dada, es proporcional a la concentración de analito.

La técnica fue introducida en los años 50 por Hammond y col [86], Movish [87] y Giese y French [88]. Numerosos autores se centraron en los aspectos teóricos [89] y de instrumentación [90], hasta final de la década de los sesenta.

Aunque la aplicación más frecuente es a la absorción molecular y a nivel cualitativo, ya en 1959, McWilliam [91] profundiza en la instrumentación, aplicando la técnica a espectroscopia IR y las primeras aplicaciones cuantitativas en espectrofotometría UV-Visible aparecen al comienzo de los años setenta [92,93], en los que también se aplica a espectroscopia atómica [94].

La primera aplicación a técnicas fluorescentes la llevan a cabo Green y O'Haver en 1974 [95]. Estos autores comparan los resultados obtenidos mediante diferenciación electrónica y por modulación de la longitud de onda, observando que ambas técnicas dan igual relación señal/ruido, mejorando la resolución espectral. La determinación de pireno en un gran exceso de antraceno realizada por dichos autores, fue la primera aplicación cuantitativa, haciendo uso de una señal fluorescente.

En cuanto a los espectros derivados de fluorescencia, al igual que en fotometría presentan una mayor resolución de la estructura fina del espectro, permite el análisis de muestras que presentan una cierta emisión de fondo debida a la matriz y, evidentemente, permiten la medida exacta de la longitud de onda del máximo. Esta última aplicación es menos utilizada en fluorescencia, en tanto que los espectros obtenidos presentan bandas más

estrechas que en absorción molecular.

La aplicación más frecuente de esta técnica en luminiscencia es la resolución de mezclas de varios componentes, o la determinación de un analito en presencia de otro que emite a λ muy próximas. En este sentido, la técnica de derivadas ha sido empleada tanto en fluorescencia clásica como en fluorescencia sincrónica de ángulo constante y fluorescencia fotoinducida.

Actualmente, la resolución de mezclas de un número elevado de componentes se realiza fundamentalmente mediante métodos cromatográficos, con el sistema de detección más adecuado a cada caso. De otra parte, cuando el número de componentes no es muy elevado, tres, cuatro, los métodos de calibración multivariante son más potentes que los de derivadas, aunque requieren un software específico, mientras que la mayoría de los espectrofotómetros o espectrofluorímetros comercializados ya disponen de los programas necesarios para la adquisición de espectros derivados de diferentes órdenes.

De otra parte, para la adecuada resolución de una mezcla mediante técnicas derivadas, las longitudes de onda de máxima señal de los componentes han de tener una mínima separación.

No obstante, teniendo en cuenta todos estos aspectos, una revisión bibliográfica de las publicaciones a lo largo del presente año, pone de manifiesto que la técnica de derivada, como desde sus inicios, es más empleada en absorción molecular, diez publicaciones, que en fluorescencia sincrónica, siete publicaciones.

Esta técnica, al ser aplicada a fluorescencia sincrónica, aumenta su capacidad de resolución de mezclas, ya que de por sí la capacidad es más elevada que la de la fluorescencia clásica en cuanto los espectros sincrónicos son más estrechos, con lo que la combinación de, derivadas - fluorescencia sincrónica es una herramienta útil y económicamente muy asequible para la resolución de mezclas, fundamentalmente binarias, en muestras tales como fluidos biológicos.

Así, se han propuesto métodos para la resolución de mezclas de antibióticos de la

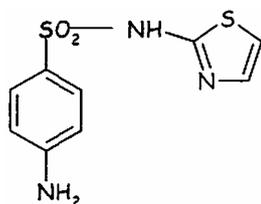
familia de las quinolonas en suero [96], de diuréticos en orina [97], o vitaminas B2 y B6 en bebidas [98].

Otras de las aplicaciones están dirigidas a la determinación de analitos en muestras de matriz compleja; los antibióticos quinolónicos ofloxacino [99], ciprofloxacino [100] o 1-hidroxipireno [101] en orina.

A su vez, la fluorescencia clásica se acopla con derivada para determinar glutahona en suero humano, hígado y corazón de cerdo [102], o el antiespasmódico mebeverina en fármacos [103].

4.- ESTUDIO DE SULFATIAZOL MEDIANTE FLUORESCENCIA INDUCIDA FOTOQUÍMICAMENTE (RTPF)

El sulfatiazol (4-Amino-N-(2-tiazolil) bencenosulfonamida) es una sulfamida que presenta la siguiente estructura:



SULFATIAZOL (ST)

ELECCIÓN DEL DISOLVENTE

A fin de elegir el disolvente más adecuado para llevar a cabo el estudio de la influencia del medio sobre la señal de fluorescencia fotoinducida, se ensayaron disolventes como: etanol, metanol, 2-propanol, acetona, dimetilformamida y acetonitrilo. En cada uno de los disolventes, se preparó una disolución de $5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de la sulfamida en estudio. Una alícuota de esta disolución fue irradiada varios minutos a fin de originar la formación del fotoproducto. A continuación, se registraron los espectros de excitación y emisión para determinar las longitudes de onda de máxima excitación y emisión, del analito en los disolventes estudiados.

Fijadas las longitudes de onda, se realizó el estudio del tiempo de irradiación en cada uno de los medios. Para ello, una alícuota de la disolución madre fue irradiada durante tiempos sucesivos de 0 a 10 minutos, comprobando tras cada medida que las longitudes de onda prefijadas no variaban. Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la señal de fluorescencia aumenta a medida que lo hace el tiempo de irradiación, siendo máxima en todos los casos estudiados aproximadamente a los 5 minutos, después, una vez alcanzado el valor máximo, la señal disminuye lentamente. Dado el comportamiento del sulfatiazol en los diferentes disolventes, se decide elegir como disolvente el etanol, por ser el que mayor señal de fluorescencia proporciona.

ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

Para registrar los espectros de excitación y emisión se preparó una disolución etanólica de ST conteniendo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, a la que se le registró el espectro de absorción que se muestra en la Figura II.6, en el que se observa la presencia de dos máximos de absorción centrados a 260 y 290 nm.

Excitando a estas longitudes de onda, se registraron los espectros de emisión, observando que las soluciones etanólicas de ST no presentan fluorescencia nativa.

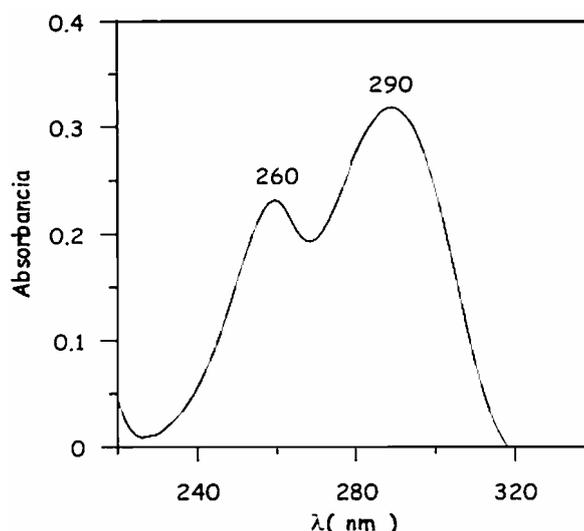


Figura II.6.- Espectro de absorción de una disolución etanólica de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST

Según los estudios preliminares, se comprobó que la irradiación inducía una señal de fluorescencia del analito en dicho disolvente, por lo que la disolución etanólica se irradió durante un periodo de 4 min.

En la Figura II.7, se han representado los espectros de excitación y emisión de muestras sin irradiar e irradiadas 4 min. En ellos se observa que la irradiación de las soluciones etanólicas de ST induce en ellas una fluorescencia con máximos de excitación y emisión a 255 y 338 nm, respectivamente.

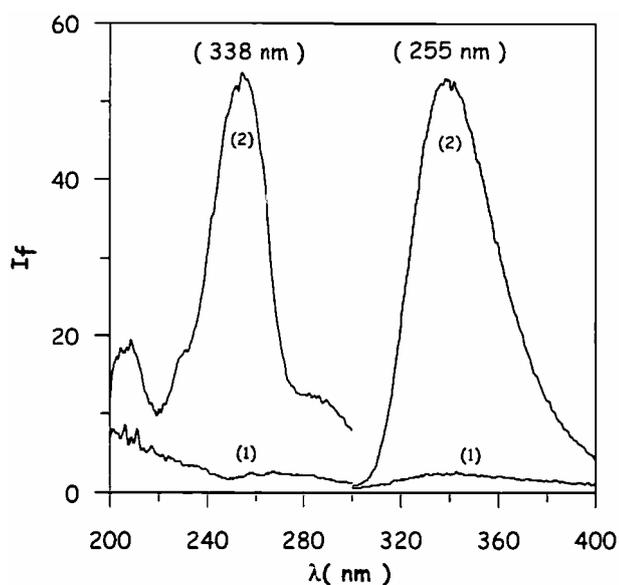


Figura II.7.- Espectros de emisión y de excitación de una disolución etanólica de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST sin irradiar (1) y tras irradiar 4 minutos (2).

INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE AGUA EN EL MEDIO Y DEL TIEMPO DE IRRADIACIÓN

Para comprobar de que forma afecta a la señal fluorescente inducida la presencia de agua en el medio, se prepararon tres disoluciones empleando como disolventes, etanol, agua y la mezcla hidroetanólica 90:10 (agua : etanol) respectivamente y conteniendo todas ellas $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST. Las soluciones fueron irradiadas durante 4, 6 y 8 min. y, a continuación, se registraron sus espectros de excitación y emisión.

En la Tabla II.4 se han recogido, para los tiempos de irradiación (t_{irr}) ensayados, las longitudes de excitación y emisión, así como las intensidades de fluorescencia a estas longitudes de onda para cada una de las soluciones. Los resultados obtenidos permiten concluir, que la presencia de agua en el medio no produce variaciones espectrales significativas, así como que, en todos los casos, irradiaciones de 4 a 6 min. originan un aumento de la intensidad de fluorescencia que disminuye para 8 min.

Tabla II.4.- Efecto de la presencia de agua en el medio

		Tiempo de Irradiación (min)		
		4	6	8
<i>Agua:EtOH</i> (v/v)	$\lambda_{ex}/\lambda_{em}$	<i>Intensidad de Fluorescencia</i>		
0: 100	255/338	44.44	40.16	37.35
90: 10	251/342	70.98	72.10	60.76
100:0	252/343	50.33	54.40	50.78

Se realizó un estudio detallado de la influencia del tiempo de irradiación para diferentes contenidos de agua, preparando cuatro disoluciones etanólicas con porcentajes de agua de 50, 70, 80 y 95 %. A cada una de estas disoluciones se les registraron los espectros de emisión, excitando a 251 nm, sin irradiar y una vez irradiadas tiempos sucesivos hasta un total de 8 min.

Los espectros recogidos en la Figura II.8 confirman que el tiempo de irradiación no produce cambios espectrales, manteniéndose las longitudes de onda de excitación y emisión a 251 y 342 nm, respectivamente. La intensidad de fluorescencia, por su parte, aumenta a medida que lo hace t_{irr} , siendo máxima y prácticamente constante para periodos de irradiación comprendidos entre 4 y 5.5 min. y disminuyendo para valores superiores de éstos.

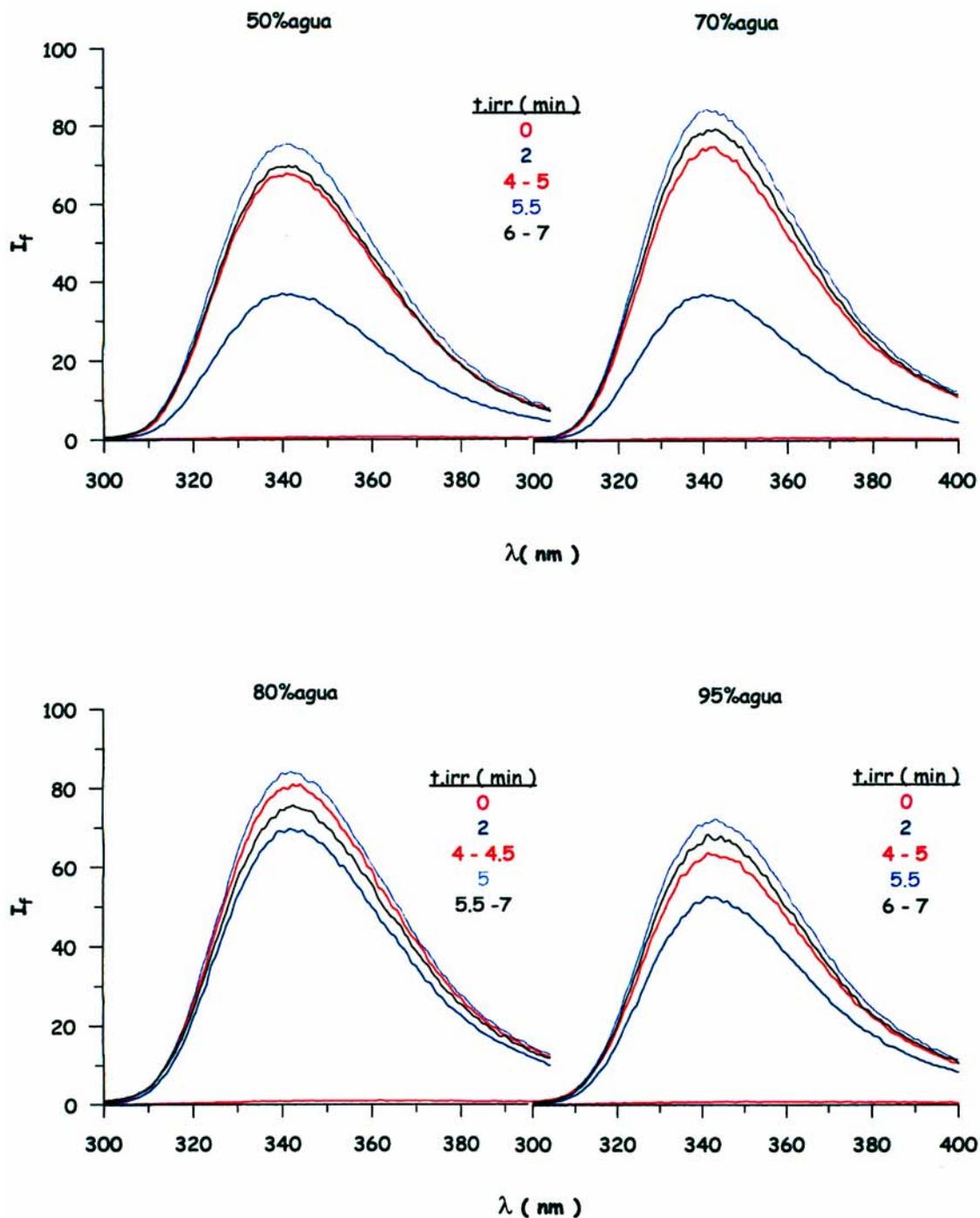


Figura II.8.-Influencia del contenido de agua en el medio ($\lambda_{ex} = 251$ nm)

Representado gráficamente la señal de fluorescencia frente al tiempo de irradiación en cada uno de los medios estudiados. Figura II.9, se observa que son necesarios tiempos de irradiación superiores a 4 min. para obtener máximas intensidades, por lo que las experiencias posteriores se realizarán tras irradiar las muestras 5 min.

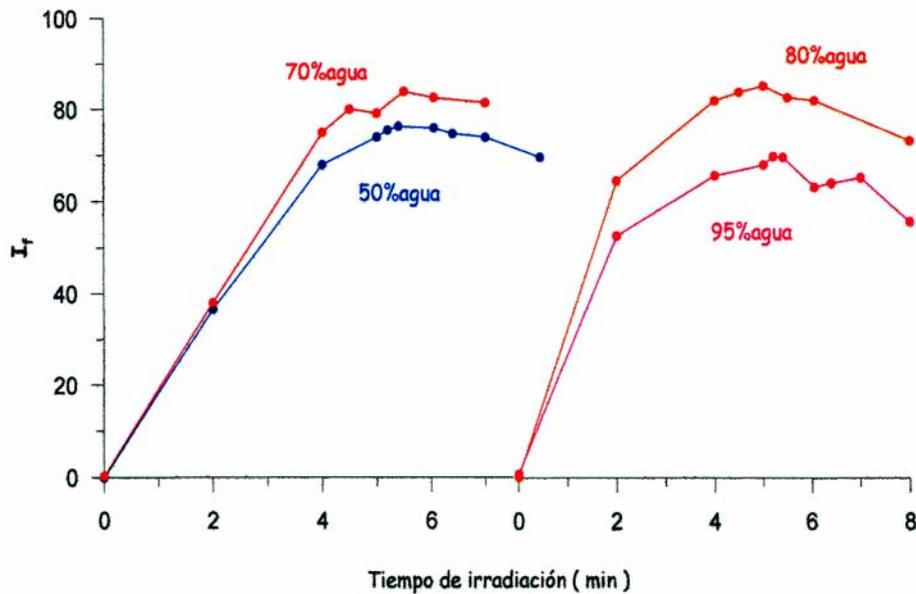


Figura II.9.- Influencia del tiempo de irradiación sobre la intensidad de fluorescencia en distintas mezclas hidroetanólicas ($\lambda_{\text{ex}} = 251 \text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 342 \text{ nm}$)

La representación gráfica de la señal de fluorescencia en función del contenido de agua, para un tiempo de irradiación de 5 min., Figura II.10, pone de manifiesto que la máxima señal de fluorescencia se obtiene empleando como medio etanol:agua 20:80 (v:v).

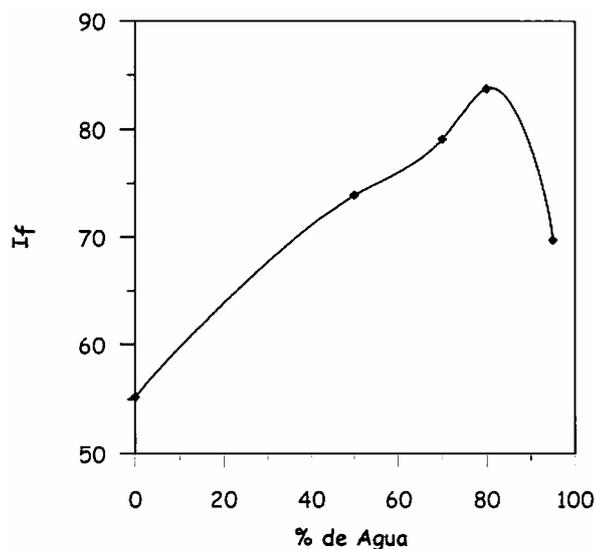


Figura II.10.- Influencia del contenido de agua sobre la intensidad de fluorescencia
Tiempo de irradiación : 5 minutos

En estas condiciones, los espectros de excitación y emisión de una disolución conteniendo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, en un medio etanol:agua (20 : 80) sin irradiar (1) y tras irradiar 5 minutos (2), se representan en la Figura II. 11.

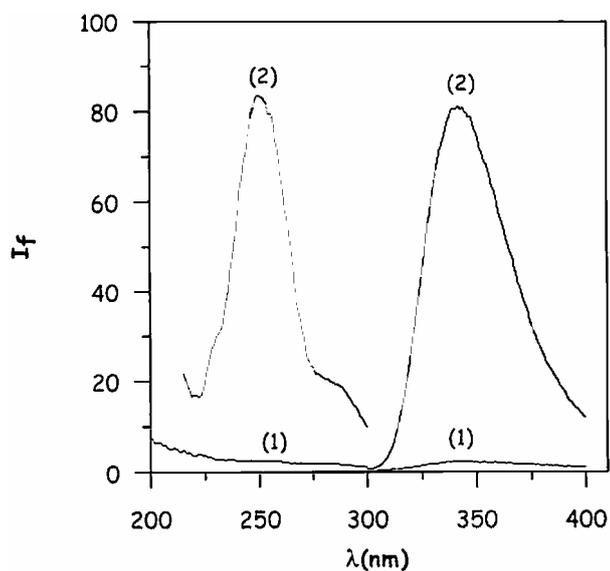


Figura II. 11 .-Espectros de excitación y emisión de una disolución de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ST en medio etanol:agua (20:80)

INFLUENCIA DEL pH

Para estudiar la influencia del pH sobre la señal de fluorescencia, se prepararon muestras conteniendo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, el volumen de etanol necesario para que su contenido final fuese del 20%, 2 mL de disolución reguladora de diferentes pH y se enrasaron a 25 mL con agua ultrapura.

Para comprobar si las longitudes de onda de excitación y emisión variaban con el pH, inicialmente las muestras fueron irradiadas un tiempo suficiente para la formación del fotoproducto y se registraron los correspondientes espectros para encontrar dichas longitudes de onda. Los resultados obtenidos mostraron que en medios muy básicos, la longitud de onda de excitación sufre un ligero desplazamiento hipsocrómico para fijarse a 235 nm, permaneciendo fija la de emisión. Para el resto de pHs estudiados las longitudes de onda se mantienen constantes a 251 y 342 nm.

A continuación, a cada muestra le fue realizado un estudio de la influencia del tiempo de irradiación, empleando en cada pH, las longitudes de onda de excitación y emisión óptimas. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura II.12.

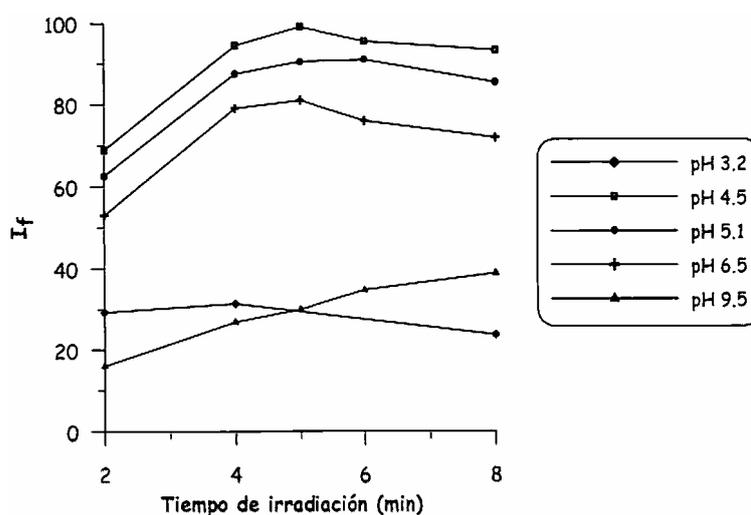


Figura II.12.- Influencia del pH sobre la intensidad de fluorescencia a distintos tiempos de irradiación.

En primer lugar, se observa que en medios muy ácidos o básicos la formación del fotoproducto es muy débil, siendo superior a pH comprendidos entre 4.5 y 5.5. De otra parte, en todos los casos se confirma que el tiempo óptimo de irradiación está comprendido entre 4 y 6 min.

Al representar gráficamente la emisión de fluorescencia frente al pH, para disoluciones de ST conteniendo $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y previamente irradiadas 5 min., Figura II.13, se observa que dicha emisión es máxima para valores de pH comprendidos entre 4.5 y 5.5. Para experiencias posteriores se eligió como pH de trabajo 4.75, fijado por adición de tampón acético/acetato.

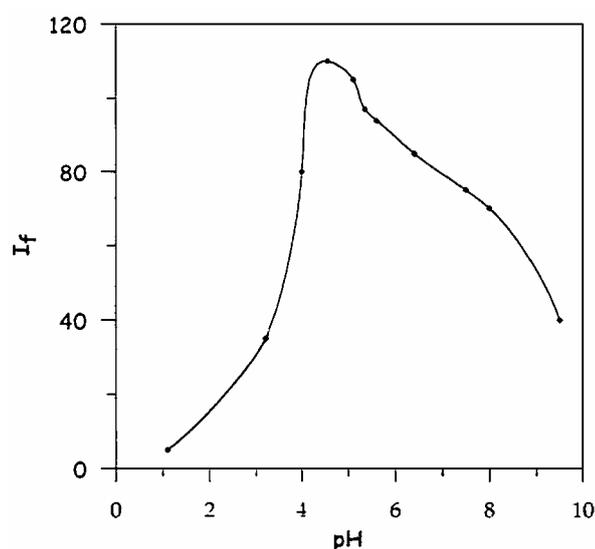


Figura II.13.- Influencia del pH en la intensidad de fluorescencia de disoluciones de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST irradiando 5 minutos.

INFLUENCIA DÉ LA CONCENTRACIÓN DE TAMPÓN

Fijado el pH de trabajo se procedió a estudiar la influencia de la concentración de tampón en la señal de fluorescencia. Para ello se llevó a cabo la siguiente experiencia : en matraces de 25 mL, se prepararon muestras de $5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ST pipeteando 1.25 mL de la disolución etanólica, 3.75 mL de etanol, volúmenes de disolución reguladora de ácido acético/acetato sódico 0.5 M de pH 4.75 comprendidos entre 1 y 7 mL y se enrasaron con agua ultrapura. Se irradiaron las muestras 5 min, y se midió la señal de fluorescencia a 342 nm.

Los resultados obtenidos, Figura II.14, ponen de manifiesto que la concentración de tampón no afecta a la señal de fluorescencia, por lo que en experiencias sucesivas se utilizarán 3 mL de disolución tampón.

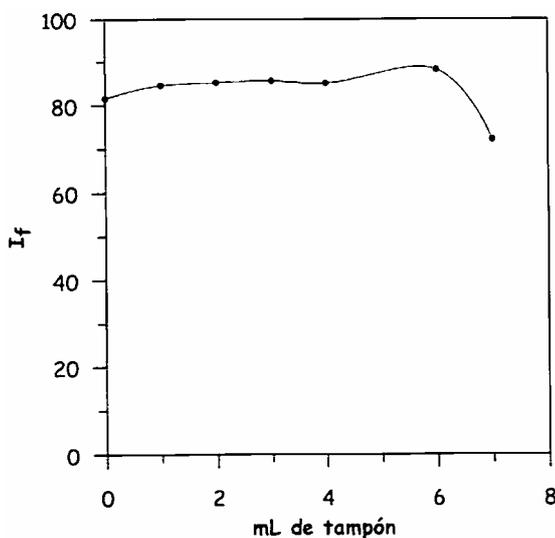


Figura II.14.- *Influencia de la concentración del tampón en la señal de fluorescencia.*

ESTABILIDAD DEL FOTOPRODUCTO

A fin de estudiar la estabilidad de la señal de fluorescencia del fotoproducto en función del tiempo, se planteó una experiencia en la que, una vez preparada la disolución de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, una alícuota de ésta fue depositada en la cubeta de cuarzo, la cual fue irradiada el tiempo óptimo de la sulfamida. A continuación, se registró el espectro de emisión a intervalos de tiempo creciente hasta un total de una hora, excitando a 251 nm.

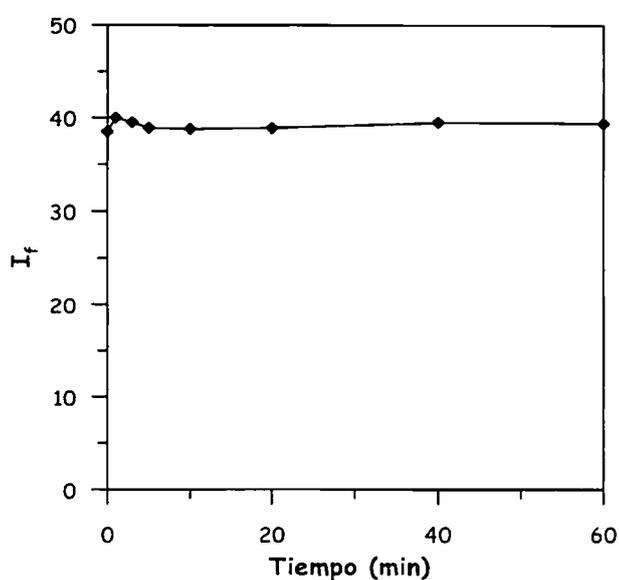


Figura II.15.- Estabilidad del fotoproducto formado al irradiar 5 minutos la disolución de $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, en medio etanol:agua (20:80)

En la Figura II.15 se muestra la evolución que experimenta la señal de fluorescencia del fotoproducto originado, en función del tiempo. Se puede observar que se produce un ligerísimo aumento de la señal de fluorescencia en los primeros minutos, para luego permanecer estable. En experiencias posteriores y para obtener una reproducibilidad adecuada se realizaron las medidas una vez transcurrido 1 minuto desde la irradiación.

Este aumento de la señal en los primeros minutos, puede atribuirse a que cuando la disolución es irradiada se produce un aumento de la temperatura, con lo cual, cuando se introduce la cubeta en el espectrofluorímetro, termostataado a 20 °C, se necesita un determinado tiempo para que las disoluciones alcancen una temperatura estable, de ahí que observemos esas alteraciones en la señal.

Asimismo, se realizó una experiencia encaminada a comprobar si la formación del fotoproducto transcurre de la misma forma, cuando la muestra es irradiada su tiempo óptimo de irradiación de forma continua o discontinua. En este sentido, se preparó una disolución de 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ST en las condiciones optimizadas, que fue irradiada durante 5 minutos. Se registró su espectro de emisión y se observó que la señal de fluorescencia obtenida era similar a la encontrada cuando la experiencia se llevaba a cabo irradiando la disolución cada 1 minuto hasta completar el tiempo óptimo de irradiación.

ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES

Los estudios realizados hasta este punto ponen de manifiesto la sensibilidad de la disolución de sulfamida a la luz, por lo que se realizaron una serie de experiencias de cara a discernir si la disolución madre de sulfatiazol era adecuadamente estable o ha de ser preparada diariamente. En los estudios realizados se emplearon disoluciones acuosas y mezclas hidroetanólicas de dicha sulfamida.

En todos los casos se procedió empleando una disolución madre de 100 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en agua. Por dilución exacta se prepararon muestras de 25 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en agua y, a partir de esta última, otra solución de 5 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ en medio hidroetanólico. Se realizó el estudio de la influencia del tiempo de irradiación, tanto de la disolución madre como de la intermedia y la de trabajo, recién preparadas, así como transcurridos varios días desde su preparación. Los resultados mostraron que las disoluciones son estables al menos dos semanas. Por ello, para experiencias posteriores se trabajará con disoluciones preparadas semanalmente, protegidas en frascos color topacio y guardadas en el frigorífico.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE SULFATIAZOL

Para estudiar de que forma influye la concentración de ST sobre la señal de fluorescencia, se prepararon muestras de concentraciones crecientes del analito en matraces aforados de 25 mL, a las que se añadió el volumen de etanol necesario para que su contenido final fuese del 20%, 3 mL de disolución reguladora de pH 4.75 y agua ultrapura hasta enrase.

Las muestras se irradiaron durante 5 min, tras los cuales se midieron las intensidades de fluorescencia a 342 nm, empleando como longitud de onda de excitación 251 nm. Los resultados obtenidos se representan en la Figura II.16, en la que se puede observar que la señal de fluorescencia aumenta de forma lineal a medida que lo hace la concentración de ST, hasta que ésta alcanza un valor de 3.0 ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). Para concentraciones superiores las señales de fluorescencia se apartan de la linealidad.

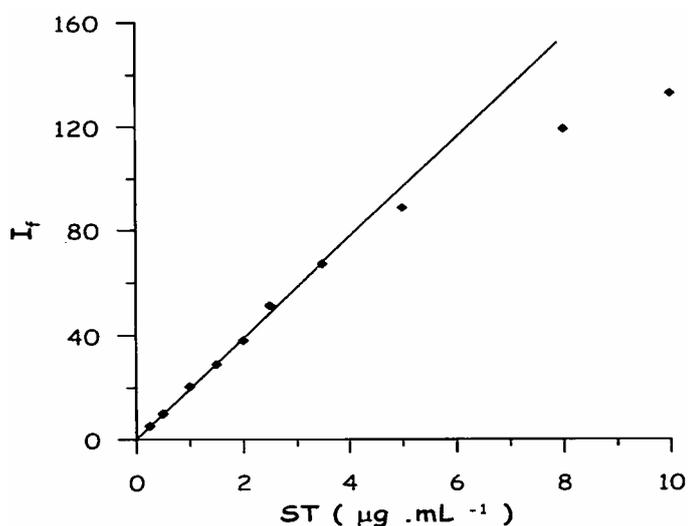


Figura II.16.-*Variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de ST*

RECTA DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD

Fijadas las condiciones de trabajo, así como el rango de linealidad, se procedió a establecer la correspondiente recta de calibrado. En matraces aforados de 25 mL se prepararon patrones, por triplicado, en el rango de concentraciones comprendido entre de 0 y 3.0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, añadiendo los volúmenes necesarios de etanol para que su contenido final sea del 20%, 3 mL de disolución reguladora acético/acetato sódico de pH 4.75 y agua hasta enrase. Excitando a 251 nm, tras una irradiación de 5 min., se obtienen los espectros de emisión que se recogen en la Figura II.17.

Las medidas de intensidad de fluorescencia se realizan a una longitud de onda de emisión de 342 nm.

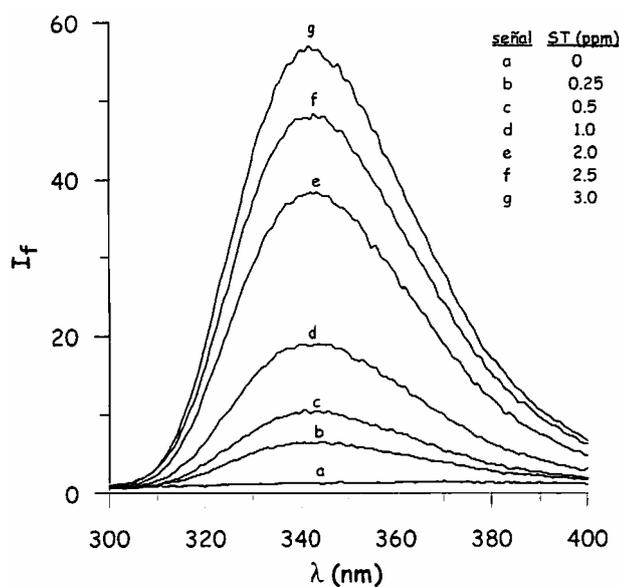


Figura II.17.- Recta de calibrado del ST empleando fluorescencia fotoinducida, irradiando las muestras 5 minutos.

Los resultados obtenidos tratados con el programa ACOC, Tabla II.5 , muestran una adecuada linealidad entre 0.22 y 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST.

Tabla II.5.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	18.27
Ordenada en el origen (a)	1.57
Desviación típica de la pendiente (S_b)	0.12
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.21
Desviación típica estimada (error estándar)	0.607
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999
Linealidad (1 - DER (b)) %	99
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.033
Desviación estándar del blanco	0.022
Límite de determinación (IUPAC)	0.224
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.055
LOD (Clayton)($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.076
Repetitividad (1.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) %	3.84

5.-DETERMINACIÓN DE ST MEDIANTE DERIVADA DEL ESPECTRO DE EMISIÓN DE FLUORESCENCIA FOTOINDUCIDA

Una vez puesto a punto el método de determinación de ST mediante RTPF, se procedió a optimizar las condiciones instrumentales para la obtención de los espectros derivados de primer orden, con el objetivo de determinar dicha sulfamida en alimentos, los cuales suelen presentar apreciables señales de fondo.

INFLUENCIA DEL FILTRADO Y DE $\Delta\lambda$

Un inconveniente de la técnica de derivada es la disminución que sufre la relación señal/ruido cuando aumenta el orden de la derivada. Para minimizar este ruido de fondo se filtran los espectros de orden cero, empleando el método de Savitzky-Golay.

Para seleccionar el filtrado se preparó una muestra conteniendo $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de analito, un 20% de etanol, 3 mL disolución reguladora de pH 4.75 y agua ultrapura hasta 25 mL. Se irradió durante 5 minutos, se registró el espectro de emisión de fluorescencia y se filtró a través de diferentes números de puntos experimentales.

En la Figura II. 18 se muestran los espectros de emisión obtenidos una vez filtrados a través de 10, 12, 14 puntos experimentales, observándose como a medida que aumenta el número de puntos experimentales utilizados para la filtración, el ruido disminuye, no variando las señales analíticas de forma significativa. En lo sucesivo se filtrarán los espectros a través de 10 puntos experimentales.

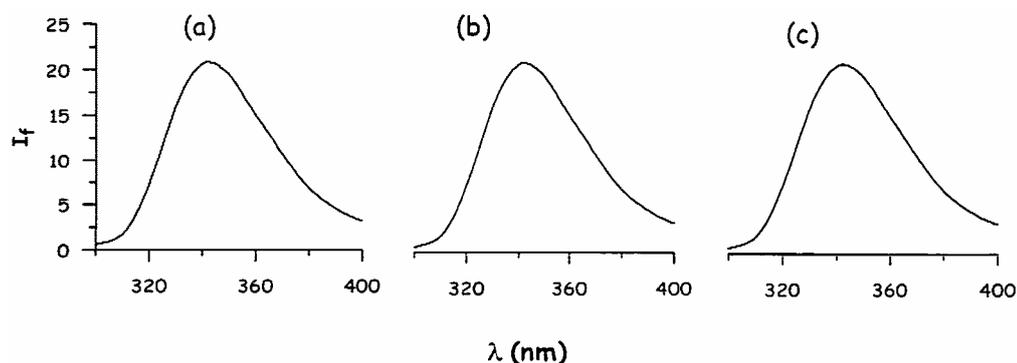


Figura II.18.- Espectros de ST filtrados a través de: (a) 10, (b) 12 y (c) 14 puntos experimentales.

Para optimizar $\Delta\lambda$ se obtuvieron los espectros derivados de primer orden de los filtrados a través de 10 puntos, empleando $\Delta\lambda$ crecientes. En estos espectros, Figura II.19, se observa que la magnitud de la señal derivada permanece prácticamente constante, si bien el ruido disminuye cuando se emplean valores mayores de $\Delta\lambda$, por lo que se elige un $\Delta\lambda$ de 24 nm para experiencias posteriores.

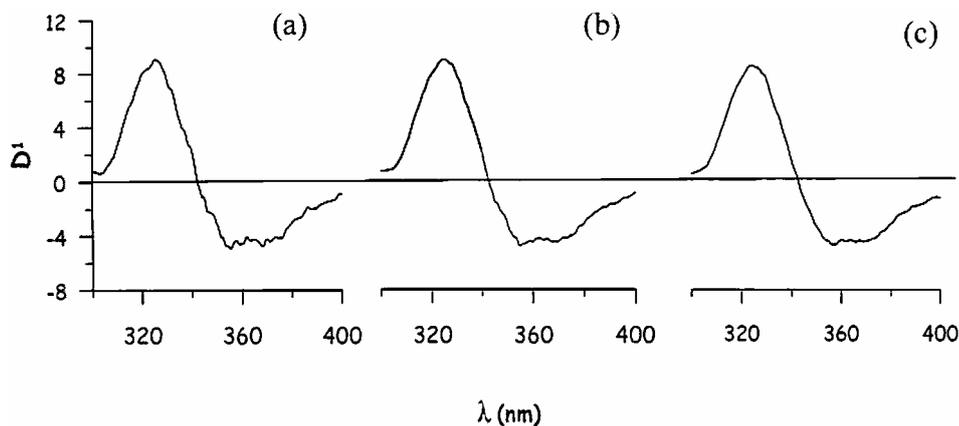


Figura II.19.- Espectros derivados de primer orden del ST filtrados a través de 10 puntos experimentales y derivados con : (a) $\Delta\lambda = 14$ nm, (b) $\Delta\lambda = 18$ nm y (c) $\Delta\lambda = 24$ nm.

SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MEDIDA

Con el fin de seleccionar la longitud de onda más adecuada para la determinación de la ST en muestras reales, se preparó un matraz de 25 mL conteniendo $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST. Se siguió el método operatorio y se obtuvo el espectro de emisión. Se filtró a través de 10 puntos experimentales y se obtuvo el espectro derivado de primer orden con un $\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$. En la Figura II.20 se representa el espectro derivado, observándose que a 324.79 nm se obtiene la máxima señal, por lo que a esta longitud de onda se establecerá la recta de calibrado.

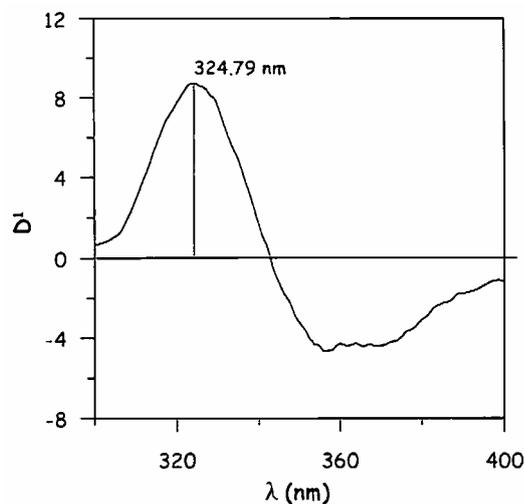


Figura II.20.- Espectro derivado de primer orden de una disolución de ST filtrado a través de 10 puntos experimentales y derivado con $\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACION DE ST

Para estudiar la variación de la señal derivada frente a la concentración de ST se prepararon, en las condiciones descritas, disoluciones de ST de concentraciones crecientes. Representando la señal derivada a 324.8 nm frente a la concentración de sulfamida, Figura II.21, se observa una adecuada linealidad hasta $3.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST. Dicho intervalo de linealidad se confirmó mediante el análisis de varianza (ANOVA).

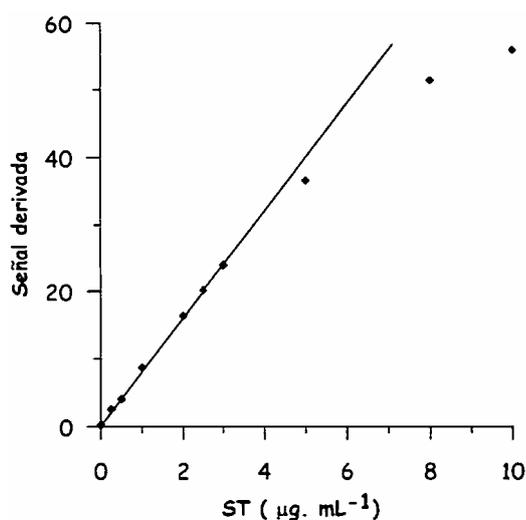


Figura II.21.- Variación de la señal derivada con la concentración de ST

RECTA DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD

La recta de calibrado se estableció preparando, por triplicado, disoluciones de sulfamida de concentración creciente preparadas en las condiciones operatorias descritas. Se obtuvieron los espectros de emisión, se filtraron y derivaron. La gráfica se representa en la Figura II.22.

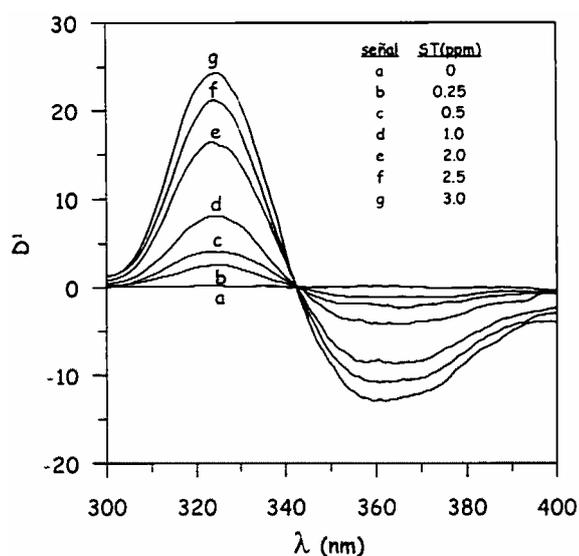


Figura II.22.- Recta de calibrado

Tratados los datos con el programa ACOC, se encontraron los parámetros de calidad que se recogen en la Tabla II.6 y que muestran la posibilidad de determinar ST mediante la derivada primera del espectro RTPF, en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.29 y 3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabla II.6.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	7.97
Ordenada en el origen (a)	0.36
Desviación típica de la pendiente (S_b)	0.07
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.12
Desviación típica estimada (error estándar)	0.35
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999
Linealidad (1 - DER (b)) %	99
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.043
Desviación estándar del blanco	0.029
Límite de determinación (IUPAC)	0.294
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.044
LOD (Clayton)($\alpha = (\beta = 0.05)$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.100
Repetitividad (0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) %	3.84

MÉTODOS OPERATORIOS

Fluorescencia fotoinducida

En matraces de 25 mL se toma el volumen necesario de muestra problema para que la concentración final esté comprendida entre 0.22 y 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, se añade etanol para que su contenido final sea del 20%, 3 mL de tampón acético/acetato 0.5 M de pH 4.75 y agua hasta enrase. En una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso de luz se irradia la muestra durante 5 minutos. La señal de fluorescencia se mide a 342 nm, empleando como longitud de onda de excitación 251 nm

La recta de calibrado se establece con disoluciones de ST de concentraciones comprendidas entre 0.22 - 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. preparadas de forma similar a la muestra problema.

Derivada del espectro de emisión de fluorescencia fotoinducida

Se toma el volumen necesario de muestra problema para que la concentración final esté comprendida entre 0.29 y 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, se trata según el método operatorio descrito. Irradiada la muestra 5 min. se registra el espectro de emisión excitando a 251 nm. Se filtra a través de 10 puntos experimentales, se obtiene el espectro derivado de primer orden con un $\Delta\lambda$. de 24 nm y se mide la amplitud de la señal derivada a 324.8 nm.

La recta de calibrado se establece con disoluciones de ST de concentraciones comprendidas entre 0.29 - 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ preparadas de forma similar a la muestra problema.

APLICACIONES DEL MÉTODO

☞ Determinación de ST en fármacos

Una vez puesto a punto el método de fluorescencia fotoinducida, se aplicó a la determinación de ST en un preparado farmacéutico.

El fármaco elegido, SABAÑOTROPICO, se encuentra en forma de pomada, siendo su composición por 100 g: *Dexametasona fosfato sódico 0.005 g, sulfatiazol 5 g, mentol 3.5 g, ácido tánico 3 g, galato básico de bismuto 2.5 g, fenol 2 g, vaselina c.s.p 100 g.*

Se pesan exactamente alrededor de 0.1 g de pomada, se disuelven con ayuda de una varilla y del ultrasonido usando etanol como disolvente, hasta que sólo queden restos insolubles de vaselina. Se filtra la disolución, se lava con etanol y se enrasa a 100 mL. Se toma 1 mL de esta disolución y se lleva a un matraz de 25 mL, al cual se añade el volumen de etanol necesarios para que su porcentaje final sea del 20%, 3 mL de tampón y se enrasa con agua ultrapura. Se somete a irradiación durante 5 min, tras los cuales se mide la señal de fluorescencia a 342 nm. Los resultados recogidos en la Tabla II. 7 muestran que las recuperaciones obtenidas son próximas al 100 %. Para validar el método se utilizó un método de la bibliografía [104] en el que se medía la amplitud de la señal de la primera derivada a 307 nm, encontrando recuperaciones entorno al 95% con una desviación estándar del 5%.

Tabla II. 7.- Determinación de sulfatiazol en fármacos

Fármaco pesado (g)	ST* puesto (ppm)	(ST encontrado (ppm)	Recuperación (%)
0.1229	2.45	2.36	96
0.1095	2.19	2.09	95
0.1016	2.03	1.89	93

*.- Concentraciones calculadas según el contenido indicado en el fármaco.

☞ Determinación de ST en mieles

Para llevar a cabo esta aplicación, en primer lugar se procedió a estudiar el efecto de la matriz sobre la señal de fluorescencia.

Se pesaron 10 g de miel, se contaminaron con 10 y 20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ST, respectivamente, y se disolvieron con agua ultrapura enrasando a 100 mL. En sendos matraces de 25 mL se introdujeron 2.5 mL de esta disolución, 3 mL de solución tampón acético / acetato sódico 0.5 M de pH 4.75, el volumen de etanol necesario para que su porcentaje final fuese del 20% y agua ultrapura hasta enrase.

Análogamente, se prepararon patrones de 1 y 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de ST y una muestra conteniendo los mL de la disolución de miel sin contaminar, en las mismas condiciones operatorias.

Las muestras fueron irradiadas 5 min. y se registraron los espectros de emisión de fluorescencia excitando a 251 nm. Figura II.23. De estos espectros previamente filtrados a través de 10 puntos experimentales y empleando un $\Delta\lambda = 24 \text{ nm}$, se obtuvieron los espectros derivados de primer orden que se muestran en la Figura II.24.

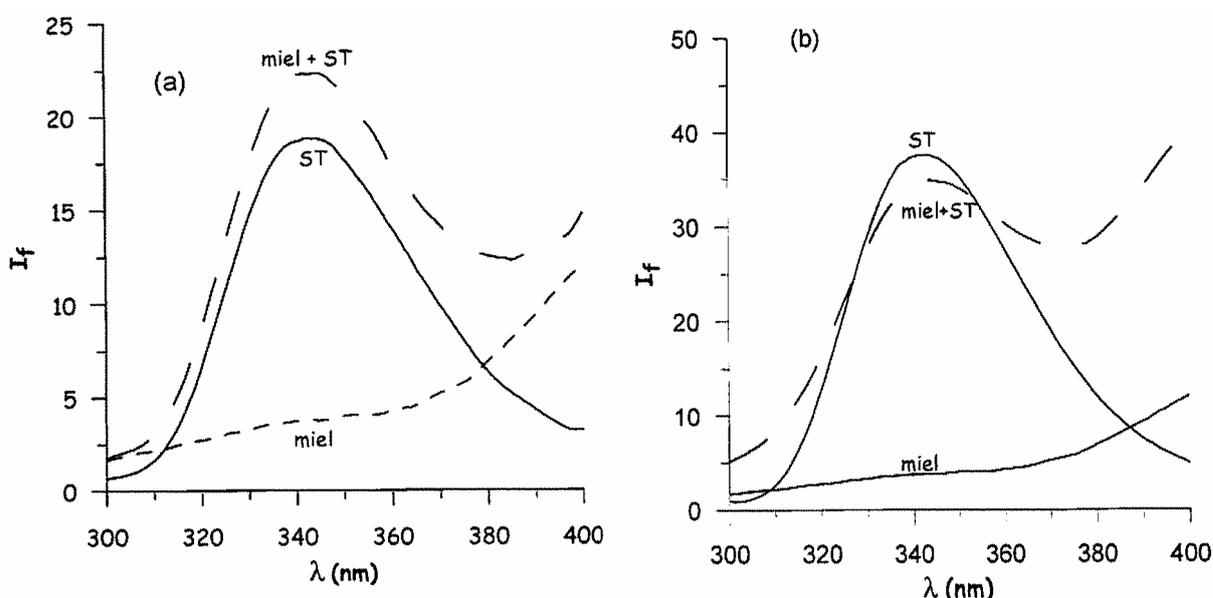


Figura II.23.- Espectros RTPF de orden cero de ST, miel contaminada y miel sin contaminar. (a) ST : 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; (b) ST: 2 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$

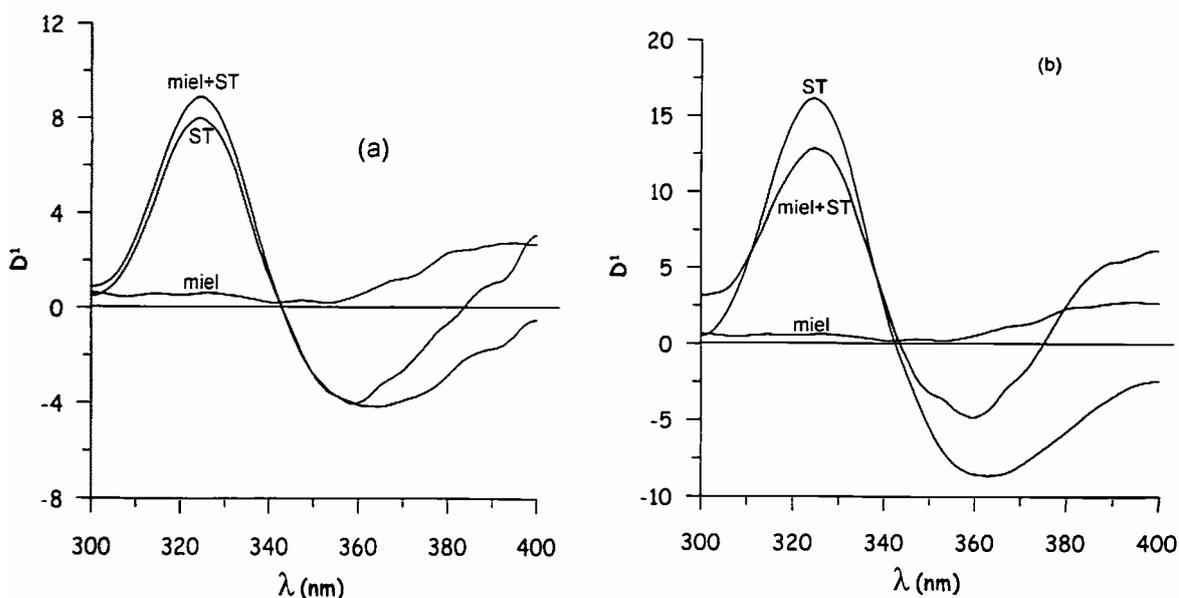


Figura II.24.- Espectros derivados de primer orden, a) ST: $1\mu\text{g.mL}^{-1}$; (b) ST: $2\mu\text{g.mL}^{-1}$

Los espectros obtenidos muestran que la miel presenta una banda ancha en todo el intervalo de longitud de onda utilizado. De otra parte, para una concentración de ST de $1\mu\text{g.mL}^{-1}$ se observa que las señales de fluorescencia son aditivas, mientras que para $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ se observa una falta de aditividad y una inversión de la fluorescencia. Así el patrón de $2\mu\text{g.mL}^{-1}$ presenta una señal de fluorescencia más intensa que cuando dicha concentración de ST está en presencia de miel.

Estos resultados nos llevan a concluir que cuando la presencia de ST se da en elevadas concentraciones ($2\mu\text{g.mL}^{-1}$ corresponderían a $0.167\text{ mg de ST/g miel}$) parte de éste queda retenido en la miel.

En consecuencia, la aplicación del método de adición patrón mostró la inviabilidad de aplicación del método en todo su rango de concentraciones. No obstante se observó que para concentraciones de ST inferiores a $0.8\mu\text{g.mL}^{-1}$ es posible la determinación, por lo que se procedió en primer lugar a variar las condiciones instrumentales para establecer una nueva recta de calibrado para este rango de concentraciones, empleando como señal analítica tanto la intensidad de fluorescencia a $\lambda_{\text{ex}} = 251\text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 342\text{ nm}$. como la amplitud de la señal derivada de primer orden medida a 324.8 nm . Los parámetros de calidad de ambas rectas de calibrado se recosen en la Tabla II.8.

Tabla II.8.- Parámetros de calidad

	Señal analítica: If	Señal analítica: D'(324.8nm)
Pendiente (b)	47.96	19.94
Ordenada Origen (a)	1.89	0.11
Desviación típica de la pendiente (S_b)	1.09	0.40
Desviación típica de la ordenada origen (S_a)	0.33	0.12
Desviación típica estimada (error estandar)	0.79	0.29
Coefficiente de determinación (r^2)	0.996	0.997
Linealidad(1- $DER(b)$)%	98	98
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.016	0.015
Desviación estándar del blanco	0.012	0.010
Límite de determinación (IUPAC)	0.116	0.103
LOD (Clayton)($\alpha= \beta=0.05$)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.040	0.036
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.021	0.018

Establecidas las rectas de calibrado, se aplicó el método de adición patrón a cuatro tipos de mieles, dos españolas, una belga y otra suiza. Las gráficas de estas rectas para dos de estas mieles se recogen en las Figuras II.25 y II.26.

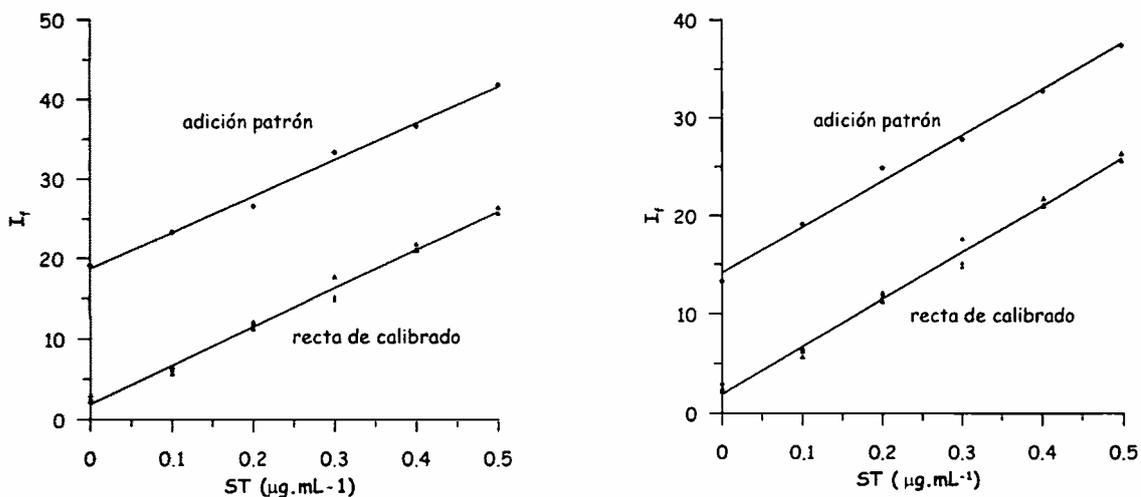


Figura II.25.- Método de adición patrón aplicado a miel de AZAHAR

En este rango de concentraciones, los resultados obtenidos muestran la ausencia de interferencias por parte de la matriz, cuando se usa como señal la amplitud del espectro de primera derivada, por lo que el método propuesto se puede aplicar directamente. Los resultados obtenidos, Tabla II.10, muestran recuperaciones próximas al 100 % en los tipos de mieles ensayados.

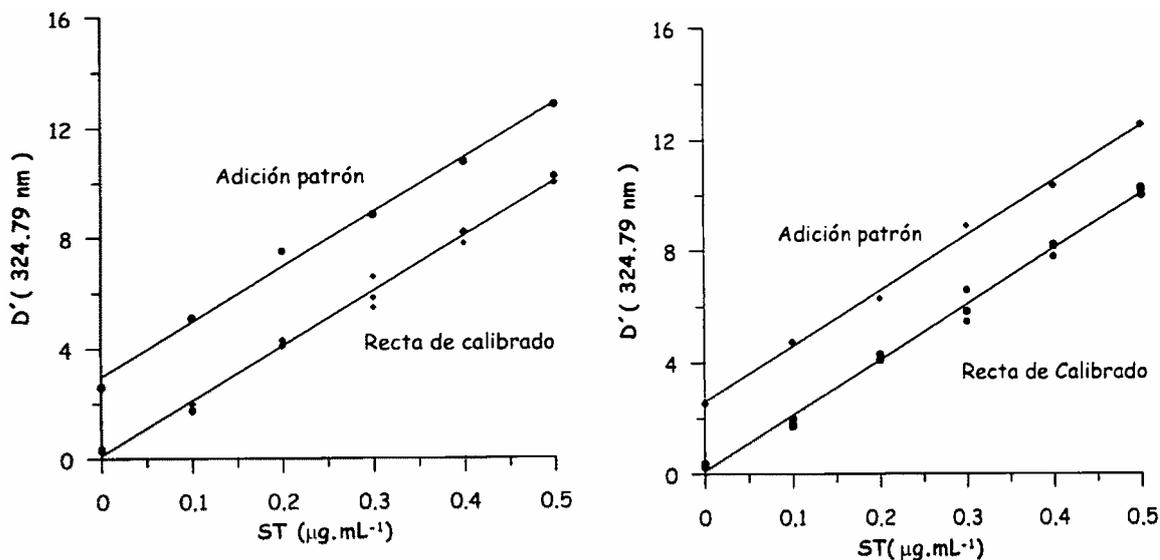


Figura II.26.- Método de adición patrón aplicado a miel MIL FLORES

Tabla II.10.- Recuperaciones obtenidas en la determinación de ST en mieles aplicando el método de adición patrón

ST^{añadido} ($\mu\text{g/g}$)	D¹-RTPF			
	%R^a \pm RSD	%R^b \pm RSD	%R^c \pm RSD	%R^d \pm RSD
10	112 \pm 7	111 \pm 4	112 \pm 9	111 \pm 7
30	103 \pm 4	103 \pm 6	91 \pm 4	90 \pm 4
50	91 \pm 4	90 \pm 4	91 \pm 7	89 \pm 3

^{a, b} .- mieles españolas

^e .-miel suiza

^d .- miel belga

6.-DETERMINACIÓN DE SULFANILAMIDA EN PRESENCIA DE SULFATIAZOL

El objetivo de esta determinación viene dado porque el sulfatiazol y la sulfamida se coadministran juntos en varios productos zoonosanitarios, de ahí la importancia de proponer métodos que resuelvan dicha mezcla o, al menos, la determinación de uno en presencia del otro.

La sulfanilamida (SAN), es una sulfamida no heterocíclica, que presenta una fluorescencia nativa que disminuye al someter a irradiación sus disoluciones.

Frente al comportamiento de esta sulfamida, el ST presenta el contrario, no presenta fluorescencia nativa, pero se induce la señal al someterlo a irradiación. Con estos antecedentes, lo que pretende este estudio es determinar SAN en presencia de ST, con sólo medir la señal de fluorescencia sin irradiar. Dicha señal, en una recta de calibrado obtenida para la variación de la señal de fluorescencia con la concentración de SAN a $t_{irr} = 0$ min, nos dará la concentración de SAN.

Una vez comprobado que SAN, en medio etanol:agua (20:80) y a pH 4.75 presenta una buena señal de fluorescencia, a continuación se estableció el intervalo de linealidad señal de fluorescencia -concentración de SAN, a tiempo de irradiación cero, en ausencia de ST.

ESPECTROS DE EXCITACIÓN Y EMISIÓN

Según la bibliografía, la sulfanilamida presenta máximos de emisión y de excitación, en medio acuoso, a 345 y 260 nm, respectivamente.

Para encontrar las longitudes de onda de excitación y emisión de soluciones de SAN al 20% de etanol y pH 4.75, se preparó una solución conteniendo $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SAN en las condiciones citadas. Una vez enrasada la solución, se registraron los espectros que se recogen en la Figura II.27.

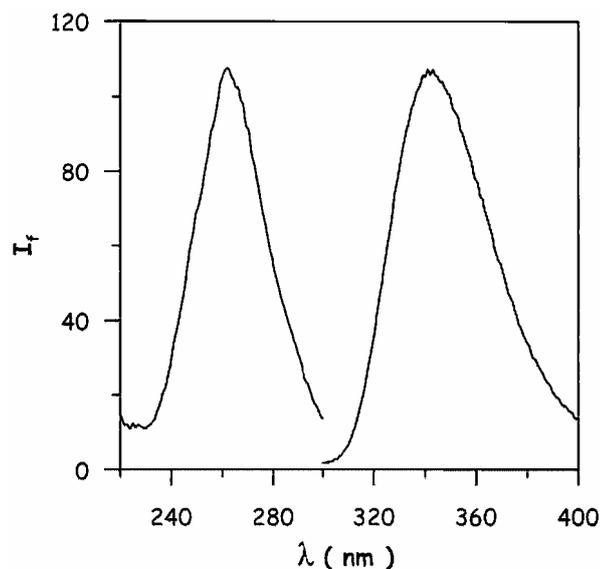


Figura II.27.- Espectros de excitación y emisión de una solución de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN. $t_{irr.} = 0 \text{ min}$

Los espectros obtenidos muestran que, en las condiciones operatorias señaladas, condiciones establecidas para la determinación de ST, las soluciones de SAN presentan máximos de excitación y emisión de 262 y 342 nm, respectivamente.

ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES

De otra parte, para estudiar la estabilidad de las disoluciones de SAN, cada día se prepararon disoluciones de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a partir de las madres de 100 y $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, se añadió 3mL de tampón, el volumen de etanol necesario para que el porcentaje de éste fuese 20% y se enrasó. Excitando a 262 nm, se midió la intensidad de fluorescencia a 342 nm, comprobándose que las disoluciones madre de SAN son estables durante una semana.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAN

Para estudiar de que forma influye la concentración de SAN sobre la señal de fluorescencia, se prepararon muestras de concentraciones crecientes del analito en matraces aforados de 25 mL, se añadieron los volúmenes de etanol adecuado para que su

contenido final fuese del 20%, 3 mL de disolución reguladora de pH 4.75 y agua ultrapura hasta enrase. Las intensidades de fluorescencia fueron medidas a 342 nm, empleando 262 nm como longitud de onda de excitación.

Los resultados obtenidos, que se muestran en la Figura II.28, ponen de manifiesto que la intensidad de fluorescencia aumenta de forma lineal a medida que lo hace la concentración de SAN, hasta que ésta alcanza un valor de $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Para valores superiores de concentración la relación señal de fluorescencia - concentración no es lineal. Este intervalo de linealidad se confirma mediante el análisis de varianza (ANOVA)

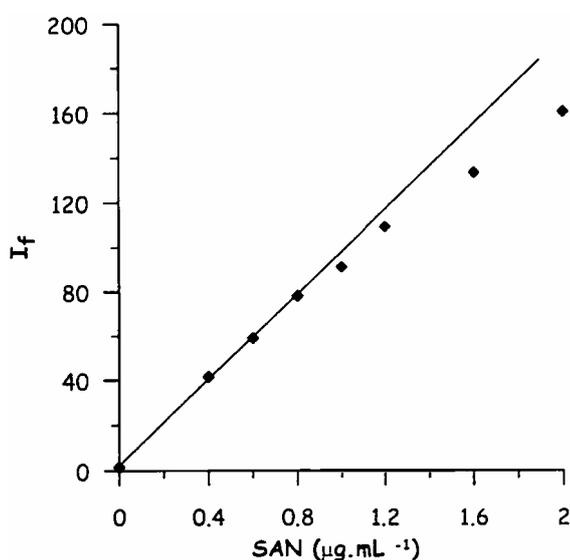


Figura II.28.- *Influencia de la concentración de SAN sobre la intensidad de fluorescencia*

RECTAS DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD

Fijado el rango de linealidad procedemos a establecer la correspondiente recta de calibrado. Como señal analítica empleamos la intensidad de fluorescencia medida a una $\lambda_{em}=342 \text{ nm}$, excitando a 262 nm .

Los patrones se prepararon por triplicado en matraces aforados de 25 mL, adicionando el volumen necesario de disolución madre para que la concentración de SAN esté comprendida entre 0 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 3 mL de disolución reguladora ácido acético/acetato sódico, etanol hasta el 20% y agua ultrapura a enrase.

En la Figura II.29 se recogen los espectros de emisión en el rango de concentraciones ensayado. Una vez obtenidos los datos y ajustados por mínimos cuadrados, se obtiene la recta de calibrado, cuyos parámetros de calidad se recogen en la Tabla II.12.

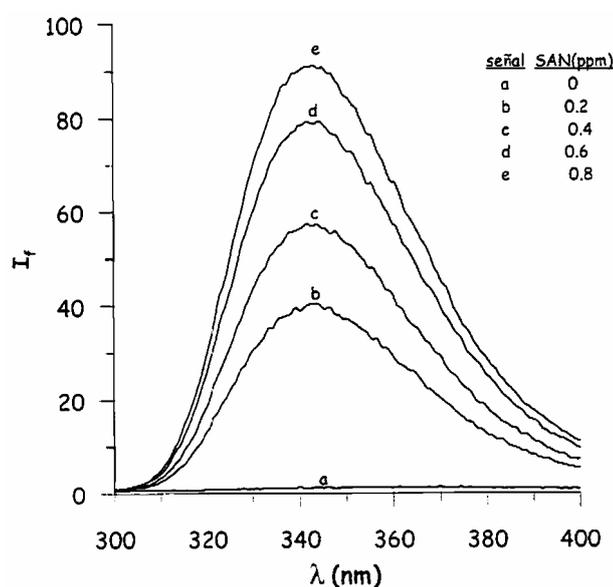


Figura II.29.- Recta de calibrado de la SAN

Los resultados obtenidos muestran una adecuada linealidad en el rango de concentración comprendido entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN, siendo el límite de detección de 0.019 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabla II.10.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	96.76
Ordenada en el origen (a)	2.18
Desviación típica de la pendiente (S_b)	0.55
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.27
Desviación típica estimada (error estándar)	0.600
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999
Linealidad (1 - DER (b)) %	99
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	0.006
Desviación estándar del blanco	0.009
Límite de determinación (IUPAC)	0.09
LOD (Clayton)($\alpha = \beta = 0.05$) ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	0.036
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)	0.019
Repetitividad ($0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)%	1.99

DETERMINACION DE SAN EN PRESENCIA DE ST

Obtenida la recta de calibrado, se ensayó el método con muestras sintéticas conteniendo SAN y ST. Se preparó una disolución conteniendo $0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de SAN y $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ST, se añadió el volumen adecuado de etanol para que su contenido final fuese del 20%, 3 mL de solución tamponadora y se enrasó a 25 mL. Así mismo, se prepararon dos muestras conteniendo $0.5 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de SAN y $1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ de ST en las mismas condiciones de la disolución mezcla. Se registraron los espectros de emisión excitando a 262 nm.

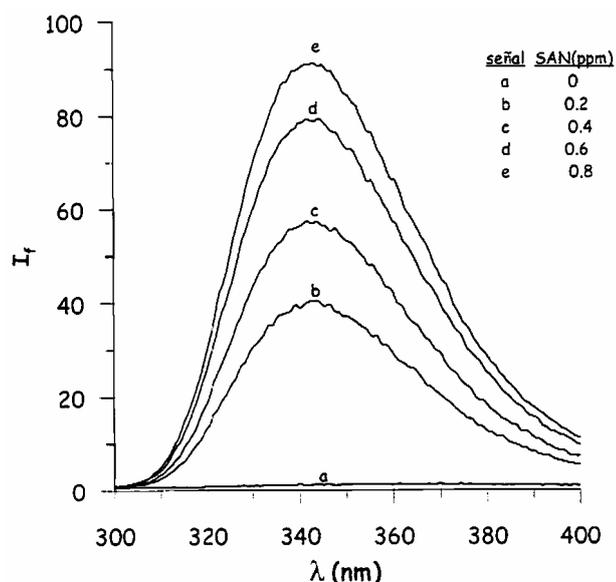


Figura II.30.- Espectros de emisión: a) $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN; b) $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST; c) mezcla

Los espectros registrados muestran que la solución de SAN presenta un máximo de emisión a 342 nm. A dicha longitud de onda la señal debida al ST es pequeña, pero no permite determinar SAN con un margen de error admisible. En estas condiciones, se registraron los espectros derivados de primer orden de las tres muestras. Figura II. 31.

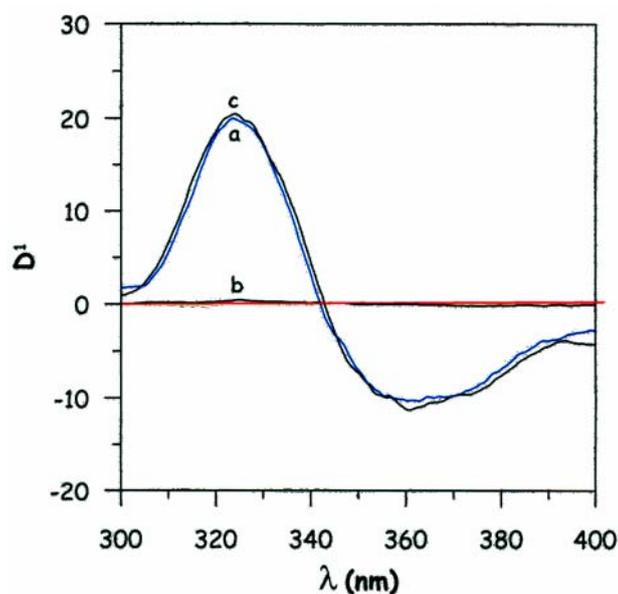


Figura II.31.- Espectros derivados de primer orden, a) $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN; b) $1.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST; c) mezcla

Los espectros obtenidos muestran la viabilidad de la determinación de SAN en presencia de ST, haciendo uso de técnicas derivadas.

A la vista de estos resultados, se procedió a optimizar las condiciones instrumentales para la obtención de los espectros derivados de primer orden.

INFLUENCIA DEL FILTRADO Y DEL $\Delta\lambda$

Para seleccionar el filtrado se prepararon muestras en matraces aforados de 25 mL, de $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de analito, etanol hasta un 20%, 3 mL de disolución reguladora de pH 4.75 y agua ultrapura hasta el enrase.

A continuación, sin irradiar la muestra, se registra el espectro de emisión de fluorescencia. Este espectro se filtra a través de diferente número de puntos experimentales. En la Figura II.32 se muestran algunos de los espectros de emisión obtenidos una vez filtrados a través de 9, 11, 15 puntos experimentales.

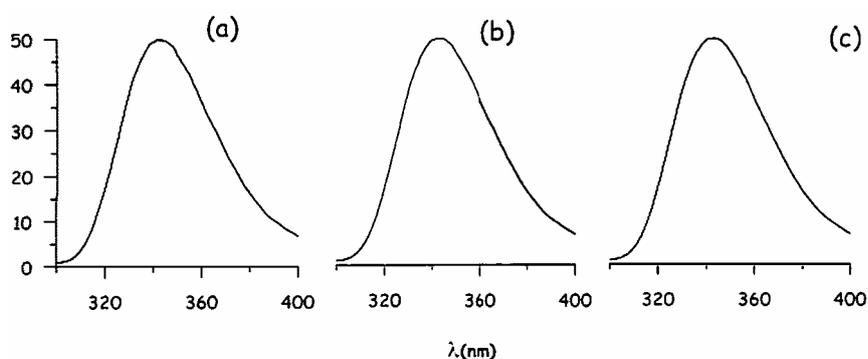


Figura II.32.- Espectros de la SAN filtrados a través de: (a) 9. (b) 11 y (c) 15 puntos experimentales.

En la figura se observa como, a medida que aumenta el número de puntos experimentales utilizados para la filtración, el ruido disminuye, no variando las señales analíticas de forma significativa. En lo sucesivo se filtraran los espectros a través de 11 puntos experimentales.

Para optimizar el $\Delta\lambda$ se empleó la disolución de SAN de $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ preparada en las condiciones operativas citadas. Obtenido el espectro de fluorescencia de orden cero, se filtró a través de 11 puntos experimentales y se obtuvieron los espectros derivados empleando $\Delta\lambda$ crecientes. En éstos. Figura 11.33, se observa que la amplitud de la señal derivada permanece prácticamente constante, si bien el ruido disminuye cuando se emplean valores mayores de $\Delta\lambda$, por lo que se elige un $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$ para experiencias posteriores.

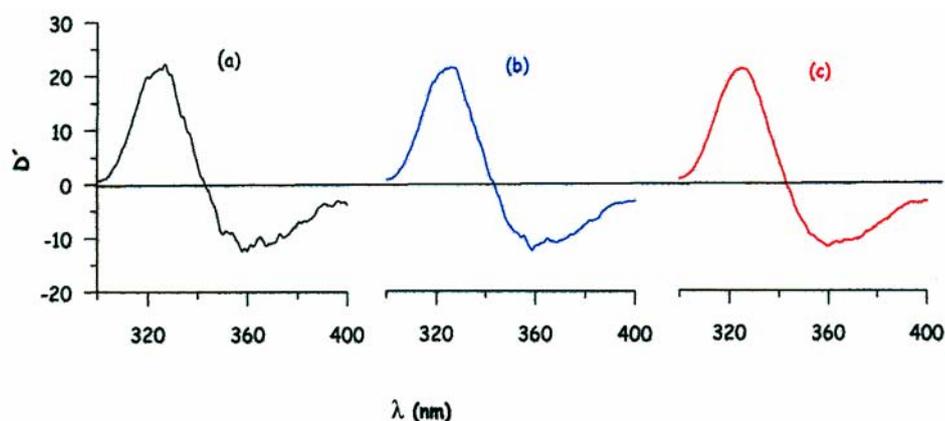


Figura 11.33.- Espectros derivados de primer orden de la SAN filtrados a través de 11 puntos experimentales y derivados con : (a) $\Delta\lambda = 15 \text{ nm}$, (b) $\Delta\lambda = 19 \text{ nm}$ y (c) $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$.

SELECCIÓN DE LA LONGITUD DE ONDA DE MEDIDA

Con el fin de elegir la longitud de onda más adecuada para la determinación de la SAN en presencia de ST, se preparó un matraz de 25 mL conteniendo $0.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN. Se siguió el método operatorio y se obtuvo el espectro de emisión. Se filtró a través de 11 puntos experimentales y se obtuvo el espectro derivado de primer orden con un $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$.

En la Figura 11.34 se recogen los espectros derivados de dicha solución junto con el de una solución de $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de ST, registrado en las condiciones señaladas. Como se observa, empleando 324.4 nm como longitud de onda de medida, la señal derivada de ST es prácticamente nula.

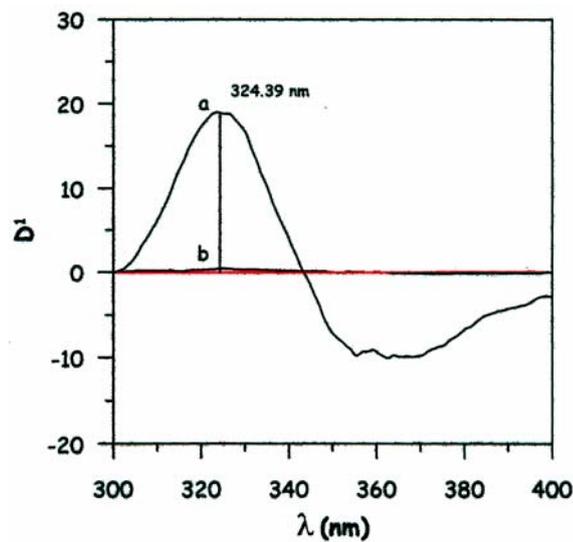


Figura II.34.- Espectro derivado de primer orden de una disolución de ST (b) y de SAN (a) filtrado a través de 11 puntos experimentales y derivado con $\Delta\lambda = 25 \text{ nm}$.

INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SAN

Para estudiar la variación de la señal derivada frente a la concentración de SAN se prepararon, en las condiciones descritas, disoluciones de SAN de concentraciones crecientes. Representando la señal derivada a 324.4 nm frente a la concentración de sulfamida, Figura II.35, se observa una adecuada linealidad hasta $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de SAN. Dicho intervalo de linealidad se confirmó mediante análisis de varianza.

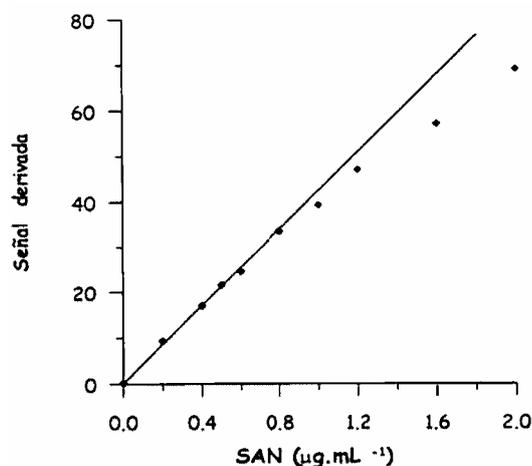


Figura II.35.- Variación de la señal derivada con la concentración de SAN.

RECTA DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD

La recta de calibrado se estableció preparando, por triplicado, disoluciones de sulfamida de concentración creciente preparadas en las condiciones operatorias descritas. Se obtuvieron los espectros filtrados y los derivados de primer orden que se recogen en la Figura II.36.

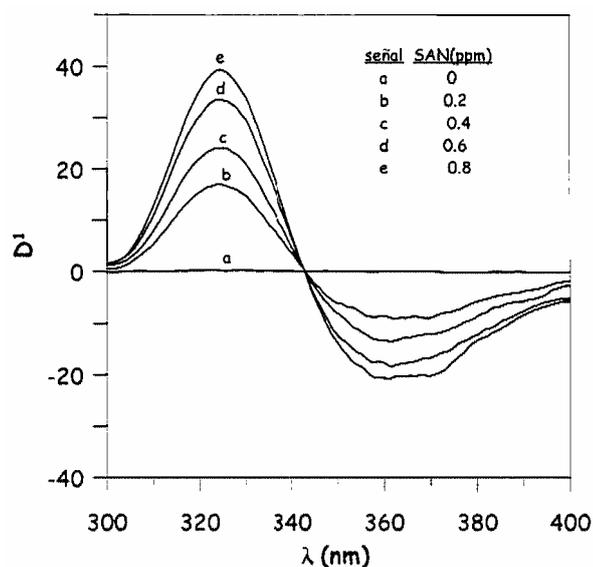


Figura II.36.- Recta de calibrado

Las amplitudes de la señal derivada a 324.4 nm fueron tratadas obteniéndose, para la recta de calibrado, los parámetros de calidad que se recogen en la Tabla II.11.

Tabla II.11.- Parámetros de calidad

Pendiente (b)	38.05
Ordenada en el origen (a)	0.82
Desviación típica de la pendiente (S_b)	0.60
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.29
Desviación típica estimada (error estándar)	0.660
Coefficiente de determinación (r^2)	0.998
Linealidad (1 - DER (b)) %	98
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.013
Desviación estándar del blanco	0.009
Límite de determinación (IUPAC)	0.09
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.019
LOD (Clayton)($\alpha = \beta = 0.05$)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.033
Repetitividad (0.5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) %	1.99

Establecidos los parámetros de calidad, Tabla II.11, los resultados obtenidos muestran que la determinación de SAN es viable en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de sulfamida.

RANGO DE APLICACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE SAN EN PRESENCIA DE ST

Una vez establecidos los intervalos de aplicación para la determinación de SAN y anteriormente los de ST, se procedió a comprobar si el análisis de SAN, mediante la primera derivada del espectro de emisión de fluorescencia en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de SAN, es viable cuando el ST está presente en concentraciones comprendidas entre 0.22 y 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para ello se prepararon cuatro serie de disoluciones en cada una de las cuales se mantuvo constante una concentración de ST comprendida entre 0.22 y 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ y

concentraciones crecientes de SAN comprendidas entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Obtenidas las señales derivadas, se encontraron las ecuaciones de las rectas señal-concentración de SAN para cada serie. Las concentraciones de ST mantenidas constantes en cada una de las series fueron 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Las ecuaciones encontradas se compararon [120] con la ecuación de la recta de calibrado obtenida para SAN en ausencia de la segunda sulfamida.

Se emplea el test F para comparar las varianzas y si éstas no son significativamente diferentes se aplica el test T para comparar las pendientes. Si existen diferencias entre las pendientes se aplica la aproximación de Cochran. El nivel de significación utilizado fue del 0.05.

Los resultados obtenidos, que se resumen en la Tabla II. 12, muestran que en presencia de concentraciones de ST superiores a 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ no es posible la determinación de SAN en el intervalo de concentraciones comprendido entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de esta sulfamida. El análisis de SAN es viable en el citado intervalo de concentraciones si el del ST está comprendido entre 0.22 y 1.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. De otra parte, cuando el ST está presente en concentraciones comprendidas entre 0.22 y 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ la determinación de SAN es posible entre 0.09 y 0.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Cuando la concentración de ST presente es superior a 2.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, la determinación de SAN es inviable.

Tabla II.12.- Intervalo de concentración de la determinación de SAN en presencia de ST

ST presente ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	Rango de aplicación SAN ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
1.0 - 2.0	0.09 - 0.6
0.22 - 1.0	0.09 - 0.8

Estos resultados nos permiten concluir que se podría determinar SAN en un fármaco en el que esté presente ST y SAN en estas relaciones, empleando como señal analítica la señal derivada de la mezcla.

RECTAS DE CALIBRADO

Se establecen rectas de calibrado con sus respectivas réplicas para los rangos de concentraciones encontrados y se hace el estudio comparativo entre las pendientes. Las ecuaciones de las rectas para cada uno de los rangos estudiados se recogen en la siguiente tabla.

Tabla II.13.- Rectas de calibrado

<i>[SAN]/ [ST] ppm</i>	<i>Ecuación</i>
0.09 – 0.8 /---	${}^1D_{324.39} = 38.05 * X + 0.825$
0.09 – 0.6 /---	${}^1D_{324.39} = 38.99 * X + 0.700$
0.09 - 0.6 / 0.22 - 2.0	${}^1D_{324.39} = 36.59 * X + 0.732$
0.09 - 0.6 / 0.22 - 1.5	${}^1D_{324.39} = 37.47 * X + 0.716$
0.09 - 0.8 / 0.22 - 1.0	${}^1D_{324.39} = 36.57 * X + 0.774$

MÉTODO OPERATORIO

En matraces de 25 mL se toma el volumen adecuado de muestra problema para que el contenido final de sulfanilamida esté comprendido entre 0.09 y 0.6 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ si la concentración de ST presente es superior a 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ o entre 0.09 y 0.8 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ de SAN si la presencia de ST es inferior a 1.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. A continuación se añade el volumen necesario de etanol para que su contenido total sea del 20%. 3 mL de solución tampón acético/acetato sódico 0.5 M de pH 4.75 y agua ultrapura hasta enrase.

Excitando a 262 nm, se registran los espectros de emisión de fluorescencia, se filtran a través de 11 puntos, se obtiene el espectro derivado con un $\Delta\lambda$ de 25 nm y se mide la señal derivada a 324.4 nm.

La recta de calibrado se establece con disoluciones de SAN de concentración conocida y comprendida en los intervalos arriba señalados, preparadas como la muestra problema.

APLICACIÓN

Antes de aplicar el método de determinación de SAN en preparados farmacéuticos se comprobó el efecto de matriz, para lo que se aplicó el método de adición patrón, cuyos resultados pusieron de manifiesto la ausencia de efecto de matriz, por lo que se procedió a la aplicación directa del método propuesto.

El fármaco utilizado fue “ POLVOS WILFE ” que presenta la siguiente composición por gramo: 0.697 g de ST y 0.303 g de SAN.

Este fármaco se presenta en forma de polvo y no es soluble en agua. Para llevar a cabo la aplicación se procedió como se describe a continuación: se pesan por triplicado exactamente alrededor de 0.1 g de fármaco y se llevan a 100 mL de etanol. Se diluye tomando 1 mL y llevándolo a 100 mL con etanol. Tomando los volúmenes adecuados de esta disolución se aplica el método operatorio propuesto, cuyos resultados resumidos en la Tabla II. 14, muestran recuperaciones próximas al 100%.

Tabla II.14.-Determinación de sulfanilamida en presencia de sulfatiazol en un fármaco

<i>Fármaco pesado (g)</i>	<i>[SAN] *puesta (ppm)</i>	<i>[SAN] encontrada (ppm)</i>	<i>% Recuperación</i>
0.1049	0.127	0.132	104
	0.317	0.306	97
	0.508	0.472	93
0.0949	0.115	0.110	96
	0.287	0.282	98
	0.460	0.434	94
0.1013	0.122	0.120	99
	0.306	0.291	95
	0.491	0.444	90

*.- Concentraciones calculadas según el contenido indicado en el fármaco.

7.- CONCLUSIONES

En este Capítulo se ha propuesto un método para determinar sulfatiazol en formulaciones zoosanitarias mediante el uso de fluorescencia inducida fotoquímicamente, así como la determinación de esta sulfamida en mieles utilizando como señal la primera derivada de la fluorescencia inducida fotoquímicamente obtenida. Debido al amplio uso de formulaciones zoosanitarias donde se coadministran sulfatiazol y sulfanilamida, se ha desarrollado un método para la determinación de sulfanilamida en presencia de sulfatiazol en dichas formulaciones, utilizando como señal analítica la primera derivada del espectro de emisión. Estos métodos son de suma importancia debido al uso indiscriminado de antibióticos para el tratamiento de colmenas, con el consecuente riesgo de aparición de residuos de éstos en la miel.

Los métodos propuestos son simples y baratos, no siendo necesarios pretratamientos de las muestras. En comparación con otros procedimientos existentes en la literatura, estos métodos son rápidos, ya que no es necesario reacciones de derivatización. Además la selectividad es también buena, debido al uso de señales de fluorescencia y al incremento de ésta al utilizar fluorescencia inducida fotoquímicamente.

- 1.- Sadee, W. y Beelen. G.C.M., *Drug Level Mónica*, Wiley, New York, 1980.
- 2.- Koroldovas, A. y Burckhalter, J.H., *Compendio Esencial de Química Farmacéutica*, Ed. Reverté, S.A., 1978.
- 3.- Flórez, J., Armijo, J.A. y Mediavilla, A., *Farmacología Humana*, Ediciones Científicas y Técnicas. S.A., 2ª Edición, 1992, Barcelona.
- 4.- Landy, M., Larkun, N.W., Oswald, E.J. y Streightoff, F., *Science*, 1943, 97, 265.
- 5.- Pato, M.L. y Brown, G.M., *Arch. Biochem. Bicphys.*, 1963, 103, 443.
- 6.- Bell, P.H., Robin, R.O. Jr., *J. Amer. Chem. Soc.* 1942, 64, 2095.
- 7.- Pawlaczyk, J., Turowska, W. y Nowicka, K., *Acta Pol. Pharm.*, 1975, 32, 53.
- 8.- Ahmad, T., *Pharmazie*, 1982, 37, 559.
- 9.- Mahedero, M.C. y Aaron, J.J., *Analisis*, 1992, 20, 53.
- 10.- Sánchez Peña, M, Salinas, F., Mahedero, M.C. y Aaron, J.J., *Talanta*, 1994, 41, 233.
- 11.- Sánchez Peña, M., Salinas, F., Mahedero, M.C. y Aaron, J.J., *J. Pharm. and Biomed. Anal.*, 1992, 10, 805.
- 12.- Mahedero, M.C, Salinas, F. y Aaron, J.J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1949, 12, 1097.
- 13.- Mahedero, M.C, Salinas, F., Jiménez-Arrabal, M. y Aaron J.J., *Anal. Letters*. 1994, 27, 1543.
- 14.- Mahedero, M.C. y Aaron, J.J., *Anal. Chim. Acta*, 1992, 269, 193.
- 15.- Aaron, J.J., Acedo Valenzuela, M.I., Sánchez Peña, M., Salinas, F. y Mahedero, M.C. *Anal. Chim. Acta*, 1995, 314, 45.
- 16.- Mahedero, M.C; Galeano, T., Galán Pascual, S., *Talanta*, 2002, 57, 1.
- 17.- Sánchez Peña, M., Muñoz de la Peña, A., Salinas, F., Mahedero, M.C. y Aaron, J.J., *Analyst*, 1994, 119, 1117.
- 18.- Udenfriend, S., *Fluorescence Assay in Biology and Medicine, Vol. 2. Academic Press*, New York, 1969.
- 19.- Fink, W. y Koeffler, W.R., *Anal. Chem.*, 1970, 42, 990.
- 20.- Fitzgerald, J.M., en Fitzgerald, J.M., Ed., *Analytical Photochemistry and Photochemical Analysis*, Marcel Dekker, New Cork, 1971, p. 145.
- 21.- Lukasiewicz, R.J. y Fitzgerald, J.M., *Anal. Chem.*, 1973, 45, 511.
- 22.- Lukasiewicz, R.J. y Fitzgerald, J.M., *Appl. Spectrosc*, 1974, 28, 151.

- 23.- Aaron, J.J., Villafranca, J.E., White, V.R. y Fitzgerald, J.M., *Appl Spectrosc.* 1976, 30, 59.
- 24.- Aaron, J.J, *Methods Enzymol.*, 1982, 67F, 140.
- 25.- Birks, J.W. y Frei, R.W., *Trends Anal. Chem.*, 1982,1, 361.
- 26.- Gandelman, M.S., y Birks, J.W., *Anal. Chem.*, 1982, 54, 2131.
- 27.- Gandelman, M.S., y Birks, J.W., Brinkman, U.A. Th. y Frei. R.W., *J. Chromatogr.*, 1983, 282, 193.
- 28.- Gandelman, M.S., y Birks, J.W., *Anal. Chim. Acta*, 1983, 155, 159.
- 29.- Traore, S. y Aaron, J.J., *Anal. Lett.*, 1987, 20, 1995.
- 30.- Aaron , J.J., *Molecular Luminiscence Spectroscopy. Methods and Applications. Part 3.*, Ed. by S.G. Schulman, 1993, 85.
- 31.- Fidanza, J. y Aaron, J.J., *Analisis*, 1981, 9, 118.
- 32.- Aaron, J.J. y Fidanza, J., *Talanta*, 1982, 29, 383.
- 33.- Aaron, J.J., Ndiaye, S.A. y Fidanza, J., *Analisis*. 1982, 10, 433.
- 34.- Tsuchiya, M., Torres, E., Aaron, J.J. y winerfordner, J.D., *Anal. Lett.*, 1984, 17 ,1831.
- 35.- Kikuta, C. y Schmid, R., *J. Phannacol. Biomed. Anal.*, 1989, 7. 329.
- 36.-Harman, P.J., Blackman, G.L. y Philipou, G., *J. Chromatogr.*, 1981, 225, 131.
- 37.-Thsuchiya, M., Aaron, J.J., Torres, E. y Winefordner, J.D., *Anal. Lett.*, 1985, 18, 1647.
- 38.- Kan, R.O., *Organic Photochemistry*, McGraw-Hill, New York, 1966, 219.
- 39.- Brown, R.R., Bam, R. y Craig Jordán. V., *J. Chromatogr., Biomed. Appl.*, 1983, 272, 351.
- 40.- Aaron, J.J. y Diop, A., *Analisis*, 1985, 13, 40.
- 41.-Shih, Y.T. y Carr, P.W., *Anal. Chim. Acta*, 1984, 159, 211.
- 42.- Miles, C.J. y Moye, H.A., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 220.
- 43.-Werkhoven-Goewie, CE., Boon, W.M., Praat, A.J.J., Frei, R.W. Brinkman, U.A. Th. y Little, C.J., *Chromatographia*, 1982, 16, 53.
- 44.- Lefevre, M.F., Freí, R.W., Scholten, A.H.M.T . Y Brinkman, U.A. Th., *Chromatographia*, 1982, 15, 459.
- 45.- White V.R., Fring, C.S., Villafranca, J.E. y Fitzgerald, J.M., *Anal. Chem.*, 1976, 48, 314.
- 46.- Laasis, B., Aaron J.J.y Mahedero, M.C., *Anal. Chim. Acta*, 1994, 290, 27.

- 47.-** Gandelman, M.S. y Birks, J.W., *J. Chromatogr.*, 1982, 242, 21.
- 48.-** Arakawa Y., Imai K., Tamura Z., *Anal. Chim. Acta*, 1983, 147,325
- 49.-** Fall, C.A.T., Diop, A. y Aaron, J.J., *Bull Soc. Chim. Belg.*, 1986, 95, 631.
- 50.-** Poulsen, J.R., Birks, K.S., Gandelman. M.S. y Birks, J.W., *Chromatographia*, 1986, 22, 231.
- 51.-** Fidanza, J. y Aaron, J.J., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1987, 5, 619.
- 52.-** Fricoteaux, R., Quaglia, M. y Aaron, J.J., *4th International Symposium on Quantitative Luminiscence Spectrometry in Biomedical Sciences*. Gante, Bélgica, Mayo 1991.
- 53.-** Procopio, J.R. Hernández, P.H. y Hernández, L.H., *Analyst*, 1987, 112, 79.
- 54.-** Brinkman, U.A. Th., Welling. P.L.M., De Vries, G., Scholten, A.H.M.T. y Frei, R.W., *J. Chromatogr.*, 1981, 217, 463.
- 55.-** Scholten, A.H.M.T., Brinkman, U.A. Th. y Frei, R.W., *Anal. Chim. Acta*, 1980, 114, 137.
- 56.-** Scholten, A.H.M.T., Welling. P.L.M., Brinkman. U.A. Th. y Frei, R.W., *J. Chromatogr.*, 1980, 199, 239.
- 57.-** Chen, D., Ríos, A., Luque del Castro, M.D. y Valcárcel, M., *Analyst*, 1991, 116, 171.
- 58.-** Laasis. B., Aaron, J.J. y Mahedero, M.C., *Talanta*, 1994, 41, 1985.
- 59.-** Maafí. M., Laasis, B., Aaron. J.J., Mahedero, M.C., Muñoz de la Peña, A. y Salinas, F., *J. of Incl. Phen. and Mol. Recognition in Chem.*, 1995, 22, 235.
- 60.-** Uihlein, M. y Schwab, E.. *Chromatographia*, 1982, 15, 140.
- 61.-** Arakawa, Y., Imai, K. y Tamura, Z., *Anal. Biochem.*, 1983, 132, 389.
- 62.-** Schmid, R.W., Wof, C. y Kupferschmidt, R., *13th Symposium on Column Liquid Chromatography*, Stockholm, Suecia, Junio, 1989.
- 63.-** Wolf, C. y Schmid, R.W., *2nd International Symposium on Farmacéutica!y Biomedical Análisis*, York, Inglaterra. Abril, 1990.
- 64.-** Maafi, M., Taha-Bouamri, K., Bautista, A., Aaron, J.J., Mahedero, M.C., Muñoz de la Peña, A., y Salinas , F., *Biomed. Chromatogr.*, 1999, 13, 189.
- 65.-** Bautista, A., Aaron, J.J., Mahedero, M.C. y Muñoz de la Peña, A., *Analisis*, 1999, 27, 857.
- 66.-** Mahedero, M.C., Muñoz de la Peña, A., Bautista-Sánchez, A. y Aaron, J.J.,

Luminescence, 2000, 15, 103.

67.- Gil-García, M.D., Martínez-Galera, M., López-López, T. y Martínez-Vidal, J.L., Mahedero, M.C., Salinas, F., *Talanta*, 2001, 53, 915.

68.- Mahedero, M.C., Muñoz de la Peña, A., Bautista-Sánchez, A., Aaron, J.J. *Journ. Of Incl. Phenom. and Macro. Chemistr.* , 2002, 42, 61.

69.- Muñoz de la Peña, A., Mahedero, M.C., Bautista-Sánchez, A., *Journ. of Chromat.*, 2002, 950, 287.

70.- Coly, A., Aaron, J.J., *J-AOAC-Int.*, 2001, 84, 1745.

71.- Aaron, J.J., Coly, A., *Luminescence*, 2000, 15, 63.

72.- Coly, A., Aaron, J.J., *Talanta*, 1999, 49, 107.

73.- Coly, A., Aaron, J.J., *Analytica-Chimica-Acta*, 1999, 392, 255.

74.- García-Campana, A.M., Aaron, J.J., Bosque-Sendra, JM., *Talanta* , 2001, 55, 531.

75.- García-Campana, A.M., Aaron, J.J., *Luminescence*, 2000, 15, 110.

76.- Aaron, J.J., Coly, A., *Analisis*, 2000, 28, 699.

77.- Thomas, M.H., Soroka, K.E., Thomas, S.H., *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 1983, 66, 881.

77.- Neidert. E., Baramiak, Z., Sauve, A., *J. Assoc. off Anal. Chem.*, 1986, 69, 641.

79.- Thomas, G.K., Millar, R.G., Anstis, P.W., *J. AOAC. Int.* 1997, 80, 988.

80.- Schwaiger, I., Schuch, R., *Dtsch-Lebensum-Rundsch.*, 2000, 96, 93.

81.- Smallidge, R.L, Kentzer, E.J., Stringham, K.R., Kim, E.H., Lehe, C., Stringham, R.W., Mundell, E.C., *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 1988, 71, 710.

82.- Vinas, P., López Erroz, C., Campillo, N., Hernández Córdoba, M., *J. Chromatogr.*, 1996, 726, 125.

83.- Gehring, T.A., Rushing, L.G., Thompson, H.C., *J. AOAC. Int.*, 1997, 80, 751.

84.- Paseka, H., Polasek, M., Cigarro, J.F., Dolejsova, J., *Anal. Chim. Acta*, 2001, 448, 165.

85.- Schwaiger, I., Schuch, R., *Dst Lebensmittel Rundschau*, 2000, 96, 93.

86.- Hammond, V.J. and Price, W.C., *J. Opt.Soc.Amer.*, 1953, 43, 924.

87.- Movish, J.D., *J. Chem. Phys.*, 1953. 21. 1767.

88.- Giese, A.T. and French C. S., *Appl. Spectrosc.* 1955, 9, 78.

89.- Martin. A.E., *Nature (London)*, 1957, 180, 231.

- 90.-** Pemsler. J. P., *Rev. Sci. Instrum.*, 1957, 28, 274.
- 91.-** McWilliam, I. G., *J. Sci. Instrum.*, 1959. 37, 51.
- 92.-** Anacreon, R. E., Editor, *P-E Technical Memo*, 1970, 5.
- 93.-** Hagar, R. N., *Anal. Chem.*, 1973, 45, 1131A.
- 94.-** W. Snelleman, W. et al., *Anal. Chem.*, 1970. 42, 394
- 95.-** Green, G. L. and CTHaver T.C., *Analyt. Chem.*, 1974. 46. 2191.
- 96.-** Gong. Q. J., Jin. W.J., Dong, C, *Guangpuxue-Yu-Gangpu-Fenxi*, 2001, 21. 688.
- 97.-** Murillo-Pulgarín, J.A., Alanon-Molina, A., Fernandez-Lopez, P., *Anal. Biochem.*, 2001, 292, 59.
- 98.-** Torres- Sequeiros. R. A., García-Falcon, M.S., Simal-Gándara, J., *Chromatographia*, 2001, 53, 236.
- 99.-** Gong. Q.J., Du, L. M., Jin, W.J., Dong, C., Liu, C. S., *Guangpuxue-Yu-Gangpu-Fenxi*, 2001, 21, 356.
- 100.-** Wang, J.P., Du, L.M., Xu, Q.P., *Fenxi-Kexue-Xuebao*, 2001, 17, 135.
- 101.-** Li, Y.Q., Sui, W., Wu, C., Yu, L.J., *Anal. Sci.*, 2001, 17, 167.
- 102.-** Liang, S. C., Wang, H., Zhang, Z.M., Zhang, X., Zhang, H.S., *Anal. Chim. Acta*, 2002, 421.211.
- 103.-** Hassib, S.T., Moussa, B.A., Hashim, H.A., El-Zaher, A.A., *Spectrosc. Lett.*, 2002,35, 43.
- 104.-** Salinas F., Espinosa A., Berzas Nevado J.J, *Microchem.* 1991, 43, 244

1.-INTRODUCCIÓN

En los últimos años, los métodos de calibración multivariante están siendo cada vez más utilizados en espectroscopía molecular, como una alternativa a los métodos de separación para la determinación de analitos en mezclas complejas. Estos métodos de calibración, que suelen utilizar como señal analítica todo el espectro, ofrecen la ventaja de la velocidad en la determinación de estos compuestos de interés, al evitar etapas de separación en el procedimiento analítico. El método de mínimos cuadrados parciales (PLS) se ha convertido en una herramienta usual de calibración de primer orden, debido a la calidad de los modelos de calibración que se obtienen con él, así como por la disponibilidad de programas informáticos comerciales que permiten utilizarlo de una manera fácil. Una característica importante de PLS es que se puede realizar la calibración, aún cuando no se conozcan explícitamente las concentraciones de los demás componentes de la muestra a analizar. Sin embargo, todos los métodos de primer orden, incluyendo PLS, son sensibles a la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, lo cual puede conducir a errores en las predicciones. Esta es la situación que se presenta usualmente cuando analizamos muestras naturales de composición compleja, como es el caso de las muestras de miel.

Una buena alternativa para solucionar el problema que genera la presencia de interferencias no modeladas en la etapa de calibración, es la utilización de datos de tres vías o calibración de segundo orden [1]. Ejemplos de datos bilineares de segundo orden son los que se obtienen con las técnicas cromatográficas cuando se usa un detector de diodos, que permite registrar el espectro a cada tiempo de retención del cromatograma, o la hibridación GC-MS, así como el registro de matrices de fluorescencia de excitación-emisión (EEMs). La descomposición de los sensores de datos de tres vías (obtenidos cuando se agrupa un conjunto de muestras de datos de segundo orden) es a veces única, lo cual permite que las concentraciones relativas y los perfiles espectrales de las muestras individuales se puedan extraer directamente. Esto permite la corrección de las contribuciones de los componentes no modelados explícitamente en las muestras.

A esta propiedad se la ha llamado “ventaja de segundo orden”[2]. Esta propiedad la poseen los modelos, análisis en factores paralelos (parallel factor analysis)(PARAFAC)[3] y el método de descomposición trilineal alternada ponderada (self-weighted alternating trilinear decomposition)(SWATLD)[4]. Las EEMs, combinadas con estos métodos quimiométricos, se han utilizado para el análisis cuantitativo de distintos componentes en muestras biológicas y ambientales. Así, se han propuestos varios métodos para el análisis cuantitativo de clorofilas y feopigmentos [5], compuestos antitumorales [6], antiinflamatorios [7], anticonvulsivos [6] y antibióticos [8,9]. Hay que indicar también que las aplicaciones de estos dos métodos al análisis de alimentos es muy escasa [10,11].

En este Capítulo, se aplican los métodos PARAFAC y SWATLD a la determinación de sulfatiazol en miel, utilizando por primera vez matrices de fluorescencia de excitación-emisión inducidas fotoquímicamente (PIF-EEMs), en combinación con métodos de calibración multivariante de segundo orden. Los resultados se comparan con los obtenidos mediante el análisis de los datos de tres vías usando mínimos cuadrados parciales N-dimensionales (N-PLS)[12], así como datos de dos vías por PLS. Encontramos que éstos dos últimos métodos permiten la determinación de sulfatiazol en muestras sintéticas en ausencia de miel. Sin embargo, con ellos se obtienen predicciones erróneas cuando la matriz de miel está presente, debido al hecho de que estos métodos no poseen la “ventaja de segundo orden”.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE PRIMER ORDEN

Se denominan *señales univariantes* a las señales analíticas que se miden en un determinado método instrumental en función de una única variable controlada. Se denomina calibración univariante a la que se basa en la construcción de una relación entre dos variables x é y , de manera que y se emplea para predecir x . Reciben el nombre de *señales multivariantes* aquellas que se miden en función de dos o más variables controladas. Así, la información que se puede obtener de las señales univariantes

resulta bastante limitada, en comparación con las posibilidades más extensas que poseen las señales multivariantes.

Mediante los métodos de calibración multivariante [13,14] es posible obtener información cuantitativa selectiva a partir de datos poco selectivos, posibilitándose la determinación simultánea de diversos componentes en muestras complejas [15-21]. Esta posibilidad se traduce en que el tratamiento previo de la muestra se reduce al mínimo, lo que, a su vez, determina tiempos de análisis más cortos, aspectos ambos de gran importancia en los análisis de rutina o de control sobre gran cantidad de muestras análogas.

El gran número de monografías y trabajos sobre el tema pone de manifiesto el especial interés que los métodos de calibración multivariante han suscitado en las épocas más recientes. El desarrollo de instrumentos analíticos que permiten adquirir un gran conjunto de señales en periodos cortos de tiempo, así como la popularización de la utilización de ordenadores y potentes paquetes de software han permitido el gran auge de dichos métodos de calibración.

Una de las principales ventajas de la calibración multivariante es la minimización de la manipulación de las muestras. Los métodos univariantes requieren, en la mayoría de los casos, complejos procesos previos a la adquisición de la señal que, generalmente, conllevan procesos de separación, con el consiguiente consumo de tiempo, posible contaminación de las muestras y, en muchos casos, pérdida de sensibilidad, posibilitando, en la mayoría de los casos, la determinación cuantitativa de un único componente en una muestra compleja. Sin embargo, la utilización de métodos de calibración multivariante posibilita el análisis de más de un componente de interés en sistemas complejos reales de forma más directa.

Los métodos de calibración multivariante actualmente de mayor implantación en el análisis, son los siguientes:

- **Aplicables a sistemas lineales:** a) Regresión lineal múltiple (**MLR**); b) Análisis multicomponente clásico (Classical Least Squares, **CLS**); c) Regresión inversa por mínimos cuadrados (Inverse Least Squares, **ILS**); d) y Análisis lineal híbrido (**HLA**).
- **Aplicables tanto a sistemas lineales como no lineales** [36-39]: a) Regresión por componentes principales (Principal Component Regression, **PCR**); b) Regresión por mínimos cuadrados parciales (Partial Least Squares, **PLS**). Otros de más reciente incorporación son: a) **ACE** (Alternating Conditional Expectations); b) **LWR** (Locally Weighted Regression); c) **MARS** (Multivariate Adaptive Regression Splines); d) **PPR** (Projection Pursuit Regression); e) **NN** (Neural Networks), de aplicación a sistemas no lineales.

Los procedimientos utilizados se basan en la obtención y almacenamiento de las señales correspondientes a un grupo de muestras patrón, compuestas por mezclas de los componentes a determinar; optimización del modelo de cálculo mediante el uso de las variables apropiadas que afectan al sistema y posterior predicción de las muestras problemas de concentración desconocida.

Las señales analíticas utilizadas pueden ser de diversos tipos tales como: espectros de absorción, emisión o excitación molecular, señales voltamperométricas, señales cromatográficas, etc., e incluso señales de tipo cinético. Dichas señales se manipulan matemáticamente, con el objeto de obtener la información necesaria acerca de la concentración de los componentes. Este proceso se conoce con el nombre de *etapa de calibración*.

Cuando se realiza la calibración se debe especificar el número de componentes que se desean predecir, así como la concentración de cada uno de ellos en los patrones. También se debe elegir la zona de señales que se va a usar en el análisis. Una vez creado el modelo (o matriz) de calibración, se pueden resolver muestras de concentración desconocida. No es necesario especificar el contenido, ni la naturaleza, de aquellas sustancias que, acompañando a los componentes en estudio, pudieran estar presentes como potenciales interferencias, aunque su influencia sobre las correspondientes señales analíticas quedará implícitamente recogida en el modelo de cálculo, siendo posible, por tanto, la modulación de las mismas si se encontraran presentes en las muestras reales a analizar.

Durante la etapa de calibración se busca en primer lugar un modelo de comportamiento entre dos grupos de variables, $y = f(x)$, con objeto de obtener la relación entre ellas, mediante un modelo matemático que se debe ajustar al conjunto de muestras patrón que recibe el nombre de *conjunto de calibración*. Dicho conjunto de calibración debe generar resultados fiables y, para ello, debe contener al menos tantas muestras como componentes queremos determinar y normalmente muchas más. El hecho de emplear mezclas de componentes para la construcción del conjunto de calibración hace que determinadas interacciones entre los analitos puedan modularse mediante modelos PLS y similares.

Para que un modelo de cálculo cubra las expectativas de predicción esperada sobre muestras reales, debe apoyarse sobre un adecuado conjunto de calibración. Es decir, la bondad como herramienta de predicción del modelo va a depender en gran manera del diseño del conjunto de calibración. Dicho conjunto de calibración debe estar compuesto por muestras patrón de mezclas de componentes en concentraciones tales que engloben a los posibles problemas y, por otra parte, distribuidas de forma estadísticamente correcta. Se emplean diversos procedimientos de diseño experimental con este objeto. Se utilizan ampliamente diseños, tales como los denominados central, central compuesto, factorial, etc. La colinealidad es un hecho no deseable dentro de un

modelo, ya que complica el sistema de cálculo sin aportar información útil. También es necesario recordar la necesidad de que la información analítica referente a posibles interferencias esté recogida en el modelo, con objeto de posibilitar su modulación en muestras reales, generando así un procedimiento robusto. La etapa de **predicción**, consiste en predecir el valor de las variables independientes de un conjunto de muestras, **conjunto de predicción**, tras obtener los valores de las correspondientes variables dependientes.

Podemos hacer un tratamiento matemático que nos permita visualizar los diferentes métodos de calibración que actualmente tienen una aplicación más extendida. Considerando un método espectroscópico molecular tal como absorción o fluorescencia, la notación matemática utilizada es la siguiente: las matrices se expresan en mayúsculas y negrilla; los vectores en minúsculas y negrilla, y los escalares en minúscula; para la traspuesta de una matriz se emplea el exponente T, y para la inversa el -1.

Partimos de considerar los datos como formando parte de dos grupos diferentes:

a) Grupo de las respuestas instrumentales correspondientes a **n** diferentes canales de medida o longitudes de onda sobre las **I** disoluciones patrón, que se reúnen dando lugar a la matriz de datos **A**, de dimensiones **lxn**, en donde cada fila corresponde al espectro de cada una de las disoluciones patrón.

b) Grupo formado por las concentraciones conocidas de los **m** componentes en las **I** disoluciones patrón, agrupadas en una matriz **C**, de dimensiones **lxm**, en la que las filas son las concentraciones de los diferentes componentes en el conjunto de calibración. En la etapa de calibración se pretende llegar a conocer la relación entre **A** y **C**, para poder aplicarla al análisis de muestras desconocidas en la etapa de predicción.

❖ **Métodos CLS** (Análisis multicomponente clásico)

Si tenemos dos componentes A y B, siendo, por ejemplo, ambas especies absorbentes, la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda determinada, y considerando las señales aditivas de acuerdo a un buen cumplimiento de la Ley de Beer, vendrá dada por:

$$A_{\lambda_i} = K_{A,\lambda_i} C_A + K_{B,\lambda_i} C_B + E_{\lambda_i} \quad \text{Ecuación 1}$$

siendo: A_{λ_i} , la absorbancia de la mezcla a la longitud de onda λ_i ; K_{A,λ_i} y K_{B,λ_i} , los coeficientes de absorptividad para los componentes A y B a λ_i ; y E_{λ_i} , el error residual entre la absorbancia correspondiente a la línea de mínimos cuadrados y la absorbancia real. La aproximación más sencilla consistiría en utilizar tantas ecuaciones como componentes, sin embargo se suelen emplear más longitudes de onda con objeto de minimizar el ruido, obteniendo un valor promedio de varias señales. Se suele emplear el espectro completo o cualquier otro tipo de señal analítica total, o al menos toda aquella parte de la señal que proporcione información diferencial entre los componentes a determinar.

Como consecuencia de lo anterior, el elevado número de ecuaciones aconseja el tratamiento matricial de las mismas. Las ecuaciones empleadas se pueden expresar como:

$$A(n, m) = K(n, l) C(l, m) + E(n, m) \quad \text{Ecuación 2}$$

donde \mathbf{n} es el número de canales usados; \mathbf{l} es el número de componentes de las mezclas y \mathbf{m} es el número de espectros del conjunto de calibración. Por tanto, las columnas de la matriz \mathbf{A} son las señales para cada canal (por ejemplo, absorbancias a las longitudes de

onda seleccionadas para cada espectro) del conjunto de calibración; las columnas de **K** son los coeficientes de proporcionalidad (por ejemplo, coeficientes de absorptividad) para cada uno de los componentes a cada canal (a cada longitud de onda) y las columnas de **C** son las concentraciones de los componentes de la mezcla para cada una de las muestras empleadas en el conjunto de calibración.

Mediante álgebra matricial se resuelven los sistemas de ecuaciones, obteniéndose así la matriz estimada de los coeficientes de absorptividad, **K**, (**Matriz K**) la cual se utilizará para la predicción. Es necesario incluir la información referente a cualquier causa de interferencia tanto química como instrumental, siendo ésta la mayor limitación del método. La omisión de la concentración de cualquier componente o interferencia hará que el modelo realice una modulación incorrecta y, como consecuencia, las predicciones serán a su vez incorrectas. Este tipo de modelo, reciben el nombre de modelos **rígidos**.

❖ **Método ILS** (Regresión inversa por mínimos cuadrados).

Cuando se analizan muestras reales, en muchas ocasiones no es posible conocer la composición completa de las mismas y, aunque se conozca la información referente a determinados componentes, puede no tener interés su determinación, por lo cuál su inclusión en el modelo solo logra complicar el cálculo sin aportar datos analíticos relevantes. Entonces, considerando el caso de componentes absorbentes, nos podemos plantear la ley de Beer en su denominada forma invertida donde: $C = A P + E$; siendo **C** y **A** los parámetros anteriormente mencionados, mientras que **P** es una matriz de los coeficientes de calibración desconocidos de los **m** componentes de las mezclas a las **p** longitudes de onda utilizadas y **E** es una matriz de errores aleatorios de concentración o residuales que no se ajustan al modelo. La concentración es función de la absorbancia a las longitudes de onda establecidas y, como consecuencia, este modelo resulta invariante respecto al número de componentes que se incluyan. Se puede calcular la

matriz de coeficientes **P**, incluso sin conocer las concentraciones de todos los componentes.

Este tipo de proceso de calibración, es denominado **ILS** (o de **Matriz P**). Sus limitaciones fundamentales derivan del hecho de tener que usar un número de canales igual como máximo al número de patrones usados en el conjunto de calibración, con objeto de mantener la dimensionalidad de la matriz, y por otra parte, evitar la colinealidad.

Descomposición espectral

La necesidad de obtener una representación simplificada de los datos que sea representativa de la información englobada en ellos, se puede llevar a cabo mediante un proceso denominado *descomposición espectral*, aunque de forma general dicho procedimiento pueda ser aplicado a cualquier tipo de señal, y pudiendo denominarlo descomposición voltamperométrica, descomposición cromatográfica, etc...

❖ Análisis por Componentes Principales (PCA).

De entre los métodos más utilizados, quizás sea el más popular y, el algoritmo de descomposición espectral más ampliamente utilizado para llevarlo a cabo, es el algoritmo NIPALS (non linear iterative partial least-squares).

El proceso de descomposición se puede esquematizar indicando los pasos que el algoritmo matemático realiza, sobre el conjunto de calibración creado, en la forma ya descrita. En primer lugar, calcula el espectro medio, con los espectros de las muestras que componen el conjunto de calibración. A continuación, lo compara con cada uno de los espectros individuales del conjunto de calibración y crea un espectro nuevo, que es la diferencia entre el espectro medio y el individual a cada longitud de onda, este

espectro diferencia recibe el nombre de vector director o *vector loading*. Posteriormente, calcula la cantidad de vector loading que le corresponde a cada espectro individual en la calibración y al valor resultante se le denomina escalar o *score*. Calcula la contribución del loading a cada espectro de la calibración y la sustrae de cada espectro individual. Los espectros obtenidos los sustituye en los datos originales y, a continuación vuelve al paso primero y repite el proceso.

Así, cualquier espectro de una mezcla se puede reconstruir a partir de un mismo número de *loadings* y se diferencian unos de otros en las cantidades de los mismos que se adicionan, es decir, en los *scores*.

El método PCA o Análisis de Componentes Principales (Principal Component Analysis) [40-42] se puede desglosar matemáticamente como una descomposición de la matriz **A** de rango **m**, en una suma de matrices de rango **1** según:

$$A = M_1 + M_2 + M_3 + \dots + E_A \quad \text{Ecuación 3}$$

de modo que cada una se pueda escribir como producto de dos vectores: un vector *score* t_1 y un vector *loading* p_1 : $A = t_1 p_1^T + t_2 p_2^T + t_3 p_3^T + E_A$ o bien en la forma equivalente: $A = T \cdot P^T + E_A$

Es decir, la matriz **A** se expresa en un nuevo sistema ortogonal de variables en el que los *scores* (T) representan las coordenadas de cada punto en el nuevo sistema, y los *loadings* (P), los cosenos directores de los nuevos ejes respecto a los anteriores. Así, se pueden relacionar con las concentraciones y con los espectros de los compuestos, respectivamente.

Tanto PCR como PLS, que se tratarán seguidamente, utilizan una etapa de PCA en la descomposición factorial.

❖ Método PCR o regresión por componentes principales

PCR puede considerarse como un método híbrido, que combina algunas ventajas de los métodos CLS e ILS. En el caso más simple de una mezcla de dos componentes, sólo habría, idealmente, dos variables independientes, por lo que el espectro de la mezcla podría ser reconstruido sumando los espectros de los componentes puros.

Realmente, esto no ocurre, ya que generalmente se producen variaciones instrumentales y errores inherentes al muestreo, así como posibles cambios en la línea de base y ruido en el detector. Además, hay que considerar que las posibles interacciones entre los dos componentes puros pueden producir productos intermedios o, simplemente, cambio en el desarrollo del espectro de algún componente respecto a su estado puro. Sin embargo, habrá un número finito de “espectros” matemáticos, que varían de manera independiente, que pueden ser sumados para reconstruir nuestros datos (espectros experimentales). Si estos “espectros” son calculados de algún modo, podrían usarse para reconstruir los espectros “desconocidos” correspondientes a muestras problemas, multiplicando cada “espectro” por un factor de escala y sumando los resultados, de manera que el nuevo espectro se aproxime notablemente al espectro del problema.

Estas fracciones son conocidas como *scores* o contribución espectral y los “espectros” son conocidos como *loadings*, *vectores loading* o *factores*. Este proceso reduce mucho la complejidad de nuestros datos ya, que a partir de un pequeño número de *vectores loading* y de *scores*, se puede reconstruir un problema dado.

El modelo PCR, al igual que PLS, utilizan el método factorial PCA, para extraer información analítica relevante de la matriz de datos de calibración.

La matriz de datos **A (m,n)**, que se obtiene mediante el registro de la señal analítica, de **m** mezclas de composición conocida, a **n** diferentes longitudes de onda, se ordena según la siguiente expresión matricial:

$$A(m,n)=T(m,h) B(h,n) + E(m,n) \quad \text{Ecuación 4}$$

donde **T(m,h)** es la matriz de escalares (scores), **B(h,n)** es la matriz de vectores loadings, y **E(m,n)** la matriz de errores espectrales residuales, siendo **h** el número de componentes principales.

De acuerdo con lo anterior, para un determinado componente, en la etapa de calibración tenemos:

$$c(m,1)=T(m,h) v(h,1) + e_c(m,1) \quad \text{Ecuación 5}$$

donde **v** es el vector de coeficientes (**hx1**), que relaciona los escalares (scores), con las concentraciones **c**, de los analitos, en cada una de las disoluciones de mezclas patrón de la matriz de calibración y **T(m,h)** es la matriz de escalares (scores).

❖ **Método PLS o mínimos cuadrados parciales**

Este método se basa, al igual que PCR, en el análisis mediante PCA, pero se diferencia en que, mientras que este último sólo utiliza la información contenida en la matriz de señales a cada canal, el algoritmo de PLS utiliza además la información contenida en la matriz de concentraciones, contribuyendo en mayor cuantía los espectros que corresponden a mayores concentraciones. Este método presenta la ventaja que permite calibrar, predecir y estudiar estadísticamente los residuos en forma separada para cada componente de una muestra, y es ideal para muestras en los que los componentes tienen intensidades espectrales muy diferentes.

A diferencia de PCR, en PLS existes dos clases de factores espectrales, unos que podíamos denominar factores espectrales o *loading sopesados*, que compondría una matriz \mathbf{W} , y otros llamados simplemente factores espectrales o *loading contenidos* en \mathbf{B} . Los elementos de \mathbf{W} dependen de las concentraciones de calibración del analito de interés. La matriz de *scores* se denomina \mathbf{T} .

Se podría demostrar que el coeficiente de regresión en PLS (\mathbf{b}_k) es función de \mathbf{W} , \mathbf{B} , \mathbf{T} y la concentración de interés \mathbf{c}_k

Durante la etapa de calibración, el método de regresión parcial por mínimos cuadrados (PLS), utiliza no sólo la información contenida en la matriz \mathbf{A} , sino también la contenida en la matriz de concentraciones (matriz \mathbf{C}) de manera que, al mismo tiempo, se utilizan las columnas de \mathbf{C} para estimar los *loadings* de \mathbf{A} y las columnas de \mathbf{A} para estimar los *loadings* de \mathbf{C} .

$$\begin{aligned} \mathbf{A} &= \mathbf{T}_A \cdot \mathbf{B}_A^T + \mathbf{E}_A \\ \mathbf{C} &= \mathbf{T}_C \cdot \mathbf{B}_C^T + \mathbf{E}_C \end{aligned} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde \mathbf{T}_A y \mathbf{T}_C son las matrices de los *scores* de la matriz de medida \mathbf{A} y de la matriz de concentraciones \mathbf{C} , respectivamente, \mathbf{B}_A y \mathbf{B}_C son las respectivas matrices de *loadings*, y \mathbf{E}_A y \mathbf{E}_C representan los errores de \mathbf{A} y de \mathbf{C} del modelo.

En un modelo simplificado, los *scores* de cada matriz se calculan por separado y, si las fuentes de variación de \mathbf{A} y de \mathbf{C} fuesen idénticas, también lo serían las correspondientes matrices de *scores*, pero en la mayoría de los casos se encuentra que los *scores* de ambas matrices están relacionados por la llamada relación interna (\mathbf{r}): $\mathbf{t}_C = \mathbf{r}\mathbf{t}_A + \mathbf{e}$.

Esto indica que los *scores* t_A no son los óptimos para estimar **A**, al haber sufrido cierta rotación para describir simultáneamente la matriz **C**.

La descomposición y regresión se puede realizar de forma conjunta para todos los componentes, optimizándose lo que se podría considerar como un valor medio del número de factores, mediante la aplicación de la modalidad **PLS2**. Sin embargo, en el caso de que la optimización y descomposición se haga para cada componente individualmente, el método se designa **PLS1**. Teniendo en cuenta la rapidez de cálculo actual mediante los ordenadores habituales, la aplicación de **PLS2** no tiene grandes ventajas frente a la aplicación de **PLS1**. Por otra parte, hay que tener en cuenta que cuando el número de factores optimizado para los distintos componentes es el mismo, ambos tratamientos son idénticos y arrojan los mismos resultados. **PLS2** se puede considerar como un algoritmo global cuya aplicación más interesante puede ser el reconocimiento de modelos, mientras **PLS1** resulta más adecuado para análisis cuantitativo.

Los algoritmos correspondientes a los métodos PCR y PLS [22-32] pueden modificarse para conseguir que ambos métodos, que asumen un modelo lineal, puedan aplicarse al análisis multivariante no lineal [33].

Optimización del número de factores (loadings)

El número de factores que debemos emplear para optimizar un modelo, debe ser tal que garantice la adecuada resolución del problema. Si se emplea un número inferior al óptimo se obtendría un empobrecimiento de las predicciones y si, por otra parte, se incluyen demasiados, se podría estar modelando el denominado ruido del sistema, lo que conllevaría a un *sobreajuste* y la consiguiente pérdida de exactitud en los resultados.

Se emplean diversos criterios estadísticos con el objeto de evitar los inconvenientes mencionados. La utilización del denominado parámetro **PRESS** (Prediction Residual Error Sum of Squares), suele estar recomendada en la bibliografía especializada.

Podemos considerar que para cada modelo generado con un determinado número de *loadings*, el PRESS se puede expresar como:

$$\text{PRESS} = \sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (\hat{C} - C_i)^2 \quad \text{Ecuación 7}$$

siendo n = número total de muestras empleadas en la calibración; m = número total de componentes en la mezcla, \hat{C} = concentración calculada, y C_i = concentración de referencia.

Experimentalmente, el PRESS se obtiene mediante el siguiente procedimiento:

- ✓ De todos los patrones del conjunto de calibración, se prescinde de un cierto número, generalmente solo uno y, con los restantes, se realiza la descomposición espectral con un solo factor. Se calcula la matriz de calibración mediante regresión.
- ✓ Con dicha matriz, se determina la concentración de la muestra (o las muestras) anteriormente desechadas.
- ✓ Se calcula la diferencia entre la concentración predicha con dicha matriz, y la que teóricamente tiene la muestra (concentración puesta), y se obtiene la raíz cuadrada de esta diferencia (residuo sin modular).
- ✓ A continuación, se deja fuera otra muestra distinta y se repite el proceso. Así, sobre cada una de las muestras que constituyen el conjunto de calibración.

- ✓ Como cada muestra es dejada fuera, se añade la raíz cuadrada del error residual calculado a todos los errores previos.
- ✓ Se repite el mismo proceso tantas veces como factores se ensayan.

El valor de PRESS nos da una medida de lo bien que una matriz de cálculo (calibración) está determinando la concentración para cada número de factores tenidos en cuenta. Cuanto más factores se tienen en cuenta, el error de predicción disminuye. En principio, el número de factores óptimo debería ser aquel que proporciona el mínimo valor de PRESS. En algunos casos se producen mínimos para volver a aumentar ligeramente después. En esta situación, se considera que el modelo comienza a añadir *vectores de ruido*.

Incluir demasiados vectores o vectores de ruido se denomina *sobreajuste*. Incluso se produce sobreajuste cuando se optimiza el número de factores para el mínimo PRESS, ya que el número de factores óptimos deberá ser realmente aquel que introduce en el sistema un aumento de la capacidad predictiva estadísticamente mejor que cuando se emplea un número inferior. Por lo tanto, se debe recurrir a un tratamiento estadístico de los resultados que ponga este hecho de manifiesto.

Una propuesta de solución a este problema ha sido señalada por Haaland y Thomas [34], de manera que los valores mínimos de PRESS se comparan con aquellos obtenidos con un número de factores menor que el que produce el mínimo PRESS, haciendo uso del parámetro estadístico F. La estadística F realmente se emplea para comparar dos series de concentraciones, las calculadas mediante la aplicación del número de factores que generan el mínimo PRESS, denominado h^* , y las concentraciones calculadas usando un número inferior de factores denominado h . Según disminuyen las diferencias entre el mínimo valor de PRESS y los otros valores, también disminuye la probabilidad de que cada nuevo factor añadido sea significativo.

Todos los modelos con un número de factores $h < h^*$ se comparan con el de referencia, h^* . Con ello se pretende encontrar el modelo más simple (de menor número de factores), que genere un valor de PRESS estadísticamente indistinguible del generado por el modelo que emplea h^* factores

Se expresa $F(h)$ como $\text{PRESS}(\text{modelo con } h \text{ factores}) / \text{PRESS}(\text{modelo con } h^* \text{ factores})$, siendo $h = 1, 2, 3, \dots, h^*$. Se elige como número óptimo de factores el menor h que cumple $F(h) < F_{\alpha, rr}$, siendo $F_{\alpha, rr}$ el $(1-\alpha)$ por ciento de la probabilidad F de Snedecor con m grados de libertad, siendo m el número de muestras del conjunto de calibración.

Haaland y Thomas [34] determinaron empíricamente que un valor de $(1-\alpha)$ de 0.75 es una buena elección como criterio de significación, de manera que se selecciona como óptimo el número de factores correspondientes al primer valor del PRESS cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75.

La determinación del número de factores óptimos es la etapa más importante del análisis, la que requiere mayor atención. En muchos casos no es posible la asignación de la naturaleza de dichos factores. Sin embargo, si pueden ser atribuidos aquellos que tienen una relación directa con la concentración de los componentes e incluso aquellos debidos a interacciones entre los componentes que afectan a sus concentraciones [35,36]. También pueden ser atribuidos a factores de tipo instrumental, tales como, deriva de la línea base, de la respuesta del detector y de la fuente a lo largo del tiempo, ya que el proceso de ajuste a cero, en muchas ocasiones, sólo se realiza al inicio del análisis. Para asignar la naturaleza de dichos factores se recurre a un profundo examen del perfil de los loading obtenidos y comparación con los espectros de los componentes puros y sus mezclas, así como, a la evaluación del valor de los scores y su relación con las concentraciones (o relaciones entre las concentraciones), de los componentes del conjunto de calibración (análisis cluster).

El grado de ajuste entre los valores calculados y los teóricos de un modelo se expresa a través de diferentes parámetros estadísticos. Así, si consideramos $\mathbf{x}_i = \hat{\mathbf{x}}_i + \mathbf{e}_i$, donde \mathbf{x}_i es el valor teórico; $\hat{\mathbf{x}}_i$, el calculado, y \mathbf{e}_i el error cometido en el cálculo, podemos calcular la desviación estándar media residual, RMSD (*Residual mean standard deviation*) que es la raíz cuadrada de las desviaciones medias,

$$\text{RMSD} = \sqrt{\frac{\sum_i (\mathbf{x}_i - \hat{\mathbf{x}})^2}{n}} \quad \text{Ecuación 8}$$

que constituye una medida del error medio cometido en el análisis.

Una vez optimizada la matriz de cálculo teniendo en cuenta el número óptimo de factores, se pueden predecir las muestras desconocidas.

❖ **Comparación de los métodos multivariantes CLS, PCR y PLS**

Se pueden establecer las siguientes conclusiones en cuanto a los métodos multivariantes más comunes citados en esta Introducción.

CLS, PCR y PLS pueden utilizar la información espectral completa y presentan una elevada precisión. Sin embargo, ILS precisa de una selección previa de las longitudes de onda y necesita un gran número de muestras patrón.

CLS necesita toda la información referente a las muestras, causas de interferencias e incluso variables instrumentales. ILS, PCR y PLS no necesitan de un modelo químico explícito de la matriz de respuesta, y permiten la evaluación de las concentraciones de los componentes de interés, aún en presencia de otras causas de variación no explicitadas en el modelo.

Así, PCR y PLS son modelos que no sólo gozan de las ventajas de CLS al ser métodos de espectro completo, sino también de las de ILS en cuanto son capaces de desarrollar el análisis para un componente cada vez, evitando los problemas de la selección de un número limitado de longitudes de onda.

PLS y PCR son aplicables en algunos casos, donde se producen interacciones de tipo químico entre los componentes analizados, y son capaces de modelar comportamientos no estrictamente lineales.

PLS-1 utiliza factores espectrales e información de concentraciones referidas al componente de interés de forma individualizada, a diferencia de PCR.

Además de los métodos de primer orden, también se han utilizado métodos de segundo orden o métodos que utilizan datos de tres vías: PARAFAC, SWATLD y NPLS, por lo que, a continuación, describiremos brevemente la teoría correspondiente al análisis multivariante de segundo orden.

ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE SEGUNDO ORDEN

Tipos de datos analíticos

Cuando una muestra produce un único dato, por ejemplo, la absorbancia a una única longitud de onda, el conjunto de calibración es un vector, que contiene las medidas para I muestras de calibrado. Esta calibración sólo funciona cuando la selectividad de la técnica es total, o sea, cuando hay un único analito activo. La calibración se conoce como de orden cero, atendiendo a que los datos producidos por cada muestra son escalares o tensores de orden cero.

Cuando la muestra produce un vector de datos (tensor de orden uno), como, por ejemplo, un espectro medido a J longitudes de onda, el conjunto de calibración es una matriz (tensor de orden dos, tamaño $J \times I$). Estos datos se analizan con métodos de calibración multivariante de primer orden.

Cuando cada muestra produce una matriz (tensor de orden dos, tamaño $J \times L$), como una matriz de excitación-emisión de fluorescencia, una matriz absorbancia-tiempo obtenida en un cromatógrafo con detector de batería de diodos, etc., el conjunto de calibración es un cubo (tensor de orden tres, tamaño $J \times L \times I$). Los métodos de calibración se conocen como de segundo orden. También se habla de calibración de tres modos o de tres vías, atendiendo al orden tres del cubo de calibrado. En este sentido, la calibración de primer orden se llamaría de dos modos o de dos vías.

Y así sucesivamente, porque no hay límite teórico para el orden. Una muestra puede producir una matriz de excitación-emisión resuelta en el tiempo, lo que sería un dato de cuatro vías (calibración de tercer orden).

En la Tabla III.1 se resumen las diferentes posibilidades

Tabla III.1.- Clasificación de los tipos de datos analíticos y de las calibraciones a las que da lugar.

<i>La muestra produce</i>	<i>Conjunto de calibración</i>	<i>Calibración</i>
Un único dato (escalar)	un vector (datos de 1 vía)	Univariante o de orden cero
Un vector de datos	una matriz (datos de 2 vías)	Multivariante de primer orden
Una matriz de datos	un cubo (datos de 3 vías)	Multivariante de segundo orden
Un cubo de datos	un hipercubo (datos de 4 vías)	Multivariante de tercer orden
Un hipercubo de orden n	Un hipercubo de orden $n+1$ (datos de $n + 1$ vías)	Multivariante de orden n

De forma gráfica, las calibraciones multivariantes de primer orden y segundo orden se pueden representar como se muestra en las Figuras III.1 y III.2:

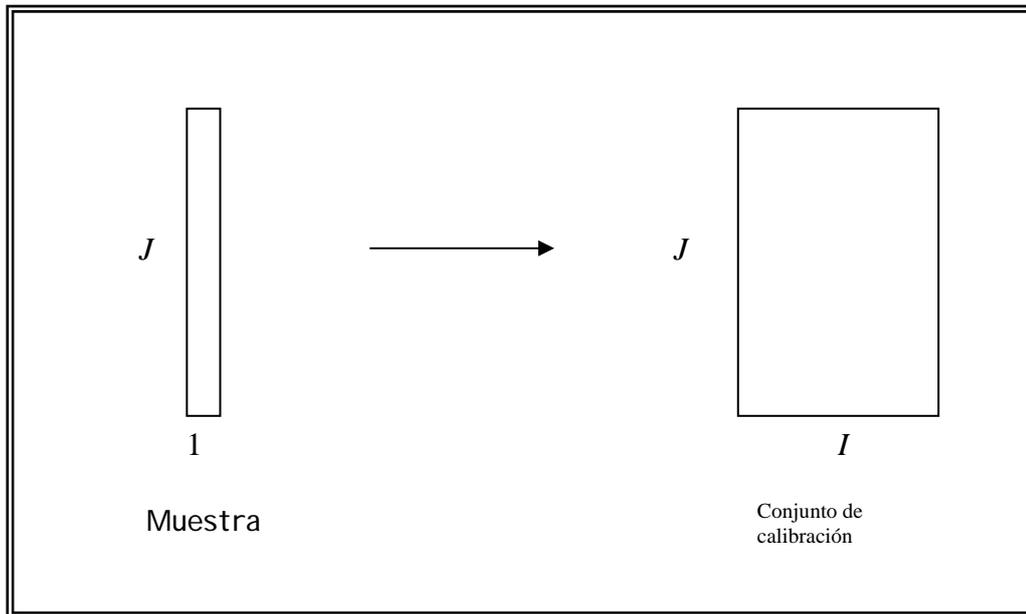


Figura III.1. Esquema de calibración de primer orden

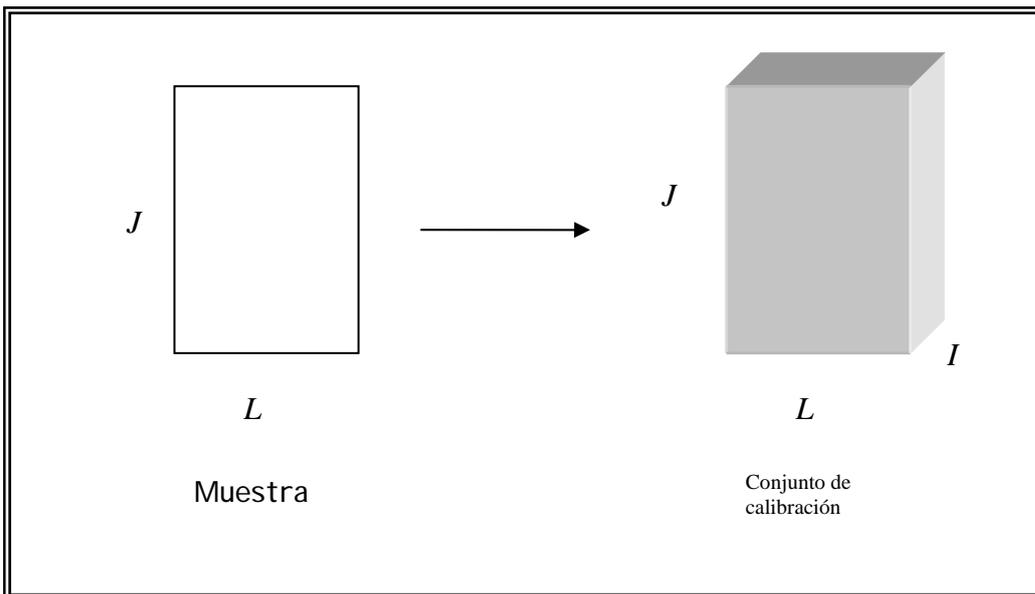


Figura III.2.- Esquema de calibración de segundo orden

En este caso, cada sección del cubo es una matriz de datos para cada una de las I muestras del conjunto de calibración.

Los datos que se obtienen como tensores de orden superior, son especialmente útiles en el análisis cuantitativo de mezclas complejas de multicomponentes y, específicamente, los tensores de tercer orden, o datos de 3 vías, están alcanzando una gran aceptación analítica [36].

Datos multivariantes

Podemos definir a este tipo de datos, como un conjunto de datos que pueden ser organizados del siguiente modo:

$$X_{ijk...} \quad i = 1 \dots I; j = 1 \dots J; k = 1 \dots K \quad \text{Ecuación 9}$$

el número de índices puede ser variable. Con un solo índice se trataría de un conjunto univariante o un vector, con dos índices se trataría de una matriz. Si el número de índices es tres, el grupo de datos puede organizarse como un cubo de datos. Cuando los datos están organizados en forma matricial, hablamos de filas y columnas. Para el caso de datos de tres vías, a los vectores se les denomina tubos. Podemos definir una sub-matriz, haciendo fijo el índice del tercer orden. A esta sub-matriz se la denomina *capa o corte*. Estas capas pueden ser frontales, horizontales y verticales. En tercer orden, cada una de estas direcciones se denomina modos o vías. El número de niveles en cada modo o vía, se denominan dimensión de ese modo o vía.

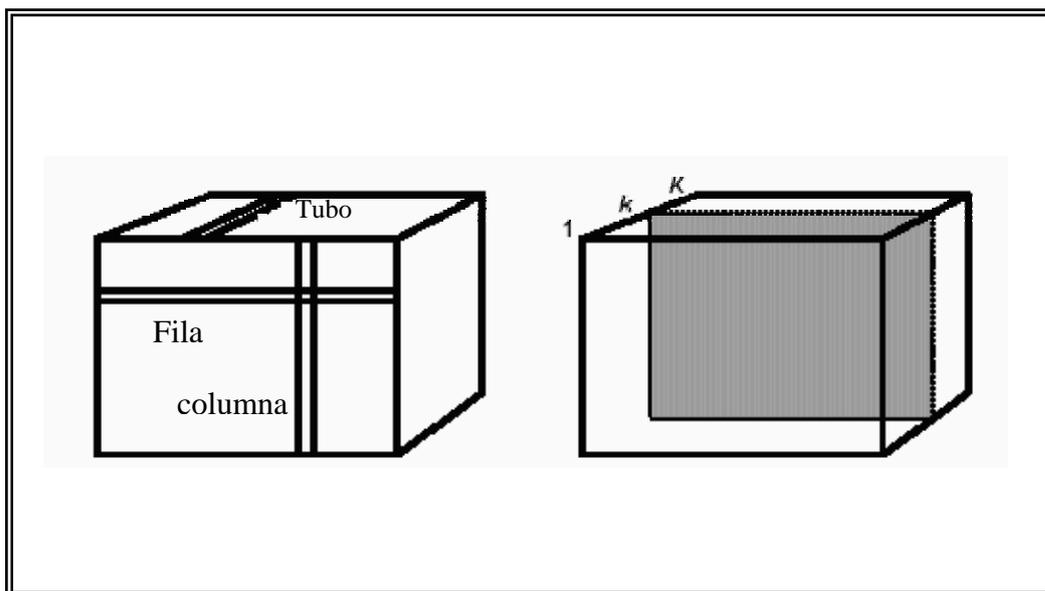


Figura III.3.- Representación esquemática de tubo, fila y columna (izquierda) y capa k -ésima del conjunto de datos (izquierda).

Representaremos a los números escalares en minúsculas e itálicas, x . Los vectores, que generalmente se refieren a vectores columnas, se representarán en minúsculas y negritas, \mathbf{x} . Las matrices las representaremos en mayúsculas y negritas, \mathbf{X} . Finalmente, los datos de orden superior, se representan en mayúscula, negrita y subrayada, $\underline{\mathbf{X}}$. Utilizaremos las letras I , J y K , para indicar las dimensiones de la organización.

Técnica de desdoblamiento (Unfolding)

En el tratamiento de datos de tres vías (calibración de segundo orden) aparece el concepto de desdoblamiento. El término unfolding, puede ser traducido como desdoblamiento o simplemente reorganización. Este método consiste en organizar un conjunto de datos de segundo orden, en una matriz de primer orden. Se trata de ir concatenando matrices de diferentes niveles (Figura III.4).

El proceso de desdoblamiento, se lleva a cabo, principalmente por necesidades computacionales; ya que la forma matricial es la forma más sencilla de introducir datos en una computadora. El objetivo final de desdoblamiento, se logra cuando se consigue ignorar la estructura multi-variable de los datos, y se tratan como un conjunto de datos de dos vías. Este procedimiento es el que utiliza el método denominado PLS desdoblado (unfolded-PLS). Los primeros trabajos que utilizaron datos de tres vías, en combinación con métodos de calibración multivariante, utilizaban este método, cuando aún no estaban disponibles y/o popularizados los métodos de calibración multivariante de segundo orden de que hoy disponemos [36].

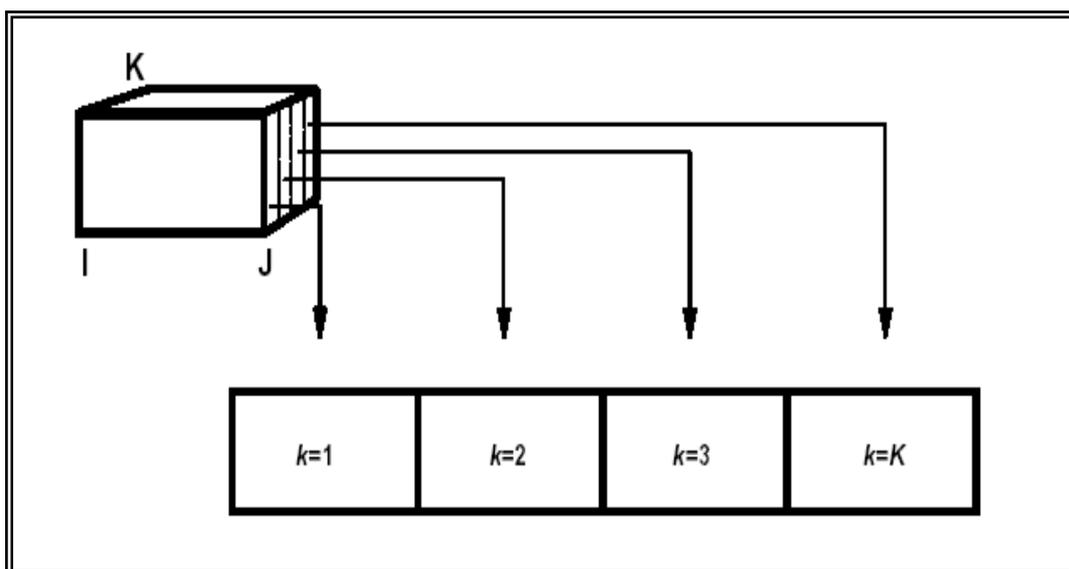


Figura III.4.- Representación gráfica del concepto de unfolding

Modelos trilineales

En esta introducción haremos un resumen de los diversos modos de modelos de calibración multivariante de segundo orden.

Un modelo es una aproximación de un conjunto de datos, por ejemplo, la matriz $\hat{\mathbf{X}}$ es un modelo de los datos contenidos en la matriz \mathbf{X} .

A la hora de establecer un modelo, es muy importante llevar a cabo un análisis de los datos; lo cual nos permitirá fijar tanto la estructura básica, como las posibles restricciones a aplicar al modelo. Una mala elección de estos parámetros, puede incidir en unos malos resultados del modelo en el análisis de los datos y, por tanto, en el propósito del trabajo.

Las estructuras de los modelos, que vamos a describir seguidamente, son lineales. Fijando todo un grupo de parámetros, excepto uno, conduce a un modelo lineal en los parámetros no fijados. En un determinado modelo se pueden aplicar restricciones. Esto se hace por diversas razones; para identificar al modelo o para asegurar que los parámetros del modelo son razonables, es decir, que están conformes con un conocimiento previo del problema.

La unicidad es un concepto importante en el análisis multivariante. Que un modelo sea estructuralmente único indica que no es necesario definir más restricciones para identificar a ese modelo. Para un modelo con estructura única, no podemos modificar los parámetros sin que cambie el modelo.

PARAFAC

PARAFAC, (PARAllel FACtor analysis), es un método de descomposición, que puede ser comparado con el modelo bilineal PCA. Fue propuesto de forma independiente en 1970 por Harshman [37] y por Carroll y Chang[38], quienes renombraron a este modelo como CANDECOMP (Canonical Decomposition). Inicialmente surge como un método de análisis multivariante en el campo de la psicometría.

Para el caso del análisis de datos de tres vías, la descomposición de datos se hace en triadas o componentes trilineales. En lugar de un vector loading y un score, como en PCA; cada componente consiste en un vector score y dos vectores loading.

Una importante diferencia entre PARAFAC y PCA, es que en PARAFAC no es necesario fijar la condición de ortogonalidad para definir el modelo.

Estructura

La estructura del modelo se puede definir basándose en una estructura bilineal.

$$\hat{\mathbf{x}}_{ij} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \quad \text{Ecuación 10}$$

Este modelo viene dado por las tres matrices loading, \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} , con sus elementos \mathbf{a}_{if} , \mathbf{b}_{jf} y \mathbf{c}_{kf} .

$$\hat{\mathbf{x}}_{ijk} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_{if} \mathbf{b}_{jf} \mathbf{c}_{kf} \quad \text{Ecuación 11}$$

Utilizando el producto de Kronecher, el modelo puede escribirse como:

$$\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)} = \sum_{f=1}^F \mathbf{a}_f (\mathbf{c}_f^T \otimes \mathbf{b}_f^T) \quad \text{Ecuación 12}$$

donde $\hat{\mathbf{X}}^{(I \times JK)}$ es el modelo de tres vías descompuesto en una matriz de $I \times JK$; \mathbf{a}_{if} , \mathbf{b}_{jf} y \mathbf{c}_{kf} , son las f -ésimas columnas de las matrices loading \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} . En notación matricial, PARAFAC puede escribirse como:

$$\mathbf{X}_k = \mathbf{A} \mathbf{D}_k \mathbf{B}^T + \mathbf{E}_k \quad \mathbf{k} = 1 \dots K \quad \text{Ecuación 13}$$

donde \mathbf{D}_k es una matriz diagonal que contiene la fila k-ésima de \mathbf{C} en su diagonal, y \mathbf{E}_k es una matriz de residuos.

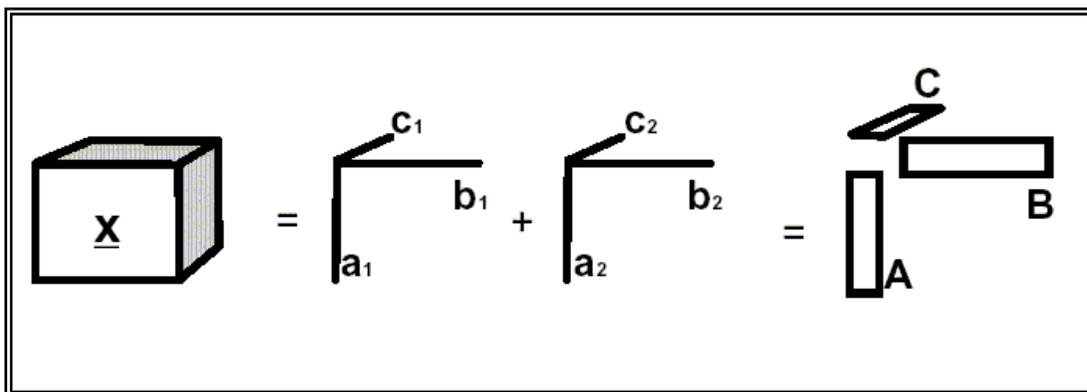


Figura III.5.- Dos componentes del modelo de tres vías PARAFAC, para una organización de tres vías de datos \underline{X} . (En la figura se ha omitido la matriz E para simplificar el gráfico)

En la expresión matricial, expresada en la ecuación 13, el modelo PARAFAC parece indicar que los diferentes modos del sistema son tratados de diferente forma. Sin embargo, PARAFAC, es un modelo simétrico, en el sentido en que si, por ejemplo, una vez establecido un determinado orden, se intercambian el primer modo por el tercero y viceversa, PARAFAC será idéntico para los dos conjuntos de datos, excepto que el vector loading tres habrá pasado a ser el número uno, y al contrario.

En lugar de la expresión matricial mostrada anteriormente, podemos proponer otra expresión matricial más simplificada, introduciendo el denominado producto Khatri-Rao. De acuerdo con esto, PARAFAC puede formularse como:

$$\mathbf{X}^{(I \times J \times K)} = \mathbf{A}(\mathbf{C} \otimes \mathbf{B})^T + \mathbf{E}^{(I \times J \times K)} \quad \text{Ecuación 14}$$

Omitiendo la matriz de los residuos para simplificar, la ecuación del modelo completo puede escribirse como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{AB}^T + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 15}$$

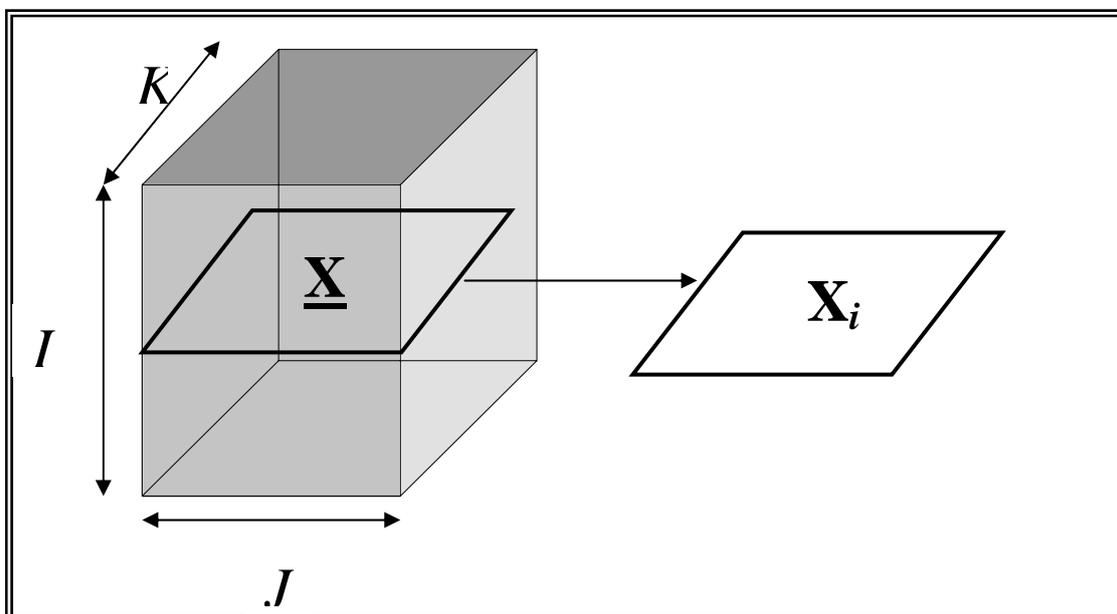


Figura III.6.- Representación esquemática de datos de tercer orden. A la izquierda el cubo de datos tridimensionales y a la derecha una fracción \mathbf{X}_i a lo largo de la dimensión I, es decir, la $J \times K$ EEM para la muestra i .

Unicidad

Una ventaja importante del modelo PARAFAC viene dada por el hecho de que las soluciones que propone a un determinado problema son únicas. En los modelos bilineales existe el problema de la libertad rotacional. En una descomposición espectral, en un modelo bilineal, los vectores loading muestran los espectros puros de los analitos

medidos; pero si se carece de una información externa no es posible encontrar estos espectros puros, debido a los problemas rotacionales mencionados. Este hecho, ha motivado que se propongan nuevos métodos, más interpretativos que PCA y modelos similares [39-42] (Scarminio y Cubista 1993, Sarabia y col 1993, Faber y col. 1994).

En PARAFAC no encontramos estos problemas que surgen en los modelos bilineales, ya que en la mayoría de los casos el modelo es único, no siendo necesario un procesado posterior de los resultados. Además, este modelo es el mejor en el sentido de ajuste por mínimos cuadrados. Si los datos son aproximadamente trilineales, podemos determinar el fenómeno que se produce realmente, si empleamos un número correcto de factores y una apropiada relación señal-ruido [43-46] (Harshman 1972, Kruskal 1976-1977). Este hecho fue el que motivó a Harshman a desarrollar la idea de Cattell [47] (1944) de los perfiles paralelos proporcionales. Existen muchos ejemplos en los que PARAFAC coincide con un fenómeno físico. Por ejemplo, fluorescencia de excitación-emisión, cromatografía con detección espectral, etc. En la Figura III.7 podemos ver un ejemplo del carácter de unicidad que tiene PARAFAC en un ejemplo de fluorescencia.

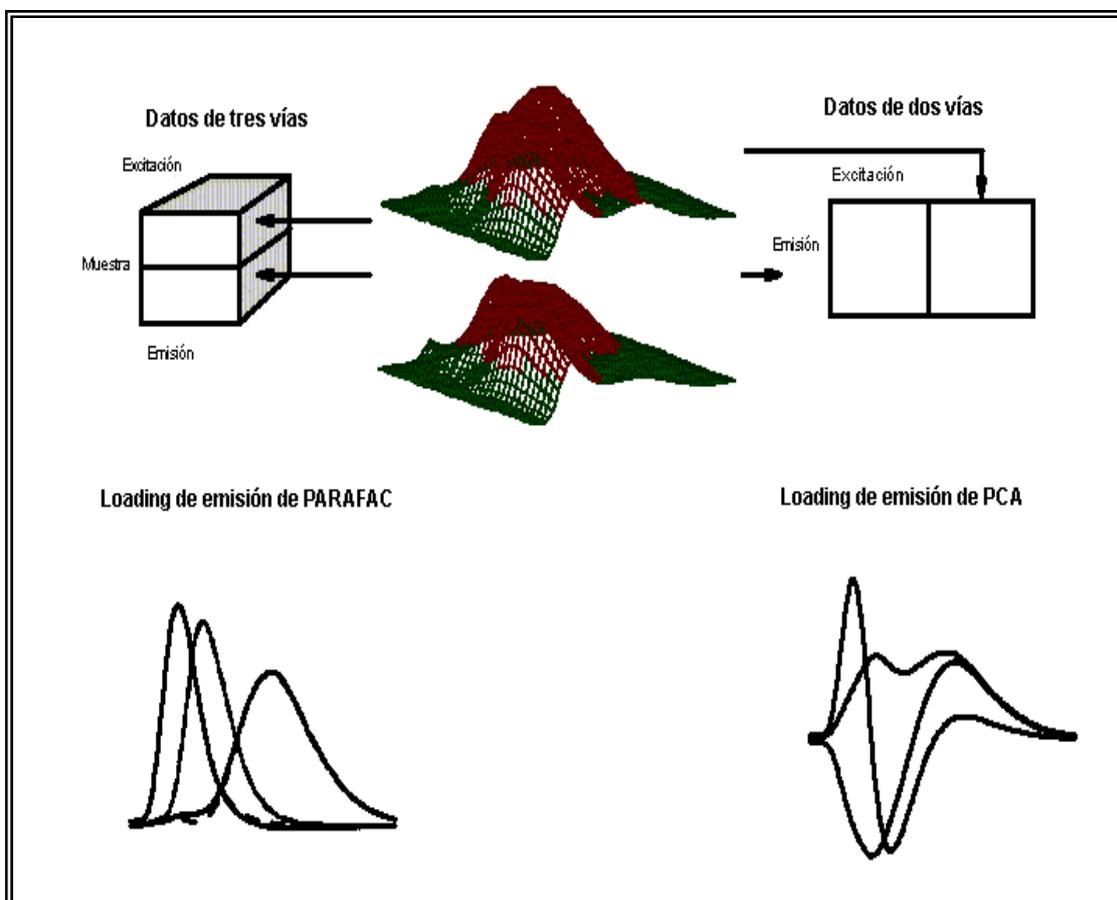


Figura III.7.- Dos muestras diferentes de tres analitos, a las que se han registrado los espectros de excitación-emisión fluorescentes, dando lugar a dos matrices de datos diferentes. Este conjunto de datos puede organizarse para formar un conjunto de datos de tres vías (izquierda), o descomponerse y formar un conjunto de datos de dos vías (derecha).

Regresión multilineal por mínimos cuadrados parciales (n-PLS)

Anteriormente hemos indicado el fundamento del algoritmo basado en mínimos cuadrados parciales (PLS) para señales de primer orden, pero dicha función puede ser extendida a señales de segundo orden.

Para ello, podemos comenzar considerando los modelos de dos vías. Se pueden describir considerándolos en dos pasos. Para cada componente se construye un modelo de una línea de ambos X e y . Entonces, estos modelos se sustraen desde X e y , y se forma un nuevo grupo de componentes de los residuales. El cálculo de los componentes es la parte esencial del algoritmo, y puede ser considerado como un problema de determinación de los vectores de peso, \mathbf{w} , para maximizar una determinada función.

Para calcular un componente mediante PLS de dos vías, el modelo para un componente se puede expresar de la forma: $\hat{x}_{ij} = t_i w_j$ donde t s son scores y w s pesos.

Para un determinado \mathbf{w} , \mathbf{t} se puede calcular por mínimos cuadrados como: $\mathbf{t} = \mathbf{X} \mathbf{w}$;

o bien usando la expresión sumatoria: $t_i = \sum_{j=1}^J x_{ij} w_j$

La ecuación para encontrar el primer componente como:

$$\max_{\mathbf{w}} \left[\text{cov}(\mathbf{t}, \mathbf{y}) \mid t_i = \sum_{j=1}^J x_{ij} w_j, \|\mathbf{w}\|_F^2 = 1 \right] \quad \text{Ecuación 16}$$

Esta expresión permite encontrar un vector \mathbf{w} , que genera un vector score \mathbf{t} , que presenta máxima covarianza con \mathbf{y} . La covarianza entre \mathbf{t} e \mathbf{y} puede ser también expresada mediante una función sumatoria.

Como \mathbf{X} e \mathbf{y} son conocidos de antemano la sumatoria de i se puede hacer antes del cálculo de \mathbf{w} . Esta sumatoria da un vector $J \times 1$, denominado \mathbf{z} de manera que

$$\max_{\mathbf{w}} \left[\sum_{j=1}^J z_j w_j \mid \|\mathbf{w}\|_F^2 = 1 \right]$$

Cuando \mathbf{w} es un vector unitario en la misma dirección que \mathbf{z} , \mathbf{w} se puede calcular como:

$$\mathbf{w} = \frac{\mathbf{z}}{\|\mathbf{z}\|_F} = \frac{\mathbf{X}^T \mathbf{y}}{\|\mathbf{X}^T \mathbf{y}\|_F} \quad \text{Ecuación 17}$$

Para un sistema de tres vías de variables independientes, el objetivo del algoritmo es hacer una descomposición de $\underline{\mathbf{X}}$ en triadas. Una triada está formada por un score \mathbf{t} y dos vectores de peso; uno en el segundo modo llamado \mathbf{w}^J y uno en el tercer modo llamado \mathbf{w}^K . El modelo de $\underline{\mathbf{X}}$ está dado por:

$$\hat{x}_{ijk} = t_i w_j^J w_k^K; i = 1, \dots, I; j = 1, \dots, J; k = 1, \dots, K$$

Por la misma razón que en PLS, el tri-PLS tiene como objetivo buscar vectores de peso \mathbf{w}^J y \mathbf{w}^K . Estos vectores deben producir la máxima covarianza con \mathbf{y} .

Número de componentes

Es difícil decidir el mejor rango de la mayoría de los modelos multivariantes de varias vías; sin embargo, es necesario para poder construir un buen modelo. Un paso importante y previo debe ser conocer los espectros de los analitos siempre que sea posible. Existen varios modos de afrontar esta decisión: **1.-** Por análisis de residuos; **2.-**

Validación cruzada y **3.-** Diagnóstico de la consistencia del núcleo (Core consistency diagnostic), entre otros.

1.- Las características de un modelo se pueden analizar mediante el análisis de los residuos del modelo. Si el residuo sufre una variación sistemática indica que se deben considerar más componentes. Si una representación de la suma de los cuadrados de los residuos frente al número de componentes, prácticamente alcanza un valor constante para un determinado número de componentes, se puede considerar que se ha alcanzado un número óptimo de los mismos.

2.- La validación cruzada y otros métodos similares se emplean para determinar la dimensión del modelo. Aunque se emplean ampliamente en modelos de dos vías, actualmente están aún en desarrollo en modelos de tres vías [48].

3.- Un nuevo modo denominado **diagnostico de la consistencia del núcleo** o bien en su terminología inglesa aceptada “Core consistency diagnostic” [49] , se aplica al análisis multivariante de tres vías, especialmente a PARAFAC.

La expresión para este parámetro es:

$$Core\ consistency = 100 \left[\frac{1 - \sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F (g_{def} - t_{def})^2}{\sum_{d=1}^F \sum_{e=1}^F \sum_{f=1}^F t_{def}^2} \right] \quad \text{Ecuación 18}$$

Si el modelo optimizado PARAFAC es valido, entonces **G** se aproxima a **T**. Si los datos no se aproximan al modelo, entonces se obtendrá una diferencia sustancial entre **G** y **T**. Siendo **G** la denominada superdiagonalidad y **T** la denominada

superidentidad. La diferencia entre ambas debe ser normalmente pequeña para un modelo.

Desde un punto de vista práctico, si a un grupo de datos modelados mediante PARAFAC se le incrementa de forma progresiva el número de componentes, la superidentidad normalmente disminuye de forma progresiva según aumenta el número de componentes. Después de aplicar el número máximo de componentes apropiados para el modelo, e incluir uno más, la superidentidad disminuye de forma drástica y, a menudo, se genera un abrupto corte cuando se emplean representaciones del valor del “core” en función del número de componentes. De esta forma, el número de componentes ideales para el modelo será el anterior al que genera el salto brusco en el valor del “core”. Generalmente el valor del core estará próximo al 100% y disminuirá bruscamente hasta valores muy pequeños incluso próximos a 0.1. Dicho comportamiento se puede observar en la Figura III.8.

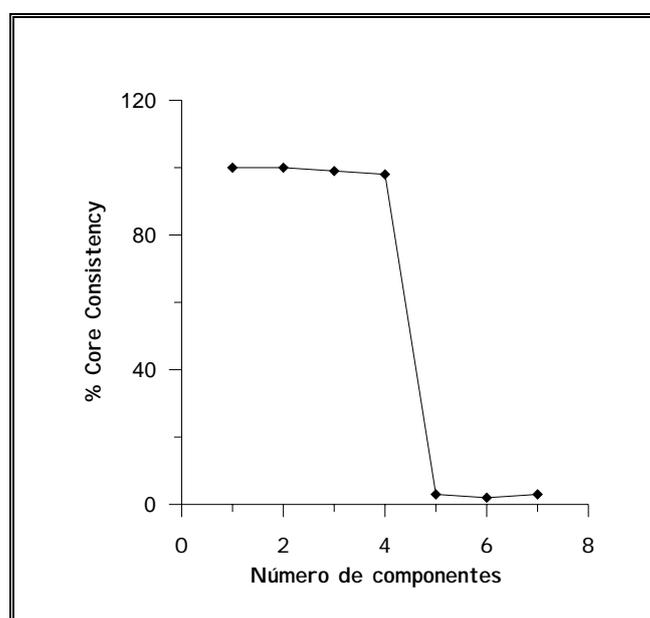


Figura III.8.- Representación del core consistency en función del número de componentes para la determinación de norfloxacino, enoxacino y ofloxacino, en presencia de suero, mediante PARAFAC [50].

Aspectos relacionados con las características de PLS, nPLS y PARAFAC

Todos los algoritmos indicados para análisis multivariante son aplicables a diversos tipos de señales ópticas, eléctricas y cromatográficas.

Sin embargo, mientras que PLS utiliza datos de primer orden para llevar cabo los cálculos, n PLS y PARAFAC emplean datos de segundo orden o más, es decir de tres vías o más. Dichos datos podrían ser los obtenidos a partir de las matrices de excitación-emisión, en el caso de la fluorescencia, o aquellos que derivan de la utilización como tercera vía de la variable tiempo, pudiendo tratarse tanto de fluorescencia, como absorción u otras señales apropiadas.

Sin embargo, aunque n PLS y PARAFAC aprovechan la mayor información espectral y, por tanto, la mayor capacidad diferenciadora de los datos de segundo orden, presentan características distintas que les confieren diferentes capacidades de resolución y, por tanto, diversos campos de actuación.

nPLS, utiliza señales de tres vías, y construye la matriz de calibración mediante mezclas de componentes puros como patrones. Teóricamente, tiene la ventaja frente a PARAFAC de poder modelar comportamientos no lineales y de ser un modelo rápido en los procesos de predicción. Sin embargo, cuando se aplica a la resolución de componentes en presencia de un fondo que presenta amplia señal y gran variabilidad, las predicciones se encuentran sujetas a error. En un caso concreto de análisis, por ejemplo, suero u orina de diversos individuos, la única posibilidad es incorporar a la matriz de calibrado numerosas muestras de suero u orina, si se dispone de ellas, en ausencia de los analitos de interés. Esta forma de actuación tiene la limitación de que nunca realmente se esta disponiendo del fondo, llamemos interferencia, real, que incluso en algunos casos no se puede disponer de ella, y que el número de muestras fondo necesarias para poder aproximarnos a una modelación de dicha interferencia es enorme, en muchos casos 50 o más.

Por tanto, n-PLS previsiblemente podrá ser aplicado favorablemente cuando el fondo sea conocido y constante. Este hecho puede ocurrir, por ejemplo, cuando se pretende su aplicación al análisis de rutina de productos manufacturados de composición previsible y compleja. En estos casos, la optimización de un modelo, con la elevada capacidad de resolución de n PLS y la rapidez de predicción, puede generar procedimientos competitivos incluso con HPLC, de forma similar a como lo hace PLS para sistemas más simples.

En cuanto a PARAFAC, presenta como limitación fundamental que los datos tengan que ser lineales. En cuanto a la velocidad de predicción de las muestras es más lento que PLS, pero este hecho, por otra parte, deriva de lo que podríamos considerar su mayor virtud, la denominada “*ventaja de segundo orden*”.

PARAFAC utiliza para la calibración las mezclas patrón de los componentes de interés pero, además, incluye una a una las muestras problema. De manera que a través de la información obtenida, discrimina entre la información correspondiente a los componentes de interés, contenidos en los patrones, y el resto de la información presente en la muestra problema, que trata como interferencia. Esta forma de operar aunque hace que el proceso sea más lento, nos asegura que el fondo de la muestra está siendo modelado.

Como se ha indicado anteriormente, cuando la estructura de los datos sigue un comportamiento trilineal, podemos proponer un cubo de datos, como la suma del producto tensorial de tres vectores por cada componente. De modo que si \mathbf{A}_n , \mathbf{B}_n y \mathbf{C}_n son la matriz de las concentraciones relativas ($I \times I$, I = número de muestras), perfiles de emisión ($J \times I$, J = número de puntos espectrales) y perfiles de excitación ($K \times I$) respectivamente, para un componente n ; el cubo de datos, \mathbf{R} , puede escribirse como:

$$\mathbf{R} = \sum_{n=1}^N \mathbf{A}_n \otimes \mathbf{B}_n \otimes \mathbf{C}_n + \mathbf{E} \quad \text{Ecuación 19}$$

donde \otimes indica producto tensorial, N es el número total de componentes de respuesta, y $\underline{\mathbf{E}}$ es un término de errores residuales, del mismo tamaño de $\underline{\mathbf{R}}$. Los vectores columnas de \mathbf{A}_n , \mathbf{B}_n y \mathbf{C}_n constituyen las tres matrices loading \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} . Una propiedad de $\underline{\mathbf{R}}$, es que puede ser descompuesta de forma única, para acceder a los perfiles \mathbf{B} y \mathbf{C} , y a las concentraciones relativas (\mathbf{A}), para un componente individual en las I mezclas, haya o no componentes conocidos químicamente.

El algoritmo empleado en PARAFAC esta basado en una minimización mediante el empleo de mínimos cuadrados alternos, mientras que SWALTD utiliza un procedimiento denominado descomposición trilineal alternante. Estos dos procedimientos permiten extraer directamente las concentraciones relativas de un componente individual en presencia de diferentes constituyentes no calibrados. Como hemos indicado anteriormente, a este hecho se le denomina como *ventaja de segundo orden* [50].

En este trabajo que describimos, esta ventaja se ha aprovechado mediante el empleo de un conjunto de calibración externa, junto con la matriz tridimensional de la muestra incógnita, que pasa a formar parte del conjunto de calibración antes de llevar a cabo la descomposición del cubo de datos. En definitiva, la ventaja de segundo orden se ha conseguido construyendo un modelo articulado tanto por las respuestas del conjunto de calibración como por las de predicción.

Cuando se aplica un método de calibración multivariante, hay que tener en cuenta los siguientes etapas: (a) Cómo evaluar la unicidad del modelo, (b) cómo establecer el número de componentes, (b) cómo identificar un componente específico a partir de la información suministrada por el modelo, y (d) cómo calibrar el modelo con objeto de obtener el valor de concentración absoluta para un determinado analito dentro de una muestra incógnita.

Con respecto a la unicidad del modelo, normalmente se comprueba mediante el estudio de los residuos del ajuste por mínimos cuadrados, en definitiva, evaluando la matriz de errores (**E**).

La determinación del número óptimo de factores se realiza analizando el parámetro interno *Core Consistency*, propuesto por Bro. Este parámetro, como ya hemos comentado, presenta un valor cercano a 100 cuando el número de factores es menor o igual al número óptimo; para un número mayor de factores, el valor de consistencia de núcleo cae por debajo del 50 %.

La identificación de los componentes químicos, se realiza mediante la comparación de los perfiles **B** y **C**, con patrones puros.

Finalmente, los valores de concentración absolutos de los analitos se obtienen después de llevar a cabo una correcta calibración; ya que la descomposición del cubo de datos, tan solo nos proporciona valores de concentraciones relativos (**A**). Existen dos modelos diferentes para llevar a cabo esta labor: el método de adición patrón y patrón externo. En ambos casos se explota la ventaja de segundo orden, ya que la muestra problema, que contiene interferencias no modeladas, entra a formar parte del conjunto de calibración.

En este Trabajo, se han comparado los resultados obtenidos con los algoritmos anteriores, con los que se obtienen al aplicar metodologías que utilizan datos de emisión fluorescente de primer orden, como *Mínimos Cuadrados Parciales* (PLS-1) [52]. Como hemos descrito en mayor detalle, PLS-1 conlleva un primer paso de calibración, en el cual la relación existente entre las señales espectrales (espectros bidimensionales de emisión) y la concentración de los analitos, se estima mediante un conjunto de patrones, que constituyen el conjunto de calibración. En la etapa de predicción, los resultados de la calibración se utilizan para estimar la concentración de un determinado

componente en la muestra problema. En los métodos de calibración de primer orden, no existe ninguna de las ventajas que se ponen de manifiesto en los métodos de segundo orden.

Todos los cálculos se realizaron empleando el software MATLAB 5.3 [53]. Para la aplicación de PLS-1 se desarrolló una rutina siguiendo algoritmos conocidos. Tanto para N-PLS como para PARAFAC, las rutinas empleadas están disponibles en internet [54], aunque para este trabajo se utilizó una rutina en MATLAB, que genera una interface de fácil manejo [55]. Esta rutina nos permite introducir de forma simple los datos en el espacio de trabajo de MATLAB, antes de aplicar PARAFAC, SWALTD y N-PLS.

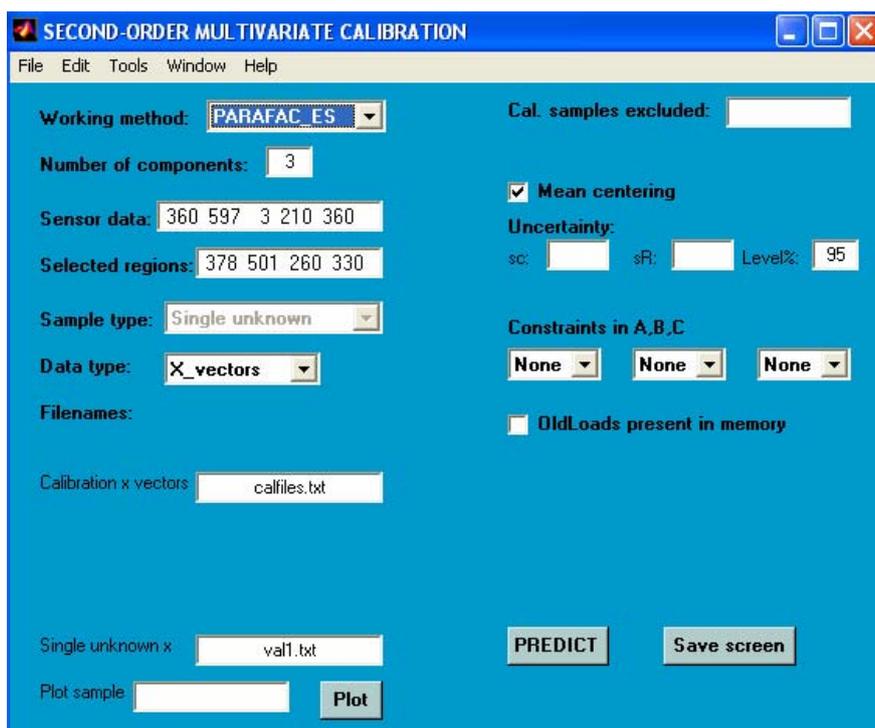


Figura III.9.- *Interfase gráfica utilizada*

Los perfiles de excitación y emisión calculados se muestran en dos figuras separadas, para permitir la correcta selección del analito de interés. Una vez seleccionado el componente, se puede observar un gráfico de la regresión pseudo univariante [56] correspondiente para este componente. Una vez hecho esto, se muestran en pantalla los resultados de concentración y parámetros de calidad.

SWATLD

En este capítulo se han introducido también cálculos correspondientes a la aplicación de la metodología SWATLD. Este algoritmo de descomposición trilineal fue propuesto por Chen y col. [57]. *Self-weighted Alternating Trilinear Decomposition* y es un algoritmo similar a ATLD (*Alternating Trilinear Decomposition*) [58]. El cálculo mediante SWATLD se caracteriza por su rapidez de convergencia y por el hecho de que el uso de un excesivo número de factores no afecta al proceso de calibración, de manera que el algoritmo empleado es más eficaz que el usado en PARAFAC y, desde un punto de vista práctico, emplea un tiempo más corto de análisis.

Uno de los principales inconvenientes que se pueden encontrar en PARAFAC, es precisamente la selección del adecuado número de factores. De manera que la aplicación de PARAFAC no es sencilla. Existen diversos métodos [59-64] para efectuar esa selección pero, debido a la complejidad del problema, ninguno de ellos puede garantizar los resultados en todas las circunstancias. De este modo, el desarrollo de algoritmos en los que no sea necesario establecer de forma exacta el número de factores, es un reto actual de la Quimiometría.

Además de esta dificultad, PARAFAC presenta el inconveniente de que la velocidad con la que se alcanza la convergencia no es elevada [65], ya que es necesario un gran número de iteraciones antes de conseguir la convergencia. El conjunto de datos analíticos necesarios para realizar un estudio de calibración de segundo orden es

extremadamente extenso y, generalmente, entre ellos aparecen ligeras multicolinearidades. Todo ello provoca que PARAFAC requiera un elevado número de iteraciones para converger. De modo que el gran tamaño de los datos empleados hace que cada iteración suponga un elevado costo computacional. En la bibliografía se han propuesto diferentes métodos que intentan evitar este aspecto negativo de PARAFAC. Así, Kiers y Krijnem [66] abordaron el problema causado por el empleo de un elevado número de observaciones. Por otro lado, Alsberg y Kwalheim [67,68] describen un conjunto de métodos para acelerar los cálculos en PARAFAC utilizando un sistema de compresión de datos similar a la aproximación CANDELIN [69]. Andersson y Bro [70] propusieron una poderosa herramienta para comprimir datos de enorme tamaño empleando el algoritmo Tucher3 [71]. Todas estas técnicas tratan de obtener los parámetros del modelo empleando matrices de datos más reducidas y, de este modo, se trata de disminuir el tiempo de computación.

Por otro lado, existen otros métodos que intentan acelerar el tiempo de cálculo, mediante la reducción del número de iteraciones. Por ejemplo, Mitchell and Burdick [72] sugieren evitar las denominadas “zonas pantanosas” debidas a degeneraciones en los cálculos; es decir, existen ciertas ocasiones en las que los cálculos avanzan de forma muy lenta, de manera que los cálculos se detienen cuando el sistema entra en estas *zonas pantanosas*, comenzando una nueva iteración aleatoria. Paatero [73] introduce un nuevo algoritmo PMF3 (*Positive Matrix Factorization*) encaminado a reducir el número de iteraciones. El algoritmo presenta la capacidad de ponderar los datos durante el proceso iterativo. Recientemente, Kiers [74] ha propuesto un algoritmo en tres etapas, que reduce de forma importante el número de iteraciones.

A pesar de que este conjunto de métodos incorporan ventajas respecto a PARAFAC, aún se requiere la estimación de forma exacta del número de factores, que es la principal limitación.

Con SWATLD se solventan estos dos inconvenientes [57]; por un lado, este algoritmo se hace insensible a un excesivo número de factores y, por otro, reduce de forma importante el número de iteraciones.

Este método, con el objetivo de incrementar la velocidad de convergencia, utiliza un algoritmo alternativo para la descomposición trilineal del cubo de datos, empleando un método de optimización alternante de un conjunto de tres funciones objetivo, a diferencia de una única empleada por PARAFAC.

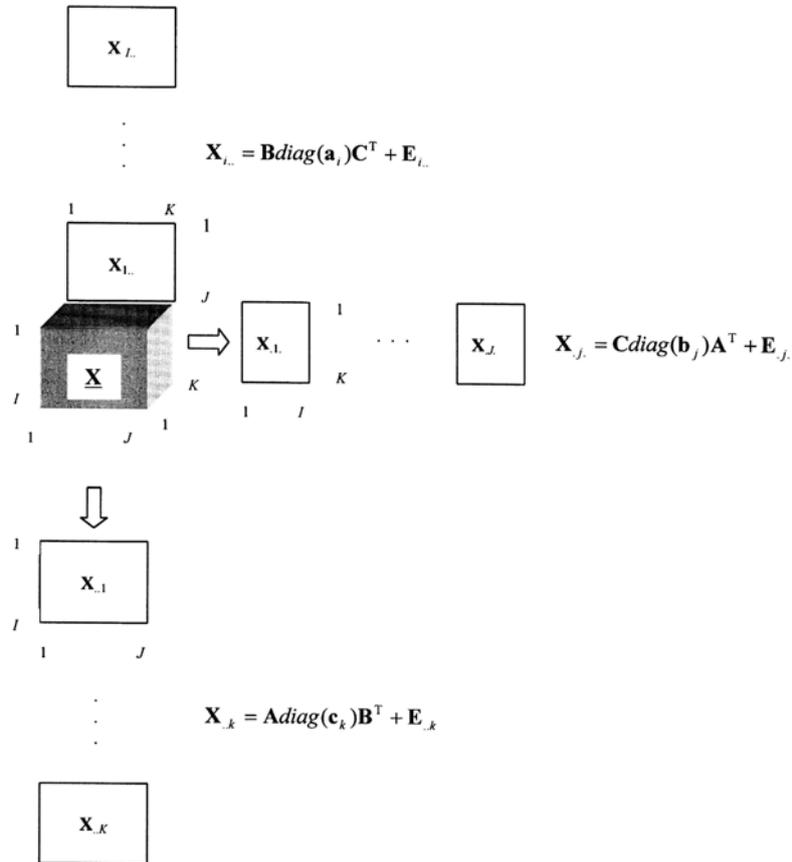
La razón que esgrimen sus autores para la utilización de estas tres funciones, radica en que están intrínsecamente relacionadas entre sí. De este modo, el algoritmo es capaz de obviar “zonas pantanosas” de la optimización, que PARAFAC no es capaz de soslayar.

La mayor velocidad en el proceso de optimización conlleva, además, una segunda ventaja, el hecho de ser insensible a un exceso de factores en el proceso de cálculo. Mientras que en PARAFAC un exceso de factores tiene una gran influencia en las predicciones, SWATLD presenta unos resultados coincidentes con los que se obtienen cuando se emplea un adecuado número de factores. En otras palabras, SWATLD no requiere determinar de forma exacta el número óptimo de factores. Tan sólo el empleo de un número de ellos extremadamente elevado, puede conducir a resultados no reales.

Modelo y algoritmo

Nomenclatura: I , J , K se utilizarán para indicar las dimensiones en las matrices de datos; F será el número actual de factores y N el número de factores utilizados en los cálculos. Con \mathbf{X} representamos la matriz tridimensional de datos. Las matrices loading serán \mathbf{A} , \mathbf{B} y \mathbf{C} , que, para un caso concreto de EEM's, \mathbf{A} y \mathbf{B} serán matrices espectrales

y **C** será una matriz de concentraciones relativas. Finalmente, la matriz de los errores se denotará con la letra **E**.



En calibración lineal de segundo orden, está ampliamente aceptado el modelo propuesto por Harshman [75] y Carrol-Chang [76], debido a su consistencia con la ley de Beer. Este modelo puede escribirse como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{A}\mathbf{B}^T + \mathbf{E}$$

Ecuación 20

Harshman y Carroll-Chan proponen un sistema de mínimos cuadrados alternantes para resolver la ecuación anterior, asumiendo de forma sucesiva que dos de los modos de las matrices loadings son conocidos y estimando los parámetros no conocidos para el tercer modo, de manera que estos parámetros hagan mínima la siguiente función:

$$S(A, B, c_1, \dots, c_k) = \sum_{k=1}^K \|X_{..k} - A \text{diag}(c_k) B^T\|_F^2 \quad \text{Ecuación 21}$$

donde $\|\cdot\|$ representa la matriz normalizada de Frobenius.

PARAFAC presenta un amplio número de ventajas estadísticamente hablando, tales como la determinación de los resultados finales en términos de mínimos cuadrados. Sin embargo, presenta los inconvenientes de baja velocidad de cálculo y el requerimiento de la determinación precisa del número de factores en la mezcla. Las matrices loadings estimadas **A**, **B** y **C** son correctas únicamente cuando se ha estimado correctamente el número de factores [74,77,78].

Como se ha mencionado anteriormente, la baja velocidad de convergencia es debida principalmente al alto grado de multicolinealidad en los datos, lo que hace que la superficie de respuesta de la función que minimiza el error de regresión varíe de forma mínima, aunque los parámetros estimados lo hagan de forma importante.

Chen y col. [57], con el propósito de establecer un algoritmo con una mayor velocidad de convergencia, consideran la posibilidad de resolver el modelo trilinear resolviendo de forma alternada las tres siguientes funciones objetivos, a diferencia de lo que hace PARAFAC.

$$S(\mathbf{C}) = \sum_{k=1}^K \left(\left\| \left(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{\dots k} - \text{diag}(\mathbf{c}_k) \mathbf{B}^T \right)^T \times \left\|_{\mathbf{F}^2} + \left\| \left(\mathbf{X}_{\dots k} (\mathbf{B}^+)^T - \mathbf{A} \text{diag}(\mathbf{c}_k) \right) \times \left\|_{\mathbf{F}^2} \right. \right.$$

Ecuación 22

Con **A** y **B** fijas, se minimiza $S(\mathbf{C})$ para obtener **C**

$$S(\mathbf{B}) = \sum_{j=1}^J \left(\left\| \left(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_j - \text{diag}(\mathbf{b}_j) \mathbf{A}^T \right)^T \times \left\|_{\mathbf{F}^2} + \left\| \left(\mathbf{X}_j (\mathbf{A}^T)^+ - \mathbf{C} \text{diag}(\mathbf{b}_j) \right) \times \left\|_{\mathbf{F}^2} \right. \right.$$

Ecuación 23

Con **A** y **C** fijas, se minimiza $S(\mathbf{B})$ para obtener **B**

$$S(\mathbf{A}) = \sum_{i=1}^I \left(\left\| \left(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{i.} - \text{diag}(\mathbf{a}_i) \mathbf{C}^T \right)^T \times \left\|_{\mathbf{F}^2} + \left\| \left(\mathbf{X}_{i.} (\mathbf{C}^T)^+ - \mathbf{B} \text{diag}(\mathbf{a}_i) \right) \times \left\|_{\mathbf{F}^2} \right. \right.$$

Ecuación 24

Con **B** y **C** fijas, se minimiza $S(\mathbf{A})$ para obtener **A**

Donde **1** es el vector identidad de tamaño apropiado, el operador $./$ indica división vectorial y $\text{sqrt}(\cdot)$ operador raíz cuadrada. Finalmente, las matrices diagonales empíricas, $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A})))$ y $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B})))$, y $\text{diag}(\text{sqrt}(1./\text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})))$, son matrices sopesadas para balancear las dos partes de cada una de las tres funciones objetivo.

Chen y col. [57] justifican este sistema de minimización alternada de las tres funciones objetivos, teniendo en cuenta que las relaciones intrínsecas existentes entre ellas y sus soluciones, son iguales a las de las matrices loading libres de error del modelo trilineal. En presencia de ruido, las funciones objetivos tienen diferentes superficies de respuesta. De este modo, se puede esperar que en el proceso de minimización alternante de las tres funciones objetivos, se pueden obviar las zonas pantanosas, lo cual era difícil en la metodología PARAFAC, ya que tan solo minimizaba una única función global.

En base a todo lo anterior, Chen y col. desarrollaron el algoritmo denominado *self-weighted alternating trilinear decomposition* (SWATLD), que se esquematiza a continuación:

1. Iniciación aleatoria de las matrices loading **A** y **B**.

2.

$$c_k = \frac{1}{2} \left(\frac{\text{diagm}(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{\cdot k}^T \mathbf{A}) / \text{diagm}(\mathbf{A}^T \mathbf{A}) +}{\text{diagm}(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{\cdot k} \mathbf{B}) / \text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B})} \right)$$

$$k = 1, \dots, K$$

3.

$$b_j = \frac{1}{2} \left(\frac{\text{diagm}(\mathbf{A}^+ \mathbf{X}_{\cdot j}^T \mathbf{C}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C}) +}{\text{diagm}(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_{\cdot j} \mathbf{A}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})} \right)$$

$$j = 1, \dots, J$$

4.

$$a_i = \frac{1}{2} \left(\frac{\text{diagm}(\mathbf{C}^+ \mathbf{X}_{i \cdot}^T \mathbf{B}) / \text{diagm}(\mathbf{B}^T \mathbf{B}) +}{\text{diagm}(\mathbf{B}^+ \mathbf{X}_{i \cdot} \mathbf{C}) / \text{diagm}(\mathbf{C}^T \mathbf{C})} \right)$$

$$i = 1, \dots, I$$

5. Actualización las matrices **C**, **B** y **A** de acuerdo a las etapas 2-4. Este paso se repite hasta que se alcanza la convergencia de acuerdo al criterio que se establezca

En el trabajo en el que propone este método, Chen y col. [57] demuestran que SWATLD presenta una mayor velocidad de convergencia. Así mismo, que la utilización de un número de factores superior al número de factores óptimo conduce a soluciones reales, y no a combinaciones lineales de las mismas; es decir, que SWATLD no requiere una estimación precisa del número óptimo de factores. Este hecho es esencial para análisis en los que resulta complejo determinar el número óptimo de factores, ya que se puede utilizar un número de factores por exceso.

2.- DETERMINACIÓN DE SULFATIAZOL EN MIELES MEDIANTE MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEANDO DATOS DE PRIMER Y DE SEGUNDO ORDEN.

Como ya se ha señalado, el sulfatiazol es una sulfamida que no presenta fluorescencia nativa, por lo que es necesario someterla a irradiación para inducir dicha señal. Esta señal fluorescente está muy influenciada por las condiciones del medio, el disolvente empleado, la acidez fijada, así como el tiempo de irradiación. En el capítulo anterior se han optimizado unas condiciones experimentales que nos permiten llevar a cabo un estudio de dicho analito. Se empleó como disolvente etanol para el caso de las disoluciones concentradas, mientras que las correspondientes disoluciones de trabajo, se preparan a partir de las anteriores en un medio acuoso con un contenido en agua del 80%. También se comprobó que el pH idóneo es de 4.75, por lo que todas las disoluciones de trabajo se preparan fijando esta acidez mediante el empleo de tampón acético-acetato. Finalmente, se comprobó que el tiempo de irradiación óptimo era de 5 minutos.

Se intentó determinar dicho analito en distintas mieles, utilizando como señal analítica la I_f tras la irradiación durante 5 minutos, pero debido a la gran señal producida por la miel, fue imposible utilizar esta medida como señal analítica. Se pasó por tanto a la utilización de señales derivadas, con lo que se conseguía disminuir de manera considerable la señal de fondo, pero no se lograba eliminar completamente el efecto de matriz, por lo que este procedimiento sólo fue aplicable a un reducido número de mieles, así como en un pequeño rango de concentraciones, como se aclara en el capítulo anterior.

Los objetivos, por tanto, del empleo de calibración multivariante de segundo orden, que en nuestro caso serán señales de excitación-emisión fluorescente fotoinducida, será la obtención de mayor información espectral y, por tanto, una mayor diferenciación espectral entre los diversos componentes. Emplearemos dos métodos de

calibración de primer orden, PLS y PLS concatenado (unfolded-PLS), y dos métodos de segundo orden, PARAFAC (Parallel Factor Análisis) y SWATLD (Self Weighted Alternative Trilinear Decomposition), con objeto de comparar las ventajas e inconvenientes de estos métodos a la hora de resolver el problema planteado. Por otra parte, PARAFAC y SWATLD aprovechan las capacidades inherentes a la denominada “ *ventaja de segundo orden* “ basada en el hecho de utilizar para la calibración las muestras patrones de los componentes en unión de la propia muestra problema. Como consecuencia, son capaces de modular matrices complejas y nos permiten determinar dicho analito, sin necesidad de llevar a cabo una separación.

En el caso de la miel, los errores de predicción son debidos a la presencia de componentes fluorescentes en la miel no modelados, ya que la influencia de estos posibles componentes no ha sido tomada en cuenta en la calibración. Estos compuestos fluorescentes de la miel, no sólo presentan emisiones fluorescentes que solapan con las señales fluorescentes de los analitos, sino que, además, son intrínsecamente variables presentando distinta composición para mieles diferentes.

En las condiciones operatorias experimentales indicadas anteriormente, la máxima información fluorescente de esta sulfamida, se obtiene en el intervalo de longitudes de onda de emisión comprendidas entre 300-400 nm, fijando la excitación en 251 nm, estando situado su máxima emisión en 340 nm. Las rendijas de excitación y emisión se mantuvieron en 4 y 8 nm, respectivamente y los espectros se digitalizaron cada 1 nm. Las matrices de excitación-emisión se midieron cada 1 nm en el rango de emisión, de 300 a 400 nm y cada 5 nm en el rango de excitación, de 200 a 300 nm, dando un total de $100 \times 20 = 2000$ puntos experimentales en cada matriz. A partir de los espectros tridimensionales, se obtuvieron los correspondientes espectros de emisión, para de este modo hacer los posteriores estudios con PLS-1. Así, utilizaremos los mismos espectros tanto en los análisis empleando metodologías de primer como de segundo orden.

CONJUNTO DE CALIBRACIÓN Y CONJUNTO DE VALIDACIÓN

Para la construcción de la matriz de calibración, se utilizaron seis patrones preparados por triplicado, con lo que el número total de muestras para construir el modelo fueron 18. (Muestras pat1-pat6). Las concentraciones de sulfatiazol en las disoluciones patrón variaban de 0 a 3 mg L⁻¹. También se prepararon un total de 6 muestras (Val1-Val6), construidas con concentraciones del analito, diferentes de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. Este grupo de muestras será utilizado para validar el modelo.

Tabla III.2.- *Composición de la matriz de calibración y del conjunto de predicción.*

Muestra	Sulfatiazol (mg/L)	Muestra	Sulfatiazol (mg/L)
Pat1	0.0	Val1	0.4
Pat2	0.5	Val2	0.8
Pat3	1.0	Val3	1.6
Pat4	2.0	Val4	1.8
Pat5	2.5	Val5	2.2
Pat6	3.0	Val6	2.6

Tanto los espectros de emisión utilizados en PLS, como las matrices de excitación-emisión, se midieron siguiendo un orden aleatorio

ANÁLISIS DE LAS MATRICES DE EXCITACIÓN-EMISIÓN FLUORESCENTE

En la Figura III.10, se muestra como, a partir del espectro tridimensional del patrón de calibración *pat 5*, se obtiene el correspondiente espectro de emisión, a una longitud de onda de excitación de 251 nm.

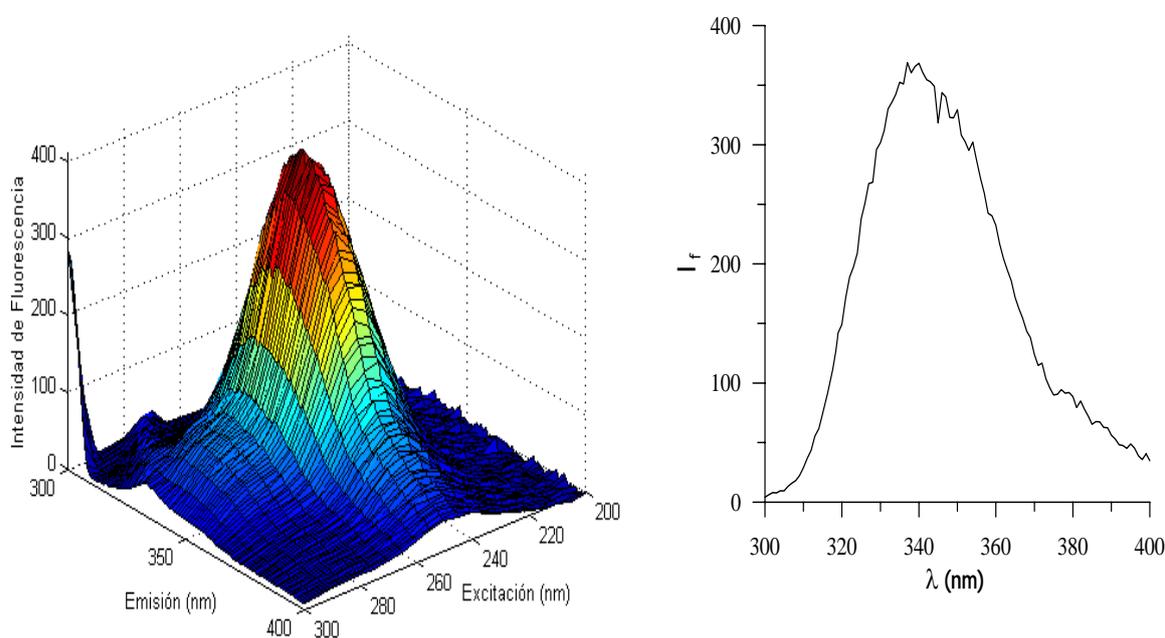


Figura III.10.- Representación tridimensional y bidimensional para la muestra de calibración *pat5*.

Se puede observar en la Figura III.10, la presencia de señales de dispersión Rayleigh, que provienen de procesos no relacionados con la concentración del analito. Para soslayar este hecho, se ha reducido el rango de longitudes de onda de excitación, tanto para la calibración como para la cuantificación de las muestras problemas. La región espectral seleccionada es de 300 a 400 nm, con un incremento de 1 nm, para el

caso de la emisión y de 210 a 290 nm, en intervalos de 5 nm, para la excitación, lo que nos da un total de $100 \times 80 = 1600$ puntos experimentales en cada matriz.

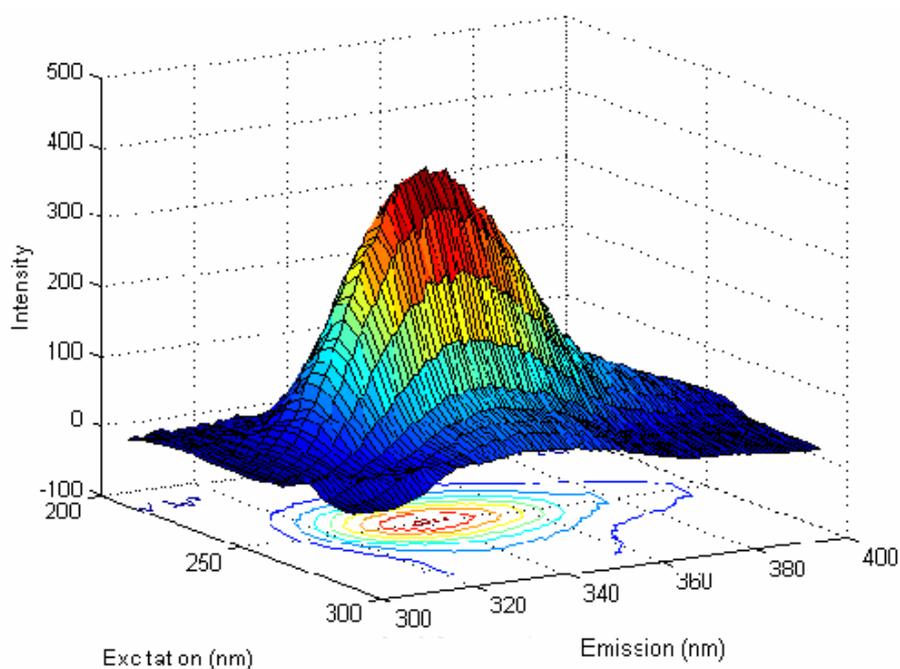


Figura III.11.- Representación tridimensional de excitación-emisión y mapa de contorno para la muestra de calibración *pat5*, en la región espectral seleccionada.

En la Figura III.11 se muestra la matriz de excitación-emisión de la muestra de calibración *pat5* en la región espectral seleccionada, en la que puede observarse que han desaparecido las señales de dispersión procedente del efecto Rayleigh.

MÉTODO DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN DEL CONJUNTO DE PREDICCIÓN

Como paso previo al estudio de la determinación del sulfatiazol en mieles, se aplicaron los cinco métodos de calibración multivariante señalados, a las muestras de validación recogidos en la Tabla III.3.

Se registraron los espectros unidimensionales de emisión fluorescente, a la longitud de onda de excitación de compromiso de 251 nm, para el conjunto de predicción de la Tabla III.2, ya que, en primer lugar, estas muestras fueron analizadas mediante PLS-1. Con este modelo, la predicción para las muestras Val1-Val6 utilizando PLS-1, nos ofrece unos valores de recuperación bastante aceptables. Los datos tridimensionales de emisión-excitación para el conjunto de muestras de validación Val1-Val6 fueron también analizados mediante unfolded-PLS, n-PLS, SWATLD y PARAFAC. Para el establecimiento del número óptimo de factores en PLS, unfolded-PLS y n-PLS se utilizó el método de validación cruzada, según el criterio de Haaland y Thomas [34]. En el caso de los datos de segundo orden, tanto con PARAFAC como con SWATLD, se utilizó el método CORCONDIA, ya explicado, para establecer el número óptimo de factores. En todos los casos se obtuvo un número óptimo de factores de 2. Como se observa en la Tabla III.3, las recuperaciones obtenidas en todos los casos son aceptables, en las muestras sintéticas analizadas.

Tabla III.3.- Predicción en muestras sintéticas utilizando diferentes algoritmos para la calibración.

<i>Analito</i>	Método de calibración									
	PLS-1		nPLS		Unfolded-PLS		PARAFAC		SWALTD	
	<i>REP%</i>	<i>%R^a</i>	<i>REP%</i>	<i>%R^a</i>	<i>REP%</i>		<i>REP%</i>	<i>%R^a</i>	<i>REP%</i>	<i>%R^a</i>
<i>ST</i>	2.8	104(2)	3.0	104(2)	3.0	104(2)	2.8	103(2)	2.6	103(2)

REP = Error relativo de predicción

% R.- % de recuperación

^a Los valores entre paréntesis corresponden a las desviaciones estandar correspondientes a las recuperaciones de las seis muestras de calibración.

APLICACIÓN AL ANÁLISIS DE SULFATIAZOL EN MUESTRAS DE MIEL

Se analizaron un total de 7 tipos de mieles. El tratamiento seguido con cada una de ellas es el descrito en el capítulo anterior. En estas condiciones experimentales, se registraron los diferentes espectros, tanto de emisión, excitando a 251 nm (para aplicar PLS), como los de excitación-emisión, para aplicar los demás algoritmos.

En primer lugar, en la Figura III.12, se comparan los espectros de dos muestras diferentes, una corresponde al espectro producido por un blanco de miel y la otra al patrón *pat5* en presencia de miel. Se puede comprobar como la señal emitida por la miel solapa con la producida por el analito.

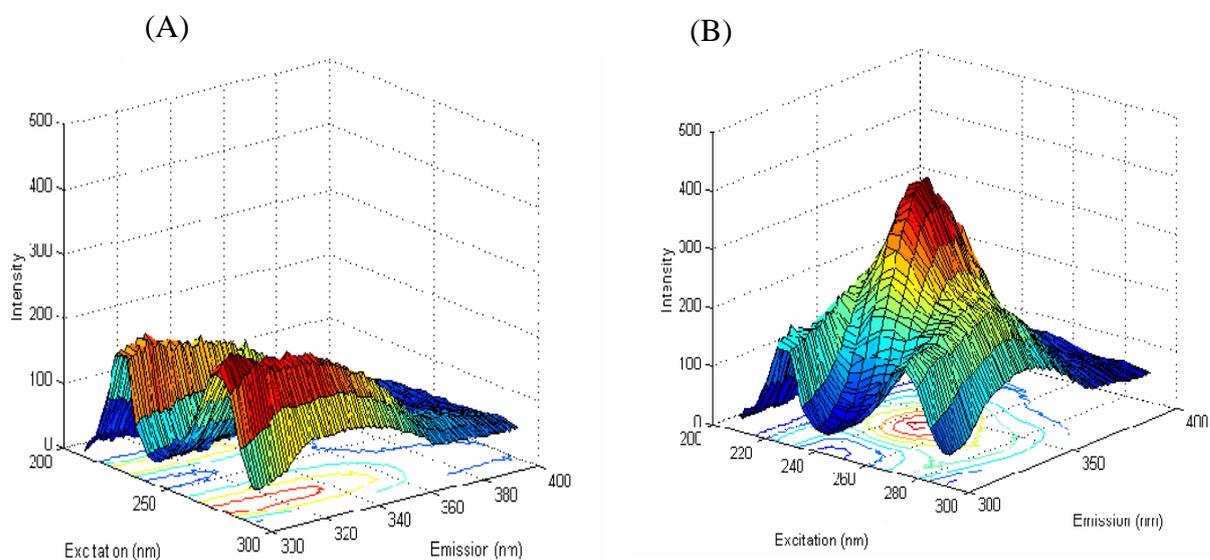


Figura III.12.- Representación tridimensional de excitación-emisión en la región espectral seleccionada de la señal producida por la miel (A) y de la miel contaminada con pat5 (B).

Utilizando los modelos optimizados anteriormente mediante PLS-1, nPLS y unfolded-PLS (modelados con los espectros de emisión fluorescente, y excitación-emisión, respectivamente) se observa la incapacidad de los tres métodos para producir resultados aceptables en las muestras de miel. Específicamente, son los errores de predicción (REP), ver Tabla III.4, los que presentan valores inaceptablemente elevados en todos los casos. Esto es debido a la presencia de componentes fluorescentes en la miel no modelados, ya que la influencia de estos posibles componentes no ha sido tomada en cuenta en la calibración. Estos compuestos fluorescentes de la miel, no sólo presentan emisiones fluorescentes que solapan con las señales fluorescentes del analito, sino que, además son intrínsecamente variables presentando distinta composición para mieles diferentes, lo cual dificulta la modelación, a no ser que se emplee la ventaja de segundo orden, indicada anteriormente.

Tabla III.4.- Predicción en muestras problemas utilizando diferentes algoritmos.

	<i>España</i>	<i>Alemania</i>	<i>Belgica</i>	<i>Canada</i>	<i>Suiza</i>
<i>Sulfatiazol (mg L⁻¹)</i>					
<i>Añadido</i>	Predicho (PLS-1 / N-PLS)				
-----	0.20 / 0.90	0.10 / 0.51	0.30 / 1.39	0.09 / 0.50	0.43 / 1.22
0.10	0.60 / 0.96	0.21 / 0.60	0.58 / 1.49	0.20 / 0.62	0.48 / 1.33
0.30	0.95 / 1.28	0.70 / 0.95	0.75 / 1.70	0.50 / 0.70	0.75 / 1.60
0.70	1.15 / 1.48	0.90 / 1.25	1.02 / 1.95	0.8 / 1.10	1.18 / 1.87
1.70	2.06 / 2.26	1.85 / 2.14	1.86 / 2.60	1.80 / 2.09	1.92 / 2.66
<i>RMSEP</i>	0.2 / 06				
<i>REP</i> (%)	26.8 / 73.5				

RMSEP = raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado; *REP* (%) = error relativo de predicción.

$$RMSEP = [1/(I-1)\sum_i^I (C_{act} - C_{pred})^2]^{1/2}$$

$$REP (\%) = (100 / \bar{c}) x RMSEP$$

Los resultados obtenidos con unfolded-PLS son similares a los obtenidos por nPLS, de ahí que no aparezcan en la tabla.

Aunque nPLS y unfolded-PLS son modos muy eficientes para llevar a cabo el análisis de datos tridimensionales, presentan el inconveniente de que en la calibración no se incluye la muestra incógnita, ya que la concentración de esta muestra incógnita no es conocida. Es por esto por lo que nPLS y unfolded-PLS no proporcionan información sobre las interferencias no calibradas, como es en este caso la miel.

A continuación, a modo de ejemplo se detallan los pasos seguidos para uno de los tipos de mieles analizados, en nuestro caso la miel MIL FLORES. El mismo procedimiento se siguió con todos los tipos de mieles analizados.

Para aprovechar al máximo la *ventaja de segundo orden*, se ha aplicado de forma separada PARAFAC y SWALTD con un conjunto de calibración formado por las señales de excitación-emisión fluorescentes de los 6 patrones registrados por triplicado (18 muestras), junto con cada una de las muestras de miel.

SELECCIÓN DEL NÚMERO DE FACTORES

Para llevar a cabo la selección del número de factores, se ha analizado el valor de la *consistencia del núcleo*. En la Figura III.13, se muestran los valores obtenidos para la consistencia del núcleo para la representación formada por las 18 muestras de calibración junto con una de las muestras de miel.

Como podemos comprobar, el valor de la consistencia de núcleo cae a un valor muy bajo, cuando se utilizan tres factores para modelar la muestra de miel de España, de manera que el número de factores óptimos a utilizar para este tipo de miel es $N = 2$ (valor anterior al primero que da un resultado menor del 50%)

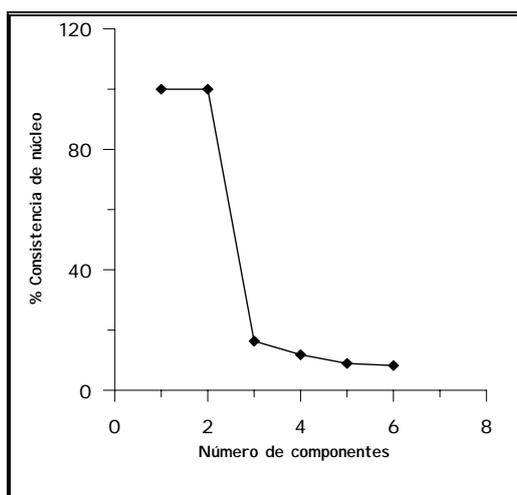


Figura III.13.- Representación del valor de la consistencia de núcleo en función del número de componentes modelados para el cubo de datos formado por los espectros tridimensionales de la muestra de miel junto con las 18 muestras de calibración

Como se puede ver en la figura anterior, para el caso de este tipo de miel, el valor de consistencia de núcleo toma un valor mayor del 50% cuando el número de factores es dos, lo cual está de acuerdo con el análisis del core consistency. Esto indica que aunque las muestras de calibrado hayan sido hechas exclusivamente con el analito puro, la presencia de miel introduce nuevos elementos fluorescentes al conjunto de datos, pero que PARAFAC los considera como un único componente extra, permitiendo así su modulación en muestras desconocidas de miel. Una vez optimizado el número de factores utilizando PARAFAC, será éste el que utilicemos para aplicar SWALTD.

En la Figura III.14, podemos ver los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar la muestra de miel junto con el conjunto de calibración, y tras aplicar PARAFAC y SWALTD. En esta figura, se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo, en este caso concreto. Los componentes aparecen en orden de importancia, en función de su contribución al total de la varianza.

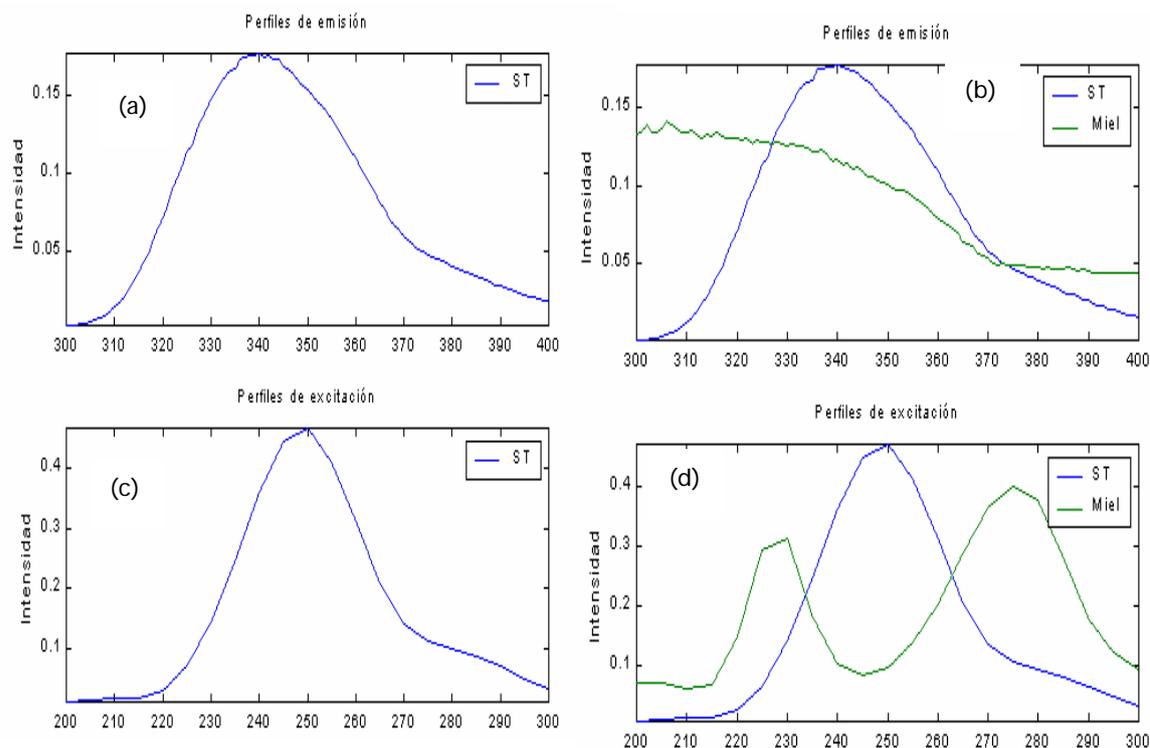


Figura III.14.- Perfiles de emisión de los factores optimizados: (a) espectro del patrón puro de ST; (b) muestra de miel en presencia de ST. Perfiles de excitación de los factores optimizados: (c) espectro del patrón puro de ST; (d) muestra de miel en presencia de ST

Perfiles similares se encontraron al utilizar SWATLD. Si comparamos los espectros dados por PARAFAC y SWATLD, con los espectros del componente puro, podemos asignar que el número uno corresponde al sulfatiazol y el dos a la miel. En este caso, el analito aparece en el primer lugar porque es el que origina una mayor intensidad de fluorescencia.

En las siguientes tablas, se resumen los valores de concentración encontrados para el analito en el conjunto de mieles analizadas, así como las recuperaciones obtenidas para cada tipo de miel analizada, utilizando para todas ellas un valor de 2 como número de factores óptimo. Las muestras de miel contaminadas con 10, 30, 70 y 170 $\mu\text{g ST. g}^{-1}$ de miel son equivalentes, de acuerdo con el procedimiento empleado, a concentraciones de ST de 0.10, 0.30, 0.70, y 1.70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, en los matraces de 25 mL, respectivamente.

Tabla III.5.- Resultados obtenidos cuando se aplica PARAFAC en el análisis de mieles contaminadas con sulfatiazol.

<i>Mil Flores</i>		<i>Alemana</i>	<i>Belga</i>	<i>Canadiense</i>	<i>Suiza</i>
<i>Sulfatiazol ($\mu\text{g /mL}$)</i>					
<i>Añadido</i>	Predicho ^a				
-----	0.001 (0.01)	----	0.002(0.01)	----	-----
0.10	0.091 (0.01)	0.089 (0.01)	0.089 (0.006)	0.088 (0.007)	0.09 (0.01)
0.30	0.29 (0.01)	0.28 (0.01)	0.29 (0.01)	0.28 (0.01)	0.28 (0.01)
0.70	0.65 (0.02)	0.70 (0.02)	0.69 (0.01)	0.64 (0.01)	0.72(0.02)
1.70	1.56 (0.06)	1.69 (0.06)	1.65 (0.06)	1.58 (0.07)	1.57 (0.06)
RMSEP	0.03				
REP(%)	4.2				

^a Desviación estándar entre paréntesis

RMSEP = raíz cuadrada de la media de los errores de predicción al cuadrado; REP (%) = error relativo de predicción.

Tabla III.6.- Recuperaciones obtenidas cuando se aplica PARAFAC en el análisis de mieles contaminadas con sulfatiazol.

<i>Mil Flores</i>	<i>Alemana</i>	<i>Belga</i>	<i>Canadiense</i>	<i>Suiza</i>	
<i>Sulfatiazol (µg /mL)</i>					
<i>Añadido</i>	Predicho ^a (% Recuperación)				
-----	0.001	----	0.002	----	-----
0.10	0.091(91)	0.089 (89)	0.089 (89)	0.088 (88)	0.09 (90)
0.30	0.29 (96)	0.28 (93)	0.29 (96)	0.28 (93)	0.28 (93)
0.70	0.65 (93)	0.70 (100)	0.69 (98)	0.64 (91)	0.72 (103)
1.70	1.56 (92)	1.69 (99)	1.65 (97)	1.58 (93)	1.57 (92)

Tabla III.7.- Resultados obtenidos cuando se aplica SWATLD en el análisis de mieles contaminadas con sulfatiazol

<i>Mil Flores</i>	<i>Alemana</i>	<i>Belga</i>	<i>Canadiense</i>	<i>Suiza</i>	
<i>Sulfatiazol (µg /mL)</i>					
<i>Añadido</i>	Predicho ^a				
-----	----	----	----	----	-----
0.10	0.10 (0.01)	0.10 (0.01)	0.09 (0.01)	0.089 (0.007)	0.09 (0.01)
0.30	0.29 (0.01)	0.29 (0.01)	0.30 (0.01)	0.28 (0.01)	0.28 (0.01)
0.70	0.66 (0.02)	0.70 (0.02)	0.69 (0.01)	0.64 (0.01)	0.72(0.02)
1.70	1.58 (0.05)	1.70 (0.06)	1.67 (0.06)	1.58 (0.05)	1.55 (0.06)
RMSEP	0.02				
REP	2.8				

Tabla III.8.- *Recuperaciones obtenidas cuando se aplica SWATLD en el análisis de mieles contaminadas con sulfatiazol.*

<i>Mil Flores</i>	<i>Alamana</i>	<i>Belga</i>	<i>Canadiense</i>	<i>Suiza</i>	
<i>Sulfatiazol (µg /mL)</i>					
<i>Añadido</i>	Predicho ^a (% Recuperación)				
-----	----	----	----	----	-----
0.10	0.10 (100)	0.10 (100)	0.09 (90)	0.089 (89)	0.09 (90)
0.30	0.29 (97)	0.29 (97)	0.30 (100)	0.28 (93)	0.28 (93)
0.70	0.66 (94)	0.70 (100)	0.69 (98)	0.64 (91)	0.72(103)
1.70	1.58 (93)	1.70 (100)	1.67 (98)	1.58 (93)	1.55 (91)

El análisis estadístico indica errores de predicción medios para el análisis de sulfatiazol, que son comparables a los encontrados en las muestras artificiales.

PARÁMETROS DE CALIDAD

Los parámetros de calidad, denominados en la bibliografía como cifras de mérito, son empleados normalmente y tienen una gran utilidad para la comparación entre métodos.

La sensibilidad (SEN) para un analito en concreto, por ejemplo, se estima como la señal neta de ese analito en unidades de concentración. La selectividad (SEL) se calcula como la relación entre la sensibilidad y la señal total, tal y como sugiere Salivas [79]. Más interesante resulta el concepto de sensibilidad analítica, definido, con analogía con la calibración univariante, como la relación entre la sensibilidad y el ruido espectral:

$$\gamma = \text{SEN} / [V(\mathbf{R})]^{1/2} \quad \text{Ecuación 25}$$

La inversa (γ^{-1}) establece la mínima diferencia en concentración, que puede ser apreciada por el método, teniendo en cuenta la técnica, el equipo y la escala empleada [80]. El término $V(\mathbf{R})$ es la varianza de la señal instrumental, que se estima mediante la medida de réplicas del blanco.

Los errores estándares, en las concentraciones predichas $[s(c)]$ han sido calculados según la representación pseudo-univariante proporcionada por PARAFAC

$$s(c) = [\text{SEN}^{-2}(1+h)V(\mathbf{R}) + hV(c)]^{1/2} \quad \text{Ecuación 26}$$

donde $V(c)$ es la varianza en la medida de las concentraciones de los patrones de calibración. Finalmente el parámetro h es el nivel del analito, que nos indica lo alejado que está esa muestra del centro de la calibración, y es la misma que en los modelos clásicos de orden cero, es decir:

$$h = (c_{\text{unk}} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 / \sum_{i=1}^I (c_{\text{cal},i} - \bar{c}_{\text{cal}})^2 \quad \text{Ecuación 27}$$

donde C_{unk} es la concentración predicha para la muestra incógnita, $C_{\text{cal}, i}$ es la concentración del i -ésimo patrón de calibrado y \bar{c}_{cal} es la media de las concentraciones de los patrones de calibrado. El cálculo de $s(c)$ nos permite calcular el límite de detección del método, como:

$$LOD = 3.3s(0)$$

Ecuación 28

donde $s(0)$ es la desviación estándar de la concentración predicha del analito de interés, en la muestra del blanco. Esto se calcula fijando $C_{unk} = 0$ en las ecuaciones 26 y 27.

En la siguiente tabla se recogen los parámetros de calidad para ambos métodos.

Tabla III.9.- Parámetros de calidad

	<i>PARAFAC</i>	<i>SWATLD</i>
Sensibilidad (SEN) FU.L.mg ⁻¹	1.77	1.72
Selectividad (SEL)	0.85	0.86
Sensibilidad analítica (γ) ⁻¹ L. ⁻¹ mg	0.005	0.005
LOD (mg.L)	0.02	0.02

FU.- Unidades de fluorescencia (unidades arbitrarias)

Para comparar ambos métodos, se realizó una regresión lineal utilizando las concentraciones encontradas frente a las concentraciones puestas haciendo uso del test de la región de la elipse (EJCR)[81]. Los valores estimados de la pendiente y la ordenada en el origen fueron comparados con los valores ideales de 1 y 0, respectivamente. La Figura III.15 muestra la representación obtenida al aplicar ambos métodos quimiométricos. Como puede observarse, ambas elipses contienen el punto teórico ($a = 0, b = 1$), pero la correspondiente al empleo del algoritmo SWATLD es de menor tamaño; con lo que podemos concluir que este algoritmo produce resultados más precisos.

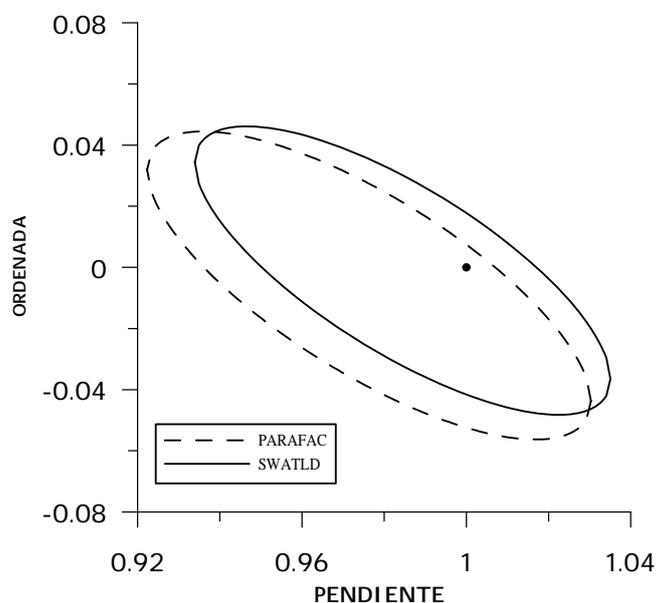


Figura III.15.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la puesta de sulfatiazol aplicando PARAFAC y SWATLD. El punto negro marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$).

3.-CONCLUSIONES

Se demuestra que es factible la determinación fluorimétrica de sulfatiazol en miel utilizando técnicas de calibración multivariante de segundo orden. El proceso previo de fotoinducción incrementa drásticamente la fluorescencia nativa de sulfatiazol. La aplicación de la ventaja de segundo orden, utilizando las matrices tridimensionales de excitación-emisión, permite la determinación de sulfatiazol en presencia de interferencias no conocidas, que se encuentran en las distintas matrices de mieles ensayadas. Se encuentran resultados algo mejores al aplicar SWATLD, en comparación con los obtenidos al aplicar PARAFAC. Los valores de recuperación encontrados en el análisis de mieles procedentes de distintos países fueron adecuados. Se ha demostrado

que la metodología propuesta es adecuada para el análisis rutinario en el control de la contaminación de sulfatiazol en miel.

- 1.- Bro R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1997,38, 149
- 2.- Booksh K.S, Kowalski B.R, *Anal. Chem*, 1994, 66, 782A
- 3.- Bro R., *Chemom. Intell. Lab.* 1997, 38, 149
- 4.- Chen Z.P, Wu H.L, Jiang J.H, Li Y., Yu R.O, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2000, 52, 75
- 5.- Moberg L., Robertsson G., Karlberg B, *Talanta*, 2001, 54, 161
- 6.- Arancibia J.A, Escandar G.M, *Talanta*, 2003, 60 , 1113
- 7.- Stoev G., Michailova A. , *J. Chromatogr.-A*, 2000, 871 , 37
- 8.- Kim D.H, Choi J.O, Kim J., Lee D.W., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.*, 2003, 26,1149
- 9.- Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Olivieri A.C, Goicoechea H., *Anal. Chem.*, 2003,75, 2640
- 10.- Lee N.J, Holtzapple C.K, Muldoon M.T, Deshpande S.S, Stanker L.H, *Food Agric. Immunol.*, 2001, 13, 5
- 11.- Roudant B., Garnier M., *Food Addit. Contam.*, 2002, 19, 373
- 12.- Bro, R., *J. Chemom.* 1996,10, 47
- 13.-H. Martens y T. Naes, *Multivariate calibration*; John Wiley and Sons. Chichester, 1989.
- 14.-Beebe, K.R., Kowalski, B.R., *Anal. Chem.*, 1989,59, 1007A
- 15.-Thomas, E.V., Haaland, D.M., *Anal. Chem.*, 1990,62, 1091
- 16.-Ketterer, M.E., Rescht, J.J., Peters, M.J., *Anal. Chem.*,1989, 61, 2031
- 17.-Janatch, G. , Kruse-Jarres, J.D., Marbach, R., Heise, H. M., *Anal. Chem.*,1989, 61, 2016
- 18.-Otto, M., Thomas, J.D.R., *Anal. Chem.*, 1985,57, 2647
- 19.-Lindberg, W., Ohman, J., Wold, S., Martens, H., *Anal. Chim. Acta*, 1985,174, 41
- 20.-Carey, W.P., Wangen, L.E., Dyke, J.T., *Anal. Chem.*,1989, 61, 1667

- 21.-Otto, M., Wegscheider, W., *Anal. Chem.*, 1985, 57, 63
- 22.-Malinowski, E.R. y Howery D.G.; *Factor Analysis in Chemistry*; John Wiley and Sons. New York, 1980
- 23.-Kowalski, B.R. y Seasholtz, M.B.; *J. Chemom.*, 1991, 5, 129

- 24.- Geladi, P. y Kowalski, B.R.; *Anal. Chem. Acta*, 1986, 185, 1
- 25.- Frank, I.; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, 1990, 8, 108
- 26.- Wold, S.; *Chemom. Int. Lab. Sys.*, 1992, 14, 57
- 27.-Tauler, R., Izquierdo- Ridorsa, A., y Casassas, E.; *Anales de Química*, 1991, 87, 571
- 28.-Walpole, R.E., y Myers, R.H.; *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*, 3^a ed. Interamericana. México. 1990
- 29.-Barker, G.C. y Gardner, A.W.; *At. Energy Res. Establ. (GB). AERE Harwell C/R*, 1958, 2297
- 30.-Barker, G.C. y Gardner, A.W.; *Z. Anal. Chem.*, 1960, 173, 79
- 31.-Parry, E.P., y Osteryoung, R.A.; *Anal. Chem.*, 1964, 36, 1366
- 32.-Naes, T., Isaksson, T., Kowalski, B. R., *Anal. Chem.*, 1990, 62, 664
- 33.- Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1202
- 34.- Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1193
- 35.- Sekulic, S., Seasholtz, M.B., Wang, Z., Kowalsky, B. R., Lee, S.E., Holt, B.R., *Anal. Chem.*, 1993, 65, 835A
- 36.- Booksh, K.S.; Kowalski, B.R. *Anal. Chem.*, 1994, 66, 782A
- 37.- R.A. Harsman, *UCLA workings papers in phonetics*, 16, 1979
- 38.- J.Carroll, J. Chang, *Psychometrika*, 35, 1970
- 39.- I. Scarmio, M. Kubista, *Anal. Chem.* 1993, 65, 409,
- 40.-L. Sarabia, M.C. Ortiz, R. Leardi, G. Drava. *Anal. Chem.* 1993, 12, 226
- 41.- N.M. Faber, M.C. Buydens, G. Kateman, *J. Chemom*, 1994, 8, 147
- 42.-N.M. Faber, L.M.C. Buydens, G.J. Kateman, *J. Chemom*, 1994, 8, 273
- 43.- R.A. Harshman. *UCLA Working Papers in phonetics*, 1972, 22, 111
- 44.-J.B. Kruskal, *Psychometrika*, 1976, 41, 281

- 45.-J.B. Kruskal, *Linear algebra and its applications*, 18,95,1977
- 46.-J.B. Kruskal, *Unpublished manuscript, Bell Laboratoires*, Murray Hill, N.J. 1977
- 47.-R.B. Cattell, *Psychometrika*, 1944, 9, 267
- 48.-H.T. Eastment, W.J. Krzanowski, *Technometrics*, 1982, 24, 73
- 49.-Bro, R. Multi-way análisis in the food industry, Doctoral thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998
- 50.- Muñoz de la Peña, A.; Espinosa Mansilla, A.; González Gómez, D.; Escandar G.M., Goicoechea, H.C. *Anal. Chim. Acta.* .
- 51.- Kowalski, B.R.; Seasholtz, M.B.; *J. Chemom.*, 5, 129, 1991
- 52.- Martens, H.; Naes, T.; *Multivariate Calibration*, Wiley, Chichester, UK, 1989
- 53.-MATLAB 5.3. *The Math Works, Inc.* Massachusetts, USA, 1999
- 54.- <http://www.models.kvl.dk/source/>
- 55.- Olivieri, A.C.; *Cátedra de Química Analítica*. UNR, Rosario, Argentina
- 56.-Goicoechea, H.C.; Iñón, F.A.; Olivieri, A.C.; *Chemom. Intell. Lab. Syst.* (en prensa)
- 57.-Chen, Z.P.; Wu, H.L.; Jiang, J.H.; Li, Y.; Yu, R.Q.; *Chemometrics and intelligent laboratory systems*. 52, 75, 2000
- 58.-Wu, H.L.; Shibukawa, M.; Oguma, K.; *Journal Chemometrics* 12, 1, 1998
- 59.-Malinowski, E.R.; Kowalski, B.; *Chemometrics: Theory and Application*, ACS Symp. Ser. 52 American Chemical Society, Washington, DC, 1977, Cap. 3
- 60.-Malinowski, E.R.; Howery, D.G.; *Howery, Factor Analysis in Chemistry*, Wiley-Interscience, N.Y. 1980
- 61.-Woodruff, H.B.; Tway, P.C.; Cline Love, L.J.; *Analytical Chemistry*, 81, 53, 1981
- 62.-Wold, S.; *Technometrics*, 20, 1987
- 63.-Chen, Z.P.; Liang, Y.Z.; Jiang, J.H.; Li, Y., Qian, J.Y.; Yu, R.Q.; *Journal Chemometrics* 13, 15, 1999
- 64.-Bro, R., Kiers, H.A.L.; 17, 274, 2003
- 65.-Bro, R.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System*. 1992, 5, 143
- 66.-Kiers, H.A.L.; Krijnem, W.P; *Psychometrica*, 1991, 56, 147
- 67.-Alsberg, B.K.; Kwalheim, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 1994, 24, 31

- 68.-Alsberg, B.K; Kwalheim, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 1994, 24, 43,
- 69.- Kiers, H.A.L.; Harshman, R.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 1997, 39, 31,
- 70.- Bro, R.; Andersson, C.A.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 1998, 42, 105
- 71.-Andersson, C.A.; Bro, R.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.*, 1998, 42, 93
- 72.- Mitchell, B.C.; Burdick, D.S.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.* 1996, 34, 85
- 73.-Paatero, P.; *Chemometrics and Intelligent laboratory System.* 1997, 38,223,
- 74.-Kiers, H.A.L.; *Journal Chemometrics*, 1997, 12, 95,
- 75.- Harshman, R.A.; *UCLA Working Papers in Phoenetics* 1970, 16, 1,
- 76.-Carrol, J.D.; Chang, J.; *Psychometrika*, 1970, 35, 283
- 77.- Kruskal, J.B.; *Linear Algebra Appl.* 1977,18, 95
- 78.- Kruskal, J.B.; *Psychometrika*, 1976, 41, 281
- 79.- Messick N.J, Kalivas J.H, Lang P.M., *Anal. Chem.* 1996, 68, 1572
- 80.- Cuadros Rodríguez L., García Campaña A.M., Jiménez Linares C., Román Ceba M., *Anal. Lett.* 1993, 26, 1243
- 81.- González A.G., Herrador M.A., Asuero A.G., *Talanta*, 1999, 52, 727

1.-INTRODUCCIÓN. CICLODEXTRINAS

El objetivo de este Capítulo es realizar un estudio de diferentes sulfamidas, poco o nada fluorescentes, en diversos medios organizados, con el objetivo de aumentar su eficacia cuántica de fluorescencia, sin necesidad de utilizar reacciones de derivatización o reacciones de fotoinducción.

Estructura y propiedades

En 1891 Villiers aísla, del *Bacillus Macerans*, un grupo de oligosacáridos, inusuales, no reductores, que crecen en un medio rico en amilosa, como productos de degradación del almidón. Pero no fue hasta 1904 cuando Schardinger llevó a cabo la elucidación de la estructura de estos compuestos, resultando ser oligosacáridos cíclicos que contenían de 6 a 11 unidades de glucosa. Por esta razón, algunos autores, sobre todo en la literatura antigua, denominan a las ciclodextrinas (CDs), cicloamilosas o dextrinas Schardinger [1].

En 1938, Freudenberg y col. observan que las CDs están construidas por uniones $\alpha[1\rightarrow4]$ de unidades de glucosa. Sin embargo, los pesos moleculares de las ciclodextrinas más comúnmente utilizadas, α , β y γ , no se determinaron hasta mucho más tarde. Freudenberg descubre que estas moléculas podían formar compuestos de inclusión y, al igual que French y col., ponen a punto procedimientos para la síntesis de CDs puras.

Cramer y col [2], estudiaron sistemáticamente los procesos de formación de los complejos ciclodextrina : huésped demostrando que las ciclodextrinas son moléculas rígidas que se comportan como anfitriones moleculares en la formación de complejos de inclusión.

La hélice de almidón se hidroliza por enzimas que no son específicas del lugar de la hidrólisis, por lo que el producto resultante contiene α , β , γ y δ -CD con 6, 7, 8 y 9

unidades de glucosa, respectivamente y, en menor cantidad, ciclodextrinas con 10-13 unidades de glucosa, que se identificaron por métodos cromatográficos [2]. En cambio, las constituidas por menos de 6 unidades de glucosa no se sabe que existan, debido a los impedimentos estéricos.

Las tres ciclodextrinas más interesantes desde el punto de vista analítico son α -, β - y γ -ciclodextrina, y pueden ser aisladas mediante precipitación selectiva o cromatografía de adsorción. Las estructuras químicas de estas tres ciclodextrinas se representan en la Figura IV.1.

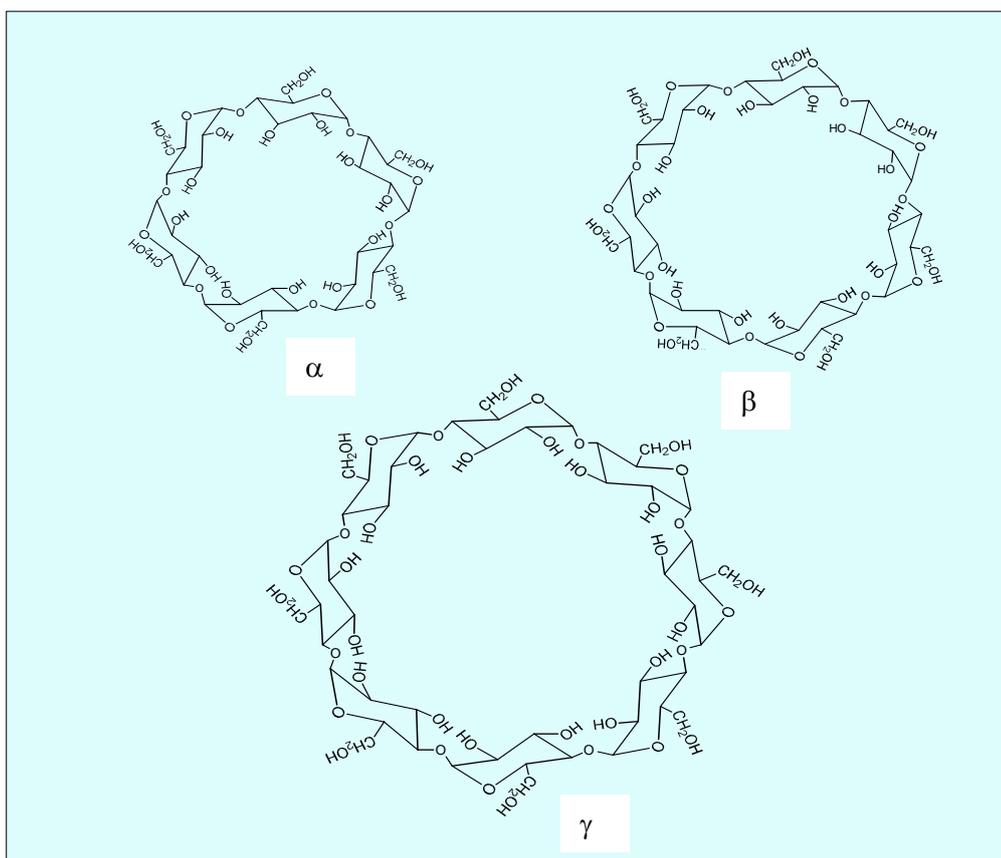


Figura IV.1- Estructuras químicas de α -, β - y γ -ciclodextrina

Los diámetros de las cavidades de estos oligosacáridos cíclicos dependen del número de unidades de glucosa que componen cada ciclodextrina. Los valores de sus diámetros, junto con otros datos físicos, se recogen en la Tabla IV.1.

Tabla IV.1.- Datos físicos sobre las ciclodextrinas

	α	β	γ
Masa molecular	972,8	1135	1297
Diámetro de la cavidad (Å)	5,7	7,8	9,5
Volumen de la cavidad (Å³)	176	346	510
Anchura (Å)	13,7	15,3	16,9
Altura (Å)	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1	7,9 ± 0,1
Solubilidad en agua (g/100 mL)	14,5	1,85	23,2
Valores de pK_a	12,3	12,2	12,1
Nº de moléculas de agua incluidas	6	11	17

Hay que destacar la baja solubilidad de la β -CD en comparación con las otras. Como se observa en la Tabla IV.1, 100 mL de agua disuelven 14.5 g de α -CD, 23.2 g de γ -CD y tan sólo 1.85 g de β -CD, a temperatura ambiente.

En cuanto a su estabilidad, hay que resaltar que son muy estables en medio alcalino, pero se hidrolizan en medios fuertemente ácidos [3]. La estabilidad hacia la hidrólisis ácida depende de la temperatura y de la acidez del medio. Las constantes de

velocidad de hidrólisis varían sensiblemente. En términos generales, se puede decir que, a pH superiores a 3.5 y temperatura inferior a 60 °C, las CDs son bastante estables.

Por otra parte, aunque bajo radiación γ pueden romperse los enlaces 1,4 glicosídicos, las formas cristalinas de β - y γ -CD suelen ser bastante resistentes a la luz dentro de los rangos UV-visible e IR [3].

Los productos de la reacción que tiene lugar entre la enzima ciclodextrina transglicosilasa (CTG) y una solución de almidón pretratada con α -amilasa, son α , β y γ -CD, con 6, 7 y 8 unidades de glucosa, respectivamente. De todas ellas, la β -CD es el producto mayoritario.

Dadas las adecuadas dimensiones para incluir moléculas relativamente grandes en su interior, la más empleada de las ciclodextrinas y, por tanto, la más interesante desde el punto de vista analítico es la β -CD. Si también se tiene en cuenta el precio, entonces no hay duda que es el agente complejante de fármacos más prometedor. Por contra, α -CD suele ser empleada para moléculas pequeñas, mientras que γ -CD sólo podría utilizarse con moléculas grandes del tipo de los esteroides [4] o antibióticos [5], siendo su coste demasiado elevado.

Aunque la cavidad de γ -CD es mayor que la de β -CD, la energía de estabilización resultante, tanto de la expulsión del agua como de la inclusión del analito, es mayor para β que para γ -CD. Como resultado de ello, los complejos de inclusión formados con β -CD son generalmente más estables [6]

La β -CD presenta, no obstante, ciertas limitaciones en su utilización. De una parte, su baja solubilidad, aunque se produzca un aumento de la solubilidad de los analitos al formar complejos. De otra, presenta una elevada tendencia a cristalizar, así, cuando se administra parentalmente, no se metaboliza y se acumula en el riñón,

formando complejos cristalinos insolubles de colesterol, dando lugar a severos síntomas nefrotóxicos [6]. Por estas razones, la β -CD, antes de ser usada, debe ser modificada para mejorar su solubilidad y limitar su elevada tendencia a cristalizar.

Estos hechos han dado lugar a numerosas β -CDs en las que las modificaciones más frecuentes son: la sustitución del átomo de H de uno de los grupos hidroxilos primarios o secundarios, sustitución de uno o más grupos hidroxilos primarios o secundarios, eliminación de los átomos de H de los grupos $-\text{CH}_2\text{OH}$, convirtiéndolos en $-\text{COOH}$, o rotura de uno o más enlaces $\text{C}_2\text{-C}_3$ a través de un proceso de oxidación.

El esquema funcional de la molécula de ciclodextrina se muestra en la Figura IV.2. Su característica forma de toroide es debida a la conformación tipo C_1 de los residuos individuales de glucosa [1,7] y sus enlaces en posición α -(1,4). Debido a la aparente falta de rotación libre alrededor del enlace glicosídico que conecta las unidades de glucosa, las ciclodextrinas no son moléculas perfectamente cilíndricas, sino que tienen forma de cono. La cara 6-hidroxil es el lado más estrecho, mientras que la 2,3-hidroxil es algo más ancha.

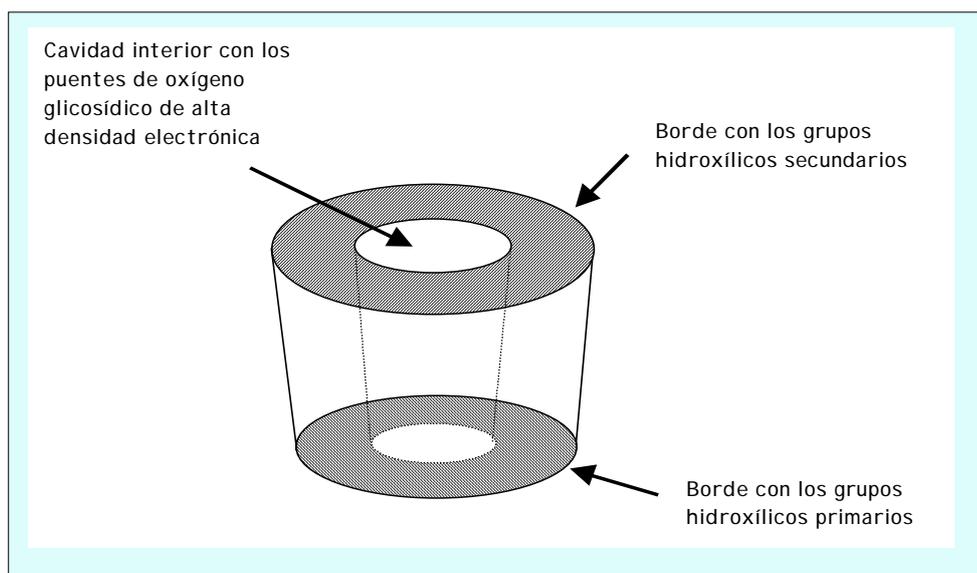


Figura IV.2- Esquema funcional de la molécula de ciclodextrina.

Los grupos hidroxílicos primarios y secundarios, localizados en los extremos opuestos de la cavidad, y los puentes de oxígeno glicosídico que la revisten interiormente, dan a la molécula de CD dos regiones de diferente polaridad [1,7,8] y dependiendo de ésta, pueden unirse a distintos analitos. En disolución acuosa, la unión se traduce en que el analito está protegido de aquellos componentes que se encuentran en el disolvente acuoso. En muchos casos, las solubilidades en agua de especies hidrofóbicas aumentan debido a este proceso de complejación.

La naturaleza hidrofílica del exterior de la ciclodextrina aumenta por los grupos hidroxílicos. Puentes de hidrógeno intramoleculares, entre los grupos hidroxílicos de los carbonos C₂ y C₃ de las moléculas adyacentes de glucosa, estabilizan la forma de la ciclodextrina, y contribuyen a la naturaleza hidrofílica de ésta. En consecuencia, estas moléculas son bastante solubles en agua.

Por el contrario, el interior de la ciclodextrina es no polar, debido a la alta densidad electrónica de los puentes de oxígeno. Esta naturaleza no polar de la cavidad, les hace ser un medio atractivo para especies moleculares hidrofóbicas. Esta polaridad de la cavidad ha sido comparada con la del etanol, habiéndose comprobado que la adición de una pequeña cantidad de este alcohol a disoluciones acuosas de ciclodextrina, incrementa la solubilidad de las mismas [9].

En disolución acuosa, pueden residir varias moléculas de agua en la cavidad de la ciclodextrina (Tabla IV.1). Estudios de difracción neutrónica y de rayos X, del complejo cristalino α -CD:agua, muestran que la presencia de agua altera la conformación usual del macrociclo. Los puentes de hidrógeno formados entre el agua incluida y los puentes de oxígeno glicosídico, distorsionan los puentes de hidrógeno intramoleculares normales de la ciclodextrina y, en consecuencia, aumenta la tensión del anillo. Esta tensión viene acompañada por un aumento en la energía del sistema. Por otra parte, estudios espectroscópicos de las CDs en medio acuoso, sugieren que la

conformación de las CDs en disolución es casi idéntica a la que tienen en estado cristalino.

Formación de complejos de inclusión

En la Figura IV.3 se representa esquemáticamente el proceso de formación de un complejo de inclusión en β -ciclodextrina, en disolución acuosa[8].

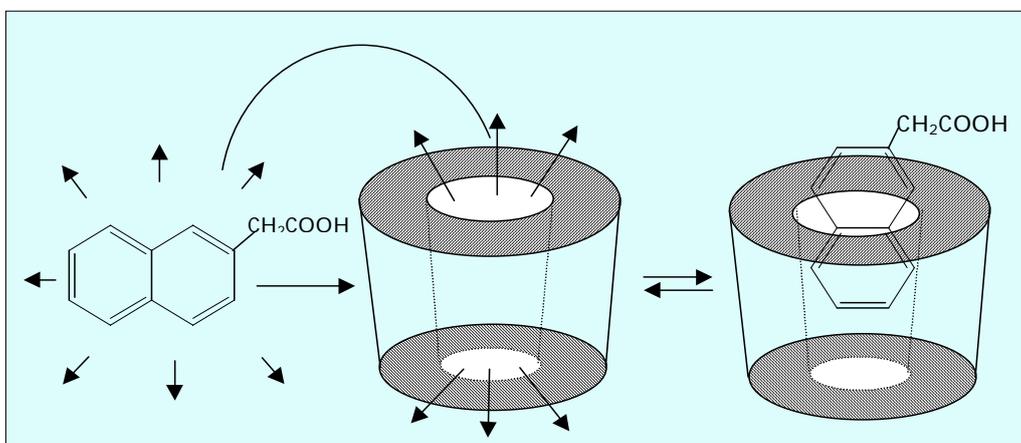


Figura IV.3.- *Proceso de formación de un complejo de inclusión en β -CD.*

La sustitución del agua por un compuesto hidrofóbico, analito, está favorecida al disminuir la tensión del anillo, cuando el compuesto incluido restituye su configuración normal de puentes de hidrógeno intramoleculares. La complejación, por tanto, es consecuencia de varios factores que incluyen la disminución de la tensión del anillo después de la inclusión del analito y la expulsión de la cavidad de las moléculas de agua altamente energéticas [1,7].

Por otra parte, si se la compara con la hidratación de los componentes individuales, la hidratación del complejo de ciclodextrina está favorecida energéticamente. Aún cuando durante el proceso de complejación no se formen enlaces

covalentes, pueden ocurrir interacciones de Van der Waals y originarse enlaces por puentes de hidrógeno entre la ciclodextrina y la molécula incluida. Estas débiles interacciones, en combinación con el hecho de que el proceso de complejación es favorable desde el punto de vista energético, dan generalmente lugar, para una variedad de moléculas orgánicas, a constantes de estabilidad comprendidas entre 100 y 5.000 M^{-1} .

El grado de complejación, entre la ciclodextrina y la molécula que se incluye, depende de la compatibilidad del tamaño de la cavidad de la ciclodextrina y el tamaño y forma del compuesto incluido.

Así, un compuesto demasiado grande como para poder incluirse en α -CD, puede tener tamaño apropiado para ser incluido en la cavidad de una β -CD, que es mayor. Igualmente, una molécula que sea demasiado grande para incluirse dentro de β -CD, puede ser compatible con el tamaño de γ -CD. Cuando el analito, dado su tamaño, no puede incluirse por completo, su porción hidrofóbica compatible puede hacerlo en la CD y, la parte no incluida, puede participar en la formación de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxílicos de la ciclodextrina, si esto es posible.

En la Figura IV.4 se representan esquemáticamente las dimensiones comparativas de las tres ciclodextrinas más utilizadas [7].

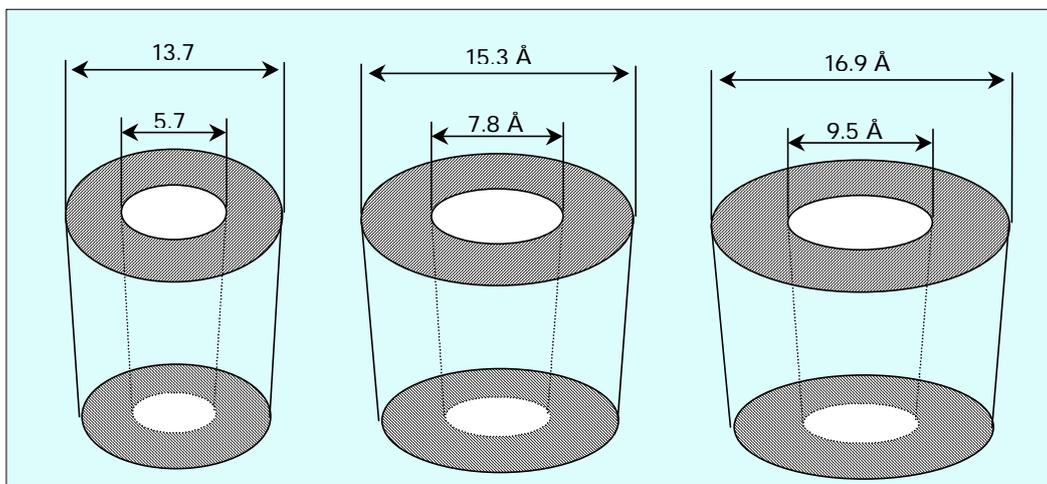


Figura IV.4.- Dimensiones comparativas de α -, β - y γ -CD.

La orientación de la molécula invitada en la cavidad está relacionada con su hidrofobicidad y geometría. Así, se ha demostrado que derivados del naftaleno con varios sustituyentes, tienen diferentes orientaciones en la cavidad de β -CD. Éstas vienen determinadas por la polaridad y lugar en el que se encuentre el grupo sustituyente, así como por el tamaño molecular del compuesto incluido [10].

La complejación sólo sucede en disolución y, dado que la solubilidad de la CD aumenta con la temperatura, el empleo de altas temperaturas permite alcanzar una gran concentración inicial de β -CD. Por otra parte, la mayoría de los complejos formados tienen una solubilidad muy limitada y, normalmente, cristalizan a temperatura ambiente.

Otro aspecto importante cuando se examinan estos complejos de inclusión es la estequiometría, ya que se han observado estequiometrías diferentes a la 1:1. Entre los casos que se dan en disolución acuosa, se encuentran los complejos de estequiometría 1:2, en los cuales dos moléculas de analito residen en una cavidad de la ciclodextrina, así como complejos de estequiometría 2:1, en los que dos moléculas de ciclodextrina encapsulan una molécula de analito [7,11]. También pueden formarse complejos ternarios, en los que dos compuestos diferentes se incluyen en la cavidad de una ciclodextrina. Así, se ha demostrado que una molécula de éter dietílico y una de antraceno pueden residir simultáneamente en la cavidad de β -CD [7]. La determinación de la estequiometría del complejo es crucial para una cuantificación precisa de las constantes de formación.

Dado que el proceso de complejación implica una interacción estereo-selectiva, que produce una protección de la especie que se incluye, las CDs se han utilizado en la industria farmacéutica para encapsular fármacos sensibles a la luz y aumentar la solubilidad de fármacos moleculares hidrofóbicos [8].

En procesos de separación, las ciclodextrinas se han empleado para mejorar la resolución de enantiómeros en cromatografía en fase inversa, empleándolas en las fases móviles [12], o bien en columnas de fases enlazadas de éstas [13,14], así como para catalizar reacciones estereo-selectivas[15].

Con respecto a otros medios organizados, tales como las micelas, las ciclodextrinas presentan varias propiedades deseables desde un punto de vista analítico: no es necesaria una concentración crítica para incluir moléculas en su interior, son estables en un amplio rango de pH y resistentes a la luz, presentan muy poca o ninguna absorción en la región UV y no son tóxicas ni forman espuma cuando se desoxigenan mediante el paso de un gas.

Otra de sus propiedades, es la de intensificar las señales de fluorescencia y de fosforescencia de diferentes luminóforos, lo que las hace particularmente útiles, desde el punto de vista analítico, en el desarrollo y optimización de métodos de determinación mediante luminiscencia molecular.

La intensificación de los procesos luminiscentes se debe a que las moléculas que se introducen en la cavidad interna de las ciclodextrinas se aíslan del ambiente que las rodea y sus estados excitados están más protegidos de los procesos de atenuación o "quenching" de fluorescencia y de otros procesos de decaimiento no radiante que ocurren en disolución. La inclusión causa restricción en la movilidad molecular y/o alteraciones en la polaridad local. Así, se han utilizado para incrementar las intensidades de fluorescencia de distintos compuestos orgánicos mediante un proceso de encapsulamiento parcial o de inclusión. El proceso, además, provoca generalmente un cambio del máximo de emisión hacia longitudes de onda más bajas y un cambio del espectro de absorción hacia longitudes de onda más altas.

Las principales ventajas, que pueden derivarse de este hecho, son el incremento de la eficiencia del fenómeno de emisión, la ganancia de sensibilidad, el uso de un medio acuoso para realizar la determinación, así como la prevención de reacciones laterales que pueden conducir a interferencias por parte de la disolución. Una de las más importantes aplicaciones potenciales de las ciclodextrinas es la protección de la molécula incluida del efecto de oxidación y de degradación fotoquímica.

Toxicidad

El metabolismo de degradación de las ciclodextrinas y del almidón es comparable, aunque no son metabolizadas tan rápidamente, debido a que son degradadas por la α -1,4-gluconohidrasa más lentamente que las dextrinas lineales [16], y tampoco son hidrolizadas por las enzimas que actúan sobre los grupos terminales.

En 1957, se publicaba que la administración oral de estos compuestos era altamente tóxica [16]. Estudios toxicológicos y metabólicos más detallados se llevaron a cabo en ratas y perros, encontrándose que eran falsas estas primeras publicaciones. A partir de entonces, las legislaciones sanitarias de muchos países autorizaron su uso en alimentos. Las fechas de legalización y utilización varían de unos países a otros. En 1978, se legalizan en Japón y, en 1983, en Hungría como estabilizantes de sabores. En Francia, Holanda, Bélgica y Luxemburgo lo hacen en 1986. Un año después, son empleadas en España, en alimentos; por Estados Unidos, en los chicles; y, por Alemania, en fármacos.

De acuerdo con los informes de la FAO (Food Agriculture Organization), el almidón modificado enzimáticamente, lo que incluye a las CDs, es inocuo para el consumo humano. De hecho, se han efectuado diversos estudios enzimáticos y toxicológicos, con el fin de comprobar cómo actúan éstas al incorporarse a la ruta metabólica del ser vivo.

Cuando son administradas oralmente, íntegras, sólo se absorben cantidades insignificantes a través de la región intestinal. La mayor parte de la CD absorbida se metaboliza en el colon por la microflora bacteriana. Los metabolitos primarios, maltodextrinas acíclicas, maltosa y glucosa, son además metabolizados y absorbidos de la misma forma que el almidón, y excretados como CO₂ y H₂O.

La diferencia principal, entre el metabolismo del almidón y de las CDs, es que el primero es metabolizado en el intestino delgado y las segundas, en el colon. Las intensidades máximas de los metabolitos se observan aproximadamente 1-2 horas después de su consumo, en el caso del almidón y, de 6-8 horas, en el caso de las CDs.

Aplicaciones industriales y farmacéuticas

Los complejos que se forman con CDs son de interés para la investigación científica dado que, mientras que los clatratos clásicos no existen en disolución acuosa, las CDs sí y, por tanto, pueden ser usadas para estudiar las interacciones hidrofóbicas, tan importantes en los sistemas biológicos.

Son varios los usos de las CDs. Pueden ser empleadas ventajosamente en la producción de fármacos, pesticidas, comestibles y artículos de aseo. Los compuestos de interés, encerrados dentro de sus cavidades, se encuentran protegidos de los efectos de la luz y la atmósfera, pueden ser manejados fácilmente y almacenados en forma de polvos.

De otra parte, sustancias que no son solubles en agua, llegan a serlo en presencia de CDs. Se utilizan también para estabilizar cremas y emulsiones, y para aumentar el crecimiento y rendimiento de las cosechas de grano.

En cuanto a las aplicaciones farmacéuticas, hay dos importantes áreas de aplicación de las ciclodextrinas: aumento en la biodisponibilidad de algunos fármacos y protección de sustancias contra la oxidación, descomposición, hidrólisis, etc [17].

En agroquímica, el hecho de que muchos pesticidas, herbicidas, insecticidas y fungicidas pueden formar complejos con β -CD, se aprovecha debido a las diferentes ventajas que conlleva [18]. Así, se consigue un efecto de estabilización de sustancias que son biodegradables, sensibles a la luz, al calor, al oxígeno y a iones, llegando a ser compatibles con otros constituyentes en las formulaciones agroquímicas.

Se reduce la volatilidad y el mal olor en líquidos volátiles de sustancias cristalinas sublimables, que pueden ser transformados en polvos sólidos estables. Por otra parte, hay muchas sustancias que tienen un olor muy desagradable, pero cuando son complejadas, el producto obtenido es prácticamente inodoro y su efecto biológico sigue siendo el mismo.

Llegan a ser solubles sustancias poco mojables y escasamente solubles, cuando se incluyen en la cavidad de la CD, mejorando así su biodisponibilidad y permitiendo una mayor efectividad empleando dosis más pequeñas, lo que implica una reducción en el coste, cuando se trabaja con sustancias costosas.

Normalmente, los desinfectantes empleados en suelos se aplican cuando la tierra está seca y puede ser tratada con máquinas. El pesticida complejado se pone en libertad cuando dicho complejo entra en contacto con la lluvia, momento exacto en el que ejerce su máximo efecto, pues la posibilidad de matar los insectos es más favorable en suelos húmedos que en secos.

La efectividad biológica de insecticidas sólidos que se usan en suspensión, aumenta al disminuir el tamaño de las partículas. Reducir el tamaño de éstas es un procedimiento costoso que implica un consumo energético y, a veces, sin éxito, al

permanecer las partículas unidas como resultado de la carga eléctrica. Sin embargo, los complejos formados con las CDs no experimentan carga eléctrica, de ahí su importancia.

Otros campos de aplicación de estos compuestos son los alimentos, cosméticos y tabaco. Muchos ingredientes de comestibles no pueden ser usados en productos procesados. Acciones como cocinar, hornear o freír, destruyen muchos sabores, colores naturales y vitaminas. La naturaleza inestable de estos ingredientes, a menudo restringe el tiempo de durabilidad antes de la venta del producto. En cambio, los complejos de β -CD con aceites esenciales, saborizantes, vitaminas y colores naturales son estables. La complejación previene la evaporación y el ataque del oxígeno y los elementos químicos.

El olor fuerte de muchas sustancias, tales como el aceite de cebolla, de ajo o las piracinas limitan su uso. Los complejos formados con este tipo de compuestos son fáciles de usar y almacenar, no van a ser destruidos en la elaboración del producto y liberarán a su huésped, el aceite, en la humedad de la boca para que el sabor pueda apreciarse.

Se emplean también ciclodextrinas para aumentar las propiedades organolépticas de los chicles, aumentando el tiempo de permanencia de los aromas, gracias a su interacción con el aceite de menta verde. Esta aplicación no sólo es importante desde el punto de vista industrial, sino también farmacéutico, ya que con él se consigue enmascarar durante mayor tiempo el mal sabor de algunos medicamentos, potenciando por otro lado el buen sabor que se origina al emplear el aceite de menta verde.

Se han propuesto gran número de aplicaciones de cosméticos que forman complejos con CDs. El más obvio es el uso de complejos que perfuman los polvos de talco.

Los saborizantes del tabaco, rociados o espolvoreados sobre este producto, son de naturaleza muy volátil y se pierden durante el procesado y almacenamiento. Complejados con β -CD permanecen inalterables en la mezcla de tabaco, hasta que son liberados por ignición.

Casi todas las aplicaciones de estos compuestos, en fármacos, implican una complejación. En muchos casos, el complejo es el estado final y se refina hacia una forma más o menos pura, para utilizarse como sustancia cristalina en dosis sólidas de fármacos, como potenciadores del sabor. En algunos casos, sin embargo, el proceso de complejación es sólo un estado transitorio, cuando se utilizan para catálisis o separación de mezclas.

Cada vez, mayor número de artículos [19-30] y patentes están dedicados a las aplicaciones industriales de las CDs y, al menos la mitad de ellos, tratan de aplicaciones farmacéuticas. Sus muchos usos y gran disponibilidad, junto con las consideraciones económicas, juegan un papel decisivo en su creciente interés.

Cuando un fármaco entra a formar parte del complejo de inclusión, sus propiedades físicas y químicas se modifican, normalmente, de forma ventajosa. En términos de la estabilidad física y química, los complejos de compuestos volátiles son menos propensos a evaporarse y, los compuestos oxidables, son protegidos contra la oxidación del aire. En estos compuestos, las velocidades de las reacciones de descomposición, desproporción, polimerización y autocatálisis, disminuyen considerablemente y su sensibilidad a la luz, los jugos gástricos, etc... se reduce.

También hay que tener en cuenta que la biodisponibilidad de las sustancias que son poco solubles en agua se mejora. En los complejos de CDs, los fármacos poco solubles en agua llegan a la sangre más rápidamente y en concentraciones más elevadas, lo que sugiere la posibilidad de reducir la dosis.

La primera patente en la preparación de complejos de fármacos con CDs se registró en 1953, por Freudenberg, Cramer y Plieninger [31].

Aplicaciones analíticas

Dado que el número de trabajos científicos relacionados con las aplicaciones analíticas de ciclodextrinas que se encuentran en bibliografía es muy elevado, en este apartado, se describe únicamente la experiencia de nuestro grupo de investigación. Un amplio resumen de dichas aplicaciones analíticas está recogido en la Tesis Doctoral de Dña. Antonia Bautista Sánchez, perteneciente a nuestro Departamento [32].

La experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio de las aplicaciones analíticas de ciclodextrinas es amplia [33,34]. Así, se han estudiado detalladamente la complejación de pireno en β - y γ -CD [35], así como de estos complejos en presencia de una serie de alcoholes con los que se forman complejos ternarios de gran estabilidad [36,37]. Estos últimos, han sido utilizados como co-modificadores de la fase móvil en HPLC, con disoluciones metanol:agua: β -CD [38,39]. Igualmente, se han estudiado las características de los complejos ternarios formados por pireno en β -CD, en presencia de tert-butilamina, n-propilamina [40] y trietanolamina [41].

Se han establecido las características de los complejos de inclusión acridina: β -CD en agua [42], en presencia de terc-butanol y ciclopentanol [43], de Triton X-100 en β -CD [44] y de dextrorubicina en β -CD y γ -CD [45].

Asimismo, se han estudiado las características luminiscentes de los complejos de inclusión formados por dos pesticidas derivados del naftaleno, ácido 1-naftilacético y 2-naftiloxiacético [46].

La determinación fluorimétrica de ácido nalidíxico mediante complejación con γ -CD [47] y de sulfametoxazol mediante inclusión en disoluciones de β -CD, en urea [48] ha sido puesta a punto; y se han desarrollado estudios básicos sobre la influencia de β -CD y 2-HP- β -CD en la fotooxidación de fenotiacina [49,] y de azureno A [50].

Muñoz de la Peña y col. [51] han estudiado la fluorescencia que presenta 1,4-difenil-1,3-butadieno cuando es incluido en α -, β - y γ -ciclodextrina. Se determina la estequiometría del complejo formado con cada ciclodextrina, comprobándose el diferente comportamiento que presenta el analito en α -CD, con respecto a β -CD o γ -CD.

Las propiedades fluorescentes del ácido 7-hidroximetilnalidíxico en disoluciones acuosas de γ -CD [52] han sido estudiadas, además de comprobar que el complejo que se forma presenta una estequiometría 1:1.

Recientemente, herbicidas de la familia de las fenilureas se han determinados en disolución acuosa, empleando fluorescencia inducida fotoquímicamente [53,54].

Se han estudiado las propiedades fosforescentes (RTP) de los complejos ternarios acenafteno- γ -ciclodextrina en presencia de distintos bromoalcoholes [55], 1-naftalenacetamida- β -ciclodextrina-1,3-dibromopropano [56], 1-bromonaftaleno- β -ciclodextrina en presencia de diferentes alcoholes y surfactantes [57] y ácido 1-naftalenoacético- β -ciclodextrina-1,3-dibromopropano [58].

Muñoz de la Peña y col. han estudiado la emisión de fosforescencia a temperatura ambiente (RTP) del complejo 6-bromo-2-naftol- α -ciclodextrina en medio acuoso [59].

Durán y col. han estudiado mediante fluorescencia el complejo de inclusión ácido pipemídico- γ -ciclodextrina y han propuesto un método para la determinación de ácido pipemídico en presencia de esta ciclodextrina [60].

Interacción de sulfamidas con ciclodextrinas

En la bibliografía hay sólo un pequeño número de trabajos referentes al estudio de la interacción entre diversas sulfamidas y ciclodextrinas. Dichos estudios, además, están fundamentalmente referidos al establecimiento de las características del proceso de inclusión, más que a su utilización con fines analíticos.

El primer trabajo referente a los complejos de inclusión de sulfamidas y ciclodextrinas data de 1971, en que Shin Hong Min [61] estudió las interacciones de una serie de sulfamidas con β -CD, mediante medidas de solubilidad. A partir de la influencia de la concentración de β -CD en el medio sobre la solubilidad de diversas sulfamidas, determinó la estequiometría y las constantes de estabilidad de los correspondientes complejos de inclusión. Encontró en todos los casos que la estequiometría era 1:1 y calculó las constantes de estabilidad de los complejos.

Posteriormente, Uekama y col. [62] estudiaron los complejos de inclusión de una serie de sulfamidas con β -ciclodextrinas, mediante dicroísmo circular, espectrofotometría UV y estudios de solubilidad. Encontraron que, al formarse el complejo de inclusión con β -CD, los picos de absorción UV generalmente se desplazan hacia longitudes de onda mayores, decreciendo ligeramente la absorbancia. Cambios espectrales similares se observaron, asimismo, cuando los analitos se disolvían en disolventes menos polares que el agua, como etanol o dioxano, lo cual indicaba que los grupos cromóforos de los analitos se encontraban localizados dentro de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina.

Hicieron, asimismo notar que los fármacos que contenían grupos sulfuro como sustituyentes, como sulfatiazol y sulfametoxina, mostraban los mayores cambios en las elipticidades molares y en los espectros UV. Establecieron que la estequiometría de los complejos era 1:1, mediante la aplicación del método de las variaciones continuas a los cambios en la elipticidad molar para el sistema sulfatiazol : β -CD. Calcularon,

asimismo, las constantes de estabilidad de una serie de sulfamidas con β -CD a 25 °C, mediante medidas de solubilidad y mediante espectrofotometría UV. Posteriormente, [63] determinaron las constantes de estabilidad de los complejos, midiendo los cambios producidos en presencia de β -CD, en la fase móvil, mediante HPLC.

Los autores hacen asimismo un estudio del espectro $^1\text{H-RMN}$ de las sulfamidas en presencia de β -CD, encontrando que las señales del grupo fenilo de las sulfamidas mostraban unos desplazamientos significativos hacia campos más altos y el espectro se ensanchaba, mientras que no se notaban cambios apreciables en los sustituyentes heterocíclicos de las drogas en HCl 0.1 M. Esto sugiere que, en la mayor parte de los casos el anillo fenólico estaba predominantemente incluido en la cavidad de la ciclodextrina.

De acuerdo a Bender y Komiyama [1], la molécula de sulfonamida se aproxima y penetra en la cavidad de la ciclodextrina, a través del anillo con los grupos hidroxilo secundarios, que es el más abierto y accesible de la cavidad.

Se han separado [64] y analizado mezclas de varias sulfamidas mediante cromatografía líquida de alta resolución con detección fotométrica, utilizando una fase estacionarias de sílica gel unida químicamente a β -CD. Como fase móvil se utilizó tampón fosfato de pH 7.0 en metanol. Las mezclas que se analizaron eran las utilizadas en dos preparados farmacéuticos, trisulfapirimidina y polisulfa.

Las tabletas de trisulfapirimidina estaban constituidas por sulfadiacina, sulfadimidina (sulfametacina) y sulfameracina, mientras que las tabletas de polisulfa estaban constituidas por sulfadiacina, sulfatiazol, sulfadimidina y sulfameracina.

Encontraron que, de acuerdo con los valores de constantes de estabilidad anteriormente determinados por Uekama y col [62,63], sulfatiazol interacciona fuertemente con β -CD y se retiene más tiempo, exhibiendo por tanto un tiempo de

retención mayor que el resto de las sulfamidas estudiadas, ya que la sulfacetamida interacciona débilmente con β -CD y se eluye muy rápidamente, con un tiempo de retención muy corto en consecuencia.

Para una mezcla de siete sulfamidas ensayadas, el orden de elución encontrado fue: sulfacetamida, sulfadiacina, sulfameracina, sulfafenzol, sulfaguanidina, sulfadimidina y sulfatiazol.

Uekama y col. [65], estudiaron por su parte el complejo de inclusión formado entre β -CD y sulfatiazol, en disolución acuosa, mediante resonancia magnética nuclear de ^{13}C . Los cambios encontrados en los desplazamientos de las señales espectrales sugerían una interacción predominantemente hidrofóbica, entre las dos especies.

Los complejos de inclusión de una serie de sulfamidas con β -CD son objeto de estudio por varios autores. Así, se han investigado los complejos formados con sulfadiacina, sulfameracina y sulfamonometoxina mediante difracción de rayos X [66]. Igualmente, se han determinado las constantes de estabilidad de los complejos de una serie de sulfamidas con β -CD mediante HPLC y los resultados, comparados con los del método de solubilidad [67]. Las sulfamidas estudiadas fueron: sulfameracina, sulfisoxazol, sulfapiridina, sulfafenzol, sulfadimetoxina, sulfatiazol, sulfadiacina y sulfisomidina.

En cuanto a la interacción de β -CD con sulfametoxazol, se ha investigado desde el punto de vista de su aplicación farmacéutica. Se ha utilizado β -CD para preparar tabletas de sulfametoxazol, encontrándose que se solubiliza más despacio que cuando se utiliza manitol. Asimismo, el complejo sulfametoxazol: β -CD ha sido utilizado para la preparación de supositorios [69].

ANÁLISIS DE SULFAMETOXAZOL Y SULFAGUANIDINA

Respecto del análisis conjunto de estas sulfamidas, en la bibliografía se encuentran que la mayoría de los métodos utilizados hacen uso de técnicas de separación utilizando diferentes métodos de detección.

Se utilizan ampliamente los métodos cromatográficos que utilizan espectrometría de masas como detección [70,71,72]. Asimismo se hace uso de detección con fotodiodo tras llevar a cabo una reacción fotoquímica a dichas sulfamidas [73]; se utiliza una reacción de derivatización [74]; o se emplea la cromatografía para el análisis de dichos analitos [75,76].

Se encuentran también algunos métodos espectrofotométricos [77] y métodos de inyección en flujo con determinación quimioluminiscente[78].

En cuanto al análisis de estas dos sulfamidas en orina, los dos métodos encontrados hacen uso de métodos cromatográficos [76,70]. También se utilizan métodos de separación para la determinación de ambas en miel [80,75].

Para la determinación de sulfaguanidina en miel, la cromatografía líquida es la más utilizada [81-84] así como para la determinación de ambas sulfamidas en miel [80].

No se ha encontrado ningún trabajo en el que se haga uso de ciclodextrinas para la determinación de sulfaguanidina, de ahí la importancia del estudio realizado; encontrándose dos trabajos para el caso de análisis de sulfametoxazol con β -ciclodextrina [87,88].

2.-PARTE EXPERIMENTAL

Las sulfamidas estudiadas se dividen en dos grupos: no heterocíclicas, entre las que tenemos sulfanilamida (SAN), sulfaguanidina (SGN) y sulfacetamida (SACE); y sulfamidas heterocíclicas, como: sulfametazina (SMT), sulfamerazina (SMR), sulfatiazol (ST), sulfametoxazol (SMTX), sulfadiazina (SDZ), sulfapiridina (SPY), sulfaquinoxalina (SQX) y sulfadimetoxazol (SDMTX). Los medios organizados estudiados fueron: α -ciclodextrina, β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, 2-Hidroxipropil- β -ciclodextrina (*H* β -ciclodextrina) y Heptakis-(2,6-dimetil)- β -ciclodextrina (*DIMEB*).

Después de realizar varias pruebas, utilizando una concentración de sulfamida de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ y una concentración de ciclodextrina 9.10^{-3} M , se concluyó que las únicas sulfamidas que sufrían algún tipo de inclusión eran SGN y SMTX, (Figura IV.5) y las ciclodextrinas que permitían alcanzar una mejor sensibilidad, eran β -ciclodextrina, *H* β -ciclodextrina y *DIMEB*, como puede observarse en la Figura IV.6; De entre ellas, se seleccionó β -ciclodextrina debido a que producía mayor aumento de rendimiento cuántico, así como una señal de fondo menor.

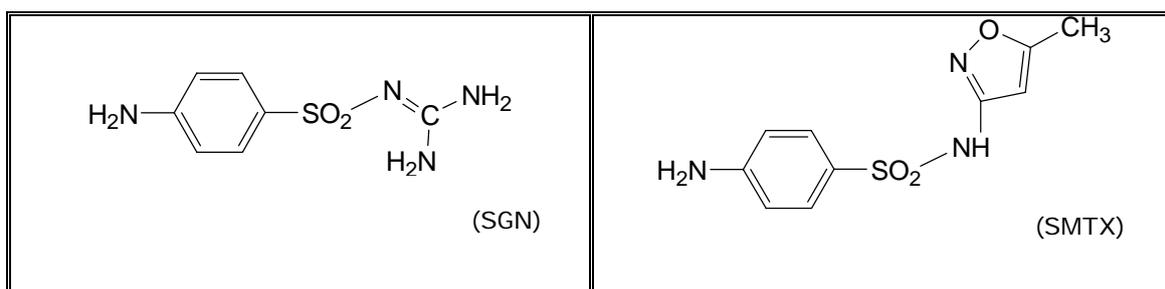


Figura IV.5.- Estructura química de sulfaguanidina (SGN) y sulfametoxazol (SMTX)

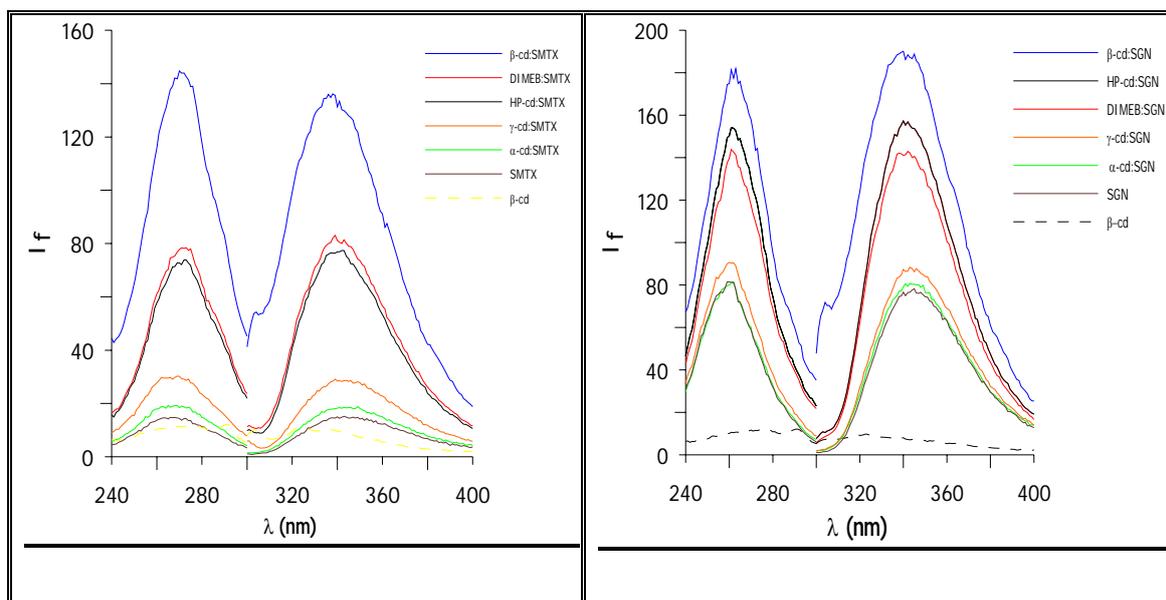


Figura IV.6.- Efecto que producen diversas ciclodextrinas sobre la señal de fluorescencia de SMTX y SGN

A continuación, se realizará el estudio de los complejos de inclusión de SMTX y SGN con β -ciclodextrina (β -CD), con el objeto de mejorar el método de determinación de estas sulfamidas por fluorescencia directa, evitando la utilización de procedimientos de derivatización o irradiación. Para el caso de SGN con β -CD será la primera vez que se realiza este estudio, dado que no se ha encontrado ninguna referencia bibliográfica al respecto, de ahí su importancia.

En la siguiente Figura IV.7, se muestran los espectros de excitación y emisión de dichas sulfamidas, en ausencia y presencia de β -CD.

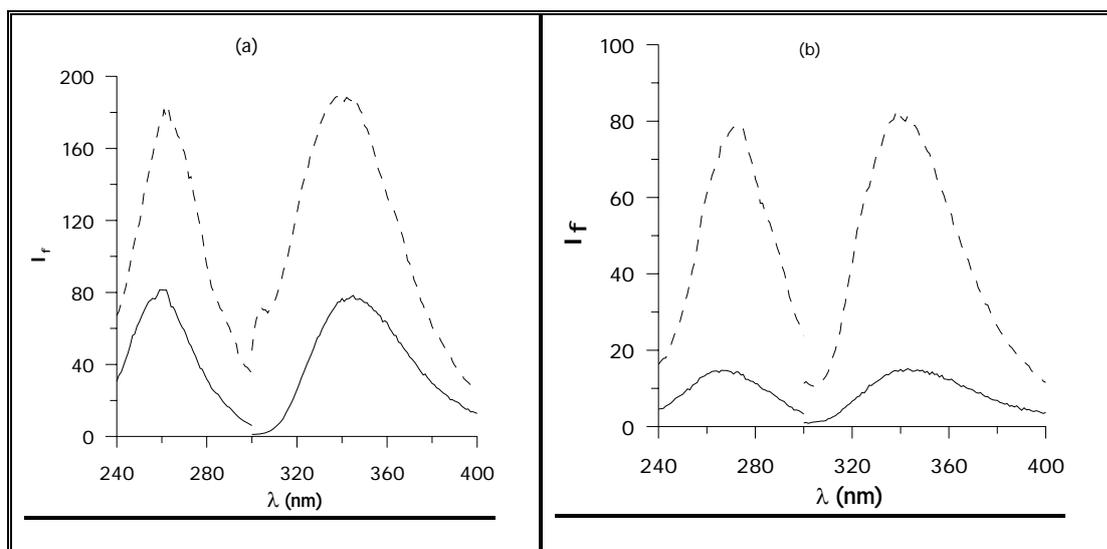


Figura IV.7.- Espectros de excitación y emisión de una disolución de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de (a) SGN y (b) SMTX en medio ácido, en presencia (---) y ausencia (___) de β -ciclodextrina

➤ INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE β -CICLODEXTRINA

Una vez comprobado que la presencia de ciclodextrina produce un aumento del rendimiento cuántico de fluorescencia, se procedió al estudio de la influencia de la concentración de β -CD basándonos en la posible formación de un complejo de inclusión entre SMTX y SGN, con β -CD de estequimetría 1:1. Para ello, se prepararon distintas disoluciones, manteniendo constante en todas ellas una concentración de SMTX y SGN de $1 \cdot 10^{-6}$ M, y variando la concentración de β -CD entre 0 y $1.2 \cdot 10^{-2}$ M, por dilución exacta de una disolución madre de β -CD de concentración $1.5 \cdot 10^{-2}$ M.

Se comprobó el efecto de la presencia de β -CD registrando los espectros de emisión, excitando a 274 y 264 nm, respectivamente. Los valores de concentración de β -CD ensayados y las intensidades de fluorescencia corregidas (intensidad producida por el complejo menos la que produce la β -CD), se resumen en la Tabla IV.2.

Tabla IV.2.- *Influencia de la concentración de β -CD sobre la señal de fluorescencia corregida del complejo SMTX : β -CD (I^a_{fc}) y SGN: β -CD (I^b_{fc})*

$[\beta\text{-CD}]$ M	I^a_{fc}	$[\beta\text{-CD}]$ M	I^b_{fc}
0	41	0	33
0,0010	140	0,0010	60
0,0015	175	0,0015	65
0,0024	210	0,0024	82
0,0030	220	0,0035	89
0,0035	235	0,0045	93
0,0045	254	0,0050	96
0,0050	269	0,0065	102
0,0065	285	0,0080	108
0,0073	298	0,0090	109
0,0080	304	0,0100	110
0,0090	306		
0,0100	305		

Se observa un incremento en la señal de fluorescencia en presencia de β -CD. Hay que tener en cuenta que la disolución de β -CD emite una señal debido al efecto de dispersión. Por tanto, a la señal de fluorescencia emitida por la disolución que contiene el complejo, hay que restarle la señal debida a la disolución de β -CD. De este modo, se obtiene la verdadera señal de fluorescencia debida al complejo de inclusión formado (Figura IV.8)

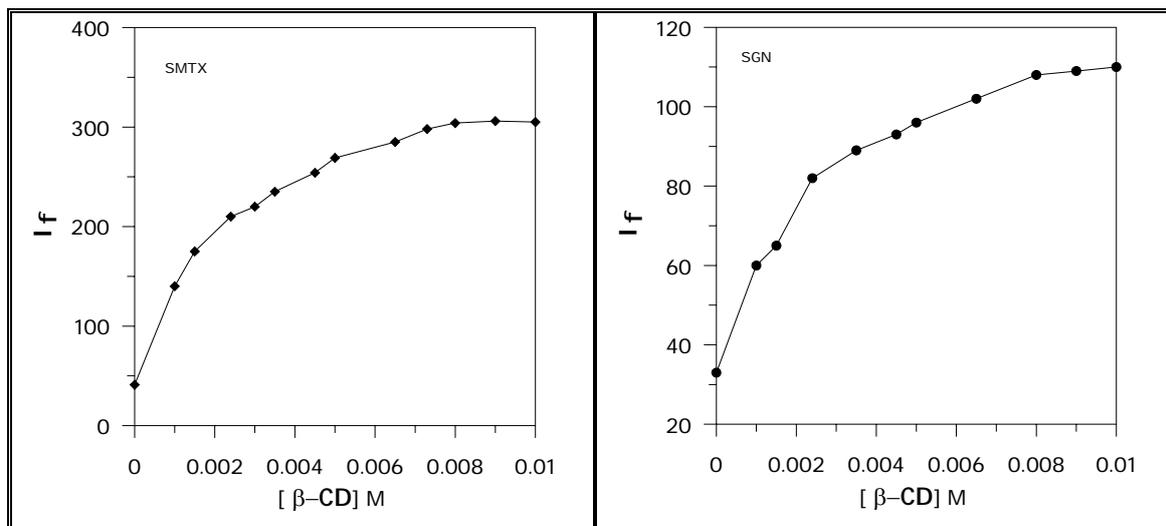


Figura IV.8.- Variación de la I_f para los complejos de inclusión con la concentración de β -CD

➤ **INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS COMPLEJOS SMTX : β -CD Y SGN: β -CD**

Se realiza el estudio de la influencia de la acidez del medio sobre la formación de los complejos de inclusión. En cada caso se llevan a cabo dos experiencias utilizando distintos órdenes de adición:

- a) analito + disolución reguladora + ciclodextrina + agua desionizada
- b) analito + ciclodextrina + disolución reguladora + agua desionizada

En ningún caso se observa una variación apreciable de la intensidad de fluorescencia medida, lo que nos lleva a concluir que la formación de los correspondientes complejos es independiente del orden de adición de los reactivos. Aún así, se decide mantener para posteriores experiencias el siguiente orden de adición: analito + disolución reguladora + ciclodextrina + agua desionizada.

Para comprobar el efecto que ejerce el pH sobre la intensidad de fluorescencia, se realizó un estudio de la variación de éste con distintas disoluciones reguladoras de diferentes pH. Se prepararon muestras conteniendo $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de SMTX y SGN, una concentración de β -CD de $9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$, disolución reguladora de diferentes valores de pH y se enrasó el matraz de 5 mL con agua desionizada.

Se registraron los correspondientes espectros de emisión utilizando unas longitudes de onda de excitación, de 274 y 264 nm, respectivamente. Como puede observarse en la Figura IV.9, donde se representan los valores de intensidad de fluorescencia frente a los distintos valores de pH, en medios muy básicos la formación del complejo es más débil que a pH comprendidos entre 3 y 5.5, para el caso del sulfametoxazol, y entre 4.5 y 6.5, para la sulfaguanidina.

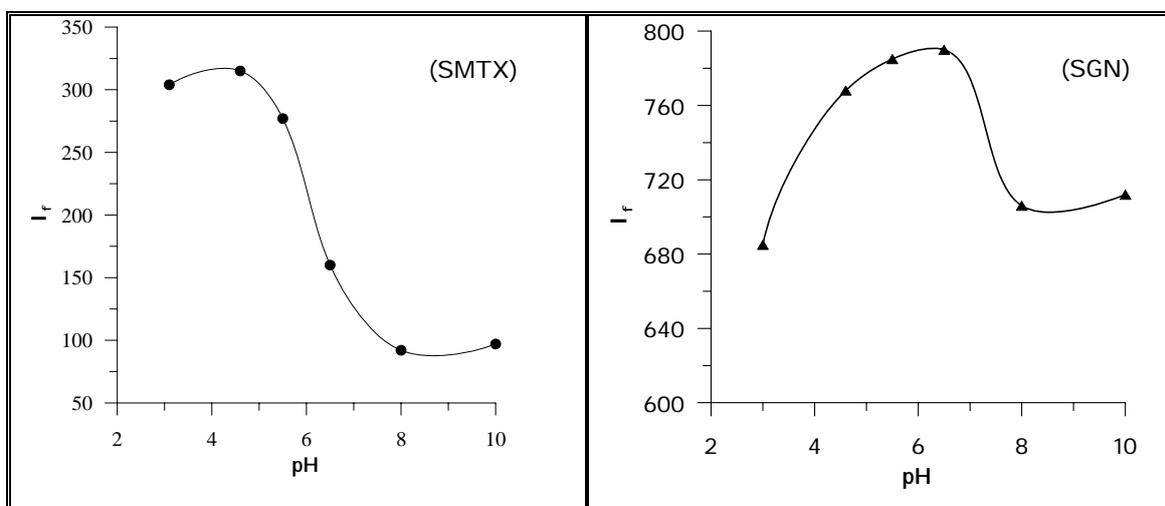


Figura IV.9.- Variación de la I_f de los complejos de inclusión con el pH

Seguidamente se realizó un estudio de la influencia de la concentración de la disolución reguladora acético/acetato adicionando distintos volúmenes de una disolución 0.5 M de pH 4.6, encontrando que la concentración de ésta en la disolución

de trabajo no afecta a la I_f del complejo de SMTX, por lo que decidimos adicionar 1.5 mL de disolución reguladora acético/acetato de pH 4.6. Para el caso de SGN, se realizó un estudio de la influencia de la concentración de la disolución reguladora, tanto de acético/acetato 0.5 M de pH 5.5, como de fosfórico/ fosfato 0.5 M de pH 6.5, encontrando que la concentración de éste último afecta ligeramente la I_f del complejo; por lo que decidimos elegir como pH de trabajo uno de 5.5, por adición de 1.5 mL de disolución reguladora acético/acetato de pH 5.5.

➤ **INFLUENCIA DEL CONTENIDO DE ETANOL EN EL MEDIO**

Análogamente, se llevó a cabo un estudio de la influencia del porcentaje de etanol en la muestra. Los resultados mostraron que se produce una apreciable disminución de la fluorescencia a medida que aumenta la cantidad de etanol presente en el medio. Se comprobó si el etanol influía en el blanco, encontrando que la señal de emisión del blanco es sólo ligeramente afectada por la presencia de etanol.

Es evidente que la presencia de etanol en el medio hace disminuir la fluorescencia de los complejos. Este decrecimiento de la fluorescencia es causado por la disminución gradual del porcentaje de moléculas de sulfamida formando complejo a medida que aumenta el contenido de etanol en el medio, lo cual es debido a dos hechos. Por una parte, es sabido que la molécula de etanol forma complejo con β -CD y, aunque su constante de formación es muy pequeña, 0.93 M^{-1} , llega a ser competitivo con SMTX y SGN en la reacción de complejación con β -CD a las altas concentraciones empleadas [89,90]. Por otra, la presencia de etanol en el medio cambia las características de polaridad del disolvente, haciendo que la tendencia de SMTX y SGN a incluirse dentro de la cavidad de la ciclodextrina disminuya. Efectos similares se han descrito anteriormente para el complejo de pireno con β -CD, en presencia de contenidos crecientes de metanol [89,90].

Con objeto de disponer de cierto porcentaje de etanol en el medio y no perder demasiada sensibilidad, se ha optado por escoger un 2 % de etanol, para experiencias en las que sea necesaria la presencia de etanol.

➤ ***INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SMTX Y SGN***

Para estudiar de que forma influye la concentración de SMTX sobre la señal de fluorescencia, se prepararon muestras de concentraciones crecientes del analito en matraces aforados de 5 mL, a los que se añadió 3 mL de disolución de β -CD $1.5 \cdot 10^{-2}$ M, 1.5 mL de disolución reguladora de pH 4.6, y agua desionizada hasta enrase. En el caso de SGN utilizamos disolución reguladora de pH 5.5.

Se registraron los espectros de emisión a 342 nm, empleando como longitud de onda de excitación 274 nm, para el caso de SMTX y utilizando 343 y 263 nm, respectivamente, para el caso de SGN. Se utilizaron como valores de rendija los de 5, 10 nm, excitación:emisión, para SMTX y 5, 5 nm, respectivamente, para SGN, con objeto de no saturar el detector en el caso de la SGN. Los resultados obtenidos se representan en la Figura IV.10, en la que se puede observar que la señal de fluorescencia aumenta de forma lineal a medida que lo hace la concentración de SMTX hasta que ésta alcanza un valor de $0.5 \mu\text{g. mL}^{-1}$; en el caso de SGN se puede observar que la señal de fluorescencia aumenta de forma lineal a medida que lo hace la concentración de SGN hasta que ésta alcanza un valor de $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

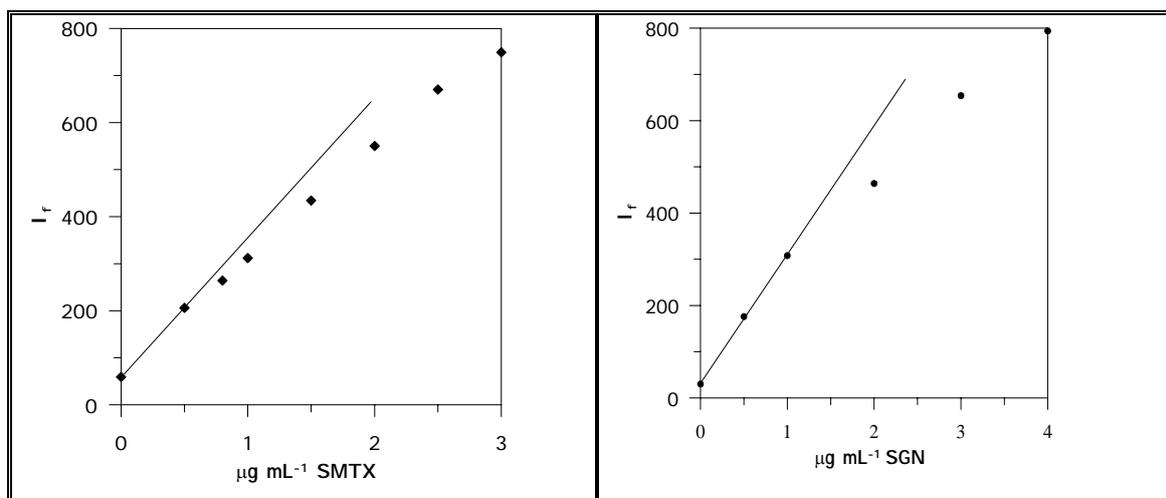


Figura IV.10.- Influencia de la concentración de SMTX y SGN sobre la intensidad de fluorescencia

➤ **ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO Y DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN FORMADOS**

Mediante medidas de fluorescencia se realizó el estudio de la estabilidad de las disoluciones de trabajo, así como de los complejos de inclusión formados, encontrándose que las disoluciones madre eran estables al menos 15 días guardadas en frascos color topacio y en el frigorífico; mientras que las disoluciones diluidas preparadas a partir de éstas lo eran al menos 7 días, en las mismas condiciones. En cuanto a los complejos se comprueba que éstos se forman instantáneamente y permanecen estables, al menos durante 1 hora, desde el momento de su preparación.

➤ **RECTA DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD**

Fijadas las condiciones de trabajo, así como el rango de linealidad, se procedió a establecer la correspondiente recta de calibrado.

En matraces de 5 mL se prepararon patrones, por triplicado, y siguiendo este orden de adición, en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para el caso de SMTX, y entre 0 y $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para SGN, a los que se añadió, 3 mL de disolución de β -CD $1.5 \cdot 10^{-2} \text{ M}$, 1.5 mL de disolución reguladora de pH 4.6 y 5.5, respectivamente, y agua ultrapura hasta enrase. Excitando a 274 y 263 nm respectivamente, se registraron los espectros de emisión, midiendo la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 342 y 343 nm, respectivamente. Ahora se utilizaron los mismos valores de rendija, 5,10 nm excitación : emisión, respectivamente, para ambos analitos. Los resultados obtenidos (Figura IV.11) tratados con el programa ACOC, muestran una adecuada linealidad entre 0.15 y $0.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para el SMTX y entre 0.10 y $1.0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, para la SGN. Los parámetros de calidad se recogen en la siguiente Tabla IV.3. Ambas rectas pasaron positivamente el test ANOVA.

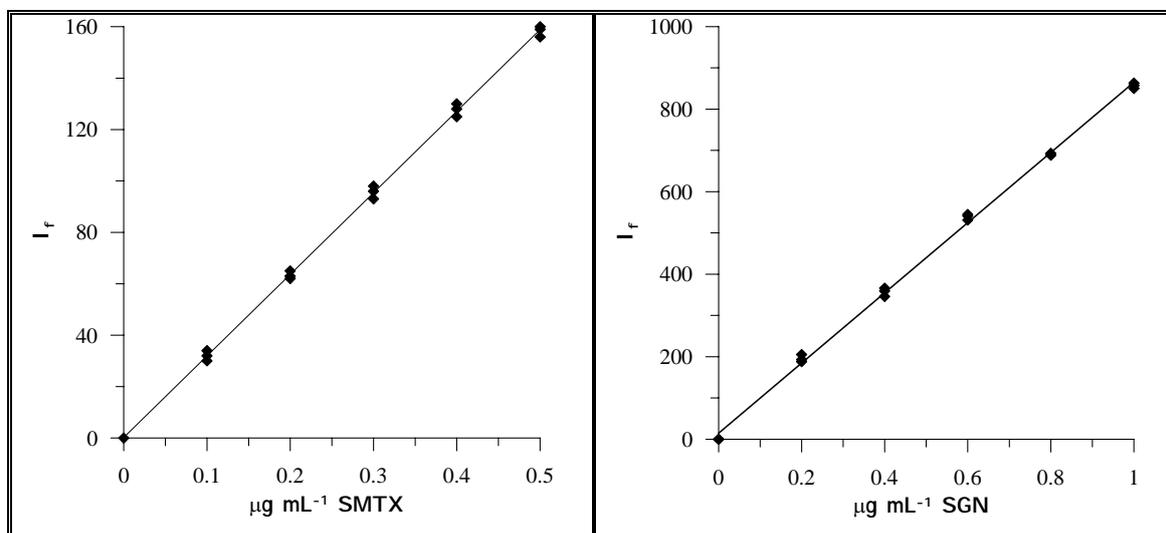


Figura IV.11.- Rectas de calibrado

Tabla IV.3.- Parámetros de calidad

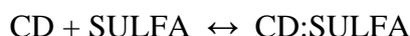
	<i>SMTX</i>	<i>SGN</i>
Pendiente (b)	317.4	847.2
Ordenada en el origen (a)	0.14	7.45
Desviación típica de la pendiente (S_b)	2.40	3.20
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.73	1.57
Coefficiente de determinación (r^2)	0.999	0.999
Linealidad (1- $DER(b)$) %	99	98.9
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.005	0.015
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.052	0.036
LOD (Clayton)($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	0.054	0.038

➤ ***ESTEQUIOMETRÍA Y CONSTANTE DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ENTRE SULFAMETOXAZOL Y SULFAGUANIDINA CON β -CICLODEXTRINA***

Para desarrollar métodos de análisis basados en reacciones de complejación, es necesario el conocimiento de las constantes de formación de los complejos, con objeto de poder predecir y entender mejor las interacciones que se producen entre las ciclodextrinas y la moléculas incluidas en su interior. Las constantes de formación proveen una medida de la estabilidad del complejo, y un análisis de estos valores puede dar una comprensión más clara de los factores que afectan a la reacción de complejación. Los resultados de estos estudios pueden entonces utilizarse en el desarrollo de metodologías analíticas específicas.

A partir de los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la concentración de β -ciclodextrina sobre la I_f , se determinaron la estequiometría y la constante de formación de los complejos de inclusión de SMTX y SGN, con β -ciclodextrina de la siguiente manera.

Si asumimos que β -CD forma complejo de inclusión de estequiometría 1:1 con la sulfamida, de acuerdo con el siguiente equilibrio:



La constante de formación vendría dada por la expresión:

$$K_1 = [CD:SULFA] / [CD] [SULFA] \quad (1)$$

donde [CD], [SULFA] y [CD:SULFA] son las concentraciones en el equilibrio de estas especies, respectivamente. Si la concentración inicial de ciclodextrina $[CD]_0$ está en un gran exceso comparado a la concentración del complejo, (como es nuestro caso dado que $[SMTX]$ y $[SGN] = 4.6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$) y la concentración de ciclodextrina varía entre 0 y $9 \cdot 10^{-3} \text{ M}$), podemos aproximar:

$$[CD] = [CD]_0 - [CD:SULFA] \approx [CD]_0 \quad (2)$$

y, a partir del balance de masas, tenemos:

$$[SULFA]_0 = [SULFA] + [CD: SULFA] \quad (3)$$

donde $[SULFA]_0$ es la concentración inicial de SMTX o SGN. Consecuentemente, la ecuación 1 puede simplificarse como:

$$K_1 = [\text{CD:SULFA}] / [\text{CD}]_0 ([\text{SULFA}]_0 - [\text{CD:SULFA}]) \quad (4)$$

Como se observa en la Figura IV.8, la eficacia cuántica de fluorescencia de SMTX y SGN aumenta al interactuar con β -CD y formar el complejo de inclusión. Así, la intensidad de fluorescencia de la disolución se incrementa cuando la concentración de β -CD aumenta.

Dado que β -CD presenta una señal de emisión perceptible en nuestras condiciones instrumentales, a la intensidad de fluorescencia observada se le ha restado en cada caso la señal correspondiente al blanco de β -CD. Por lo tanto, la señal de fluorescencia corregida es la suma de las contribuciones de SMTX y SGN libres y SMTX y SGN formando el complejo.

$$F = K_N[\text{SULFA}] + K_C [\text{CD:SULFA}] \quad (5)$$

donde K_N y K_C representan las constantes de proporcionalidad que nos relacionan las intensidades y las concentraciones de las especies.

En ausencia de β -CD, la intensidad de fluorescencia viene dada por:

$$F_0 = K_N[\text{SULFA}]_0 \quad (6)$$

y la intensidad F_∞ , cuando SMTX y SGN están completamente convertidas a la forma compleja, es:

$$F_\infty = K_C[\text{CD:SULFA}] \quad (7)$$

En esta situación, no hay SULFA libre y por tanto $[SMTX]$ y $[SGN] = 0$, y

$$F_{\infty} = K_C[SULFA]_0 = \text{constante} \quad (8)$$

La fracción de SULFA en forma compleja es, por tanto:

$$[CD:SULFA]/[SULFA]_0 = (F - F_0) / (F_{\infty} - F_0) \quad (9)$$

Combinando las ecuaciones (4) y (9)

$$(F - F_0) / (F_{\infty} - F_0) = (K_1[CD]_0) / (1 + K_1[CD]_0) \quad (10)$$

Y, reagrupando miembros:

$$(F - F_0) / [CD]_0 = (F_{\infty} - F_0) K_1 - (F - F_0)K_1 \quad (11)$$

a) Cálculo de la estequiometría del complejo en presencia y ausencia de etanol

a.1.-Método de Benesi-Hildebrand

Esta ecuación (11) puede ponerse también en la forma más familiar del “gráfico doble recíproco” o gráfico de Benesi-Hildebrand [91].

$$1 / (F - F_0) = [(1 / (F_{\infty} - F_0) K_1 [CD]_0) + (1 / (F_{\infty} - F_0))] \quad (12)$$

Una representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]_0$ debería darnos una línea recta en el caso en que la estequiometría del complejo fuera efectivamente 1:1. En la Tabla IV.4 se resumen los valores calculados de $1/(F-F_0)$ y de $1/[CD]_0$, en presencia de un 2% de etanol.

Tabla IV.4.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:1 de los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b) en presencia de un 2% de etanol

$1/[\beta\text{-CD}]_0(\text{M})^{-1}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$1/[\beta\text{-CD}]_0(\text{M})^{-1}$	$[1/(F-F_0)]^b$
1000	0,0250	666.66	0,083
666.66	0,0170	416.66	0,053
416.66	0,0130	285.71	0,038
333.33	0,0110	222.22	0,033
285.71	0,0096	200	0,030
222.22	0,0081	153.84	0,026
200	0,0077	125	0,022
153.84	0,0065	111.11	0,021
136.98	0,0060	100	0,021
125	0,0058		
111.11	0,0057		
100	0,0056		

En la Figura IV.12 se muestra una representación gráfica de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]_0$, en presencia de un 2% de etanol

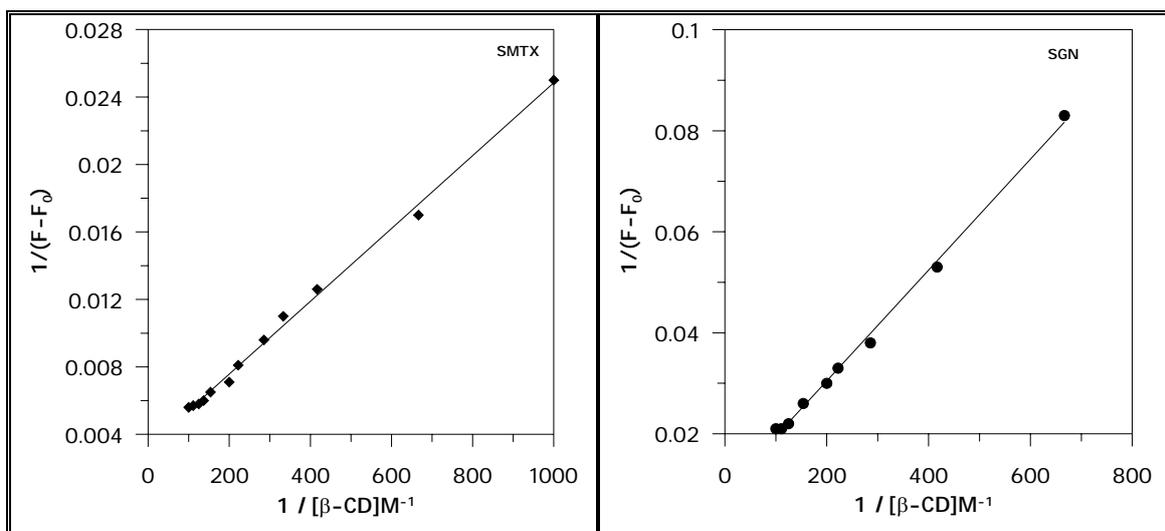


Figura IV.12.- Método de Benesi-Hildebrand, para una estequiometría 1:1 de los complejos SMTX: β -CD y SGN: β -CD en presencia de un 2% de etanol

Tabla IV.5.- Método de Benesi-Hildebrand, para una estequiometría 1:1 de los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b) en ausencia de etanol

$1/[\beta\text{-CD}]_0(\text{M})^{-1}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$1/[\beta\text{-CD}]_0(\text{M})^{-1}$	$[1/(F-F_0)]^b$
1000	0,0102	666.66	0,037
666.66	0,0079	416.66	0,027
416.66	0,0059	285.71	0,0204
333.33	0,0052	222.22	0,0178
285.71	0,0049	200	0,0166
222.22	0,0045	153.84	0,0158
200	0,0043	125	0,0144
153.84	0,0040	111.11	0,0133
136.98	0,0039	100	0,0131
125	0,0038		
111.11	0,0037		
100	0,0037		

En la Tabla IV.5 y en la Figura IV.13 se muestran los resultados obtenidos y una representación gráfica de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]$, en ausencia de etanol.

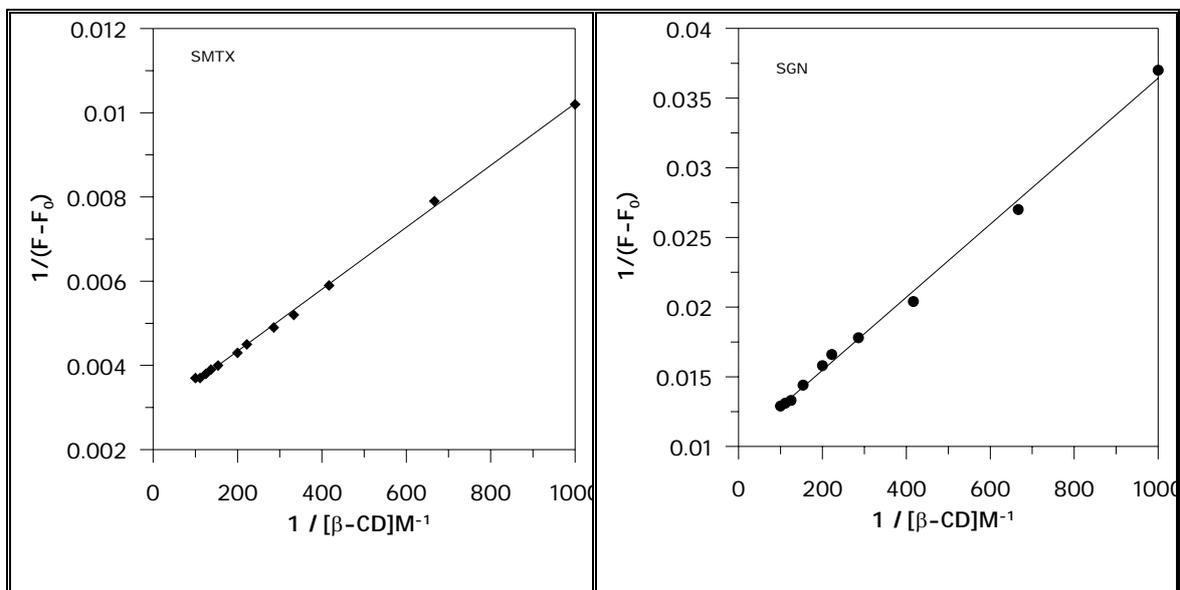
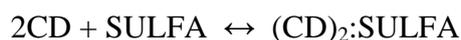


Figura IV.13.- Método de Benesi-Hildebrand, para una estequiometría 1:1 de los complejos SMTX: β -CD y SGN: β -CD, en ausencia de etanol

La relación lineal obtenida nos permite concluir que el complejo responde a una relación estequiométrica 1:1.

Si en vez de asumir una estequiometría 1:1, supusiéramos una estequiometría 2:1 del complejo β -CD : SULFA, la expresión del equilibrio de complejación vendría dada por:



y la constante de formación del complejo vendría dada por la expresión:

$$K_2 = [(\text{CD})_2:\text{SULFA}] / [\text{CD}]^2[\text{SULFA}] \quad (13)$$

y en el caso en que se cumpliera que:



es decir, que el complejo 2:1 fuera predominante, llegaríamos a una expresión similar a la ecuación 12, para el caso de un complejo de estequiometría 2:1

$$1 / (F - F_0) = [1 / (F_\infty - F_0) K_2 [\text{CD}]_0^2 + 1 / (F_\infty - F_0)] \quad (14)$$

Así, en este caso, la representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[\text{CD}]_0^2$ debería ser una línea recta [94].

Los valores de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[\text{CD}]_0^2$, calculados a partir de los datos experimentales obtenidos, están recogidos en la Tabla IV.6 y representados en la Figura IV.13, en presencia de un 2% de etanol y en la Tabla IV.7 y en la Figura IV.14, en ausencia de etanol

Tabla IV.6.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2, para los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b) en presencia de un 2% de etanol

$1/[\beta\text{-CD}]_0^2(\text{M})^{-2}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$1/[\beta\text{-CD}]_0^2(\text{M})^{-2}$	$[1/(F-F_0)]^b$
1000000	0,025	1000	0,143
444444	0,017	444444	0,083
173613	0,013	173613	0,053
141140	0,011	81632	0,038
81632	0,0096	49382	0,033
49382	0,0081	40000	0,030
40000	0,0077	23678	0,026
23678	0,0065	15625	0,022
18765	0,0060	12345	0,021
15625	0,0058	10000	0,021
12345	0,0057		
10000	0,0056		

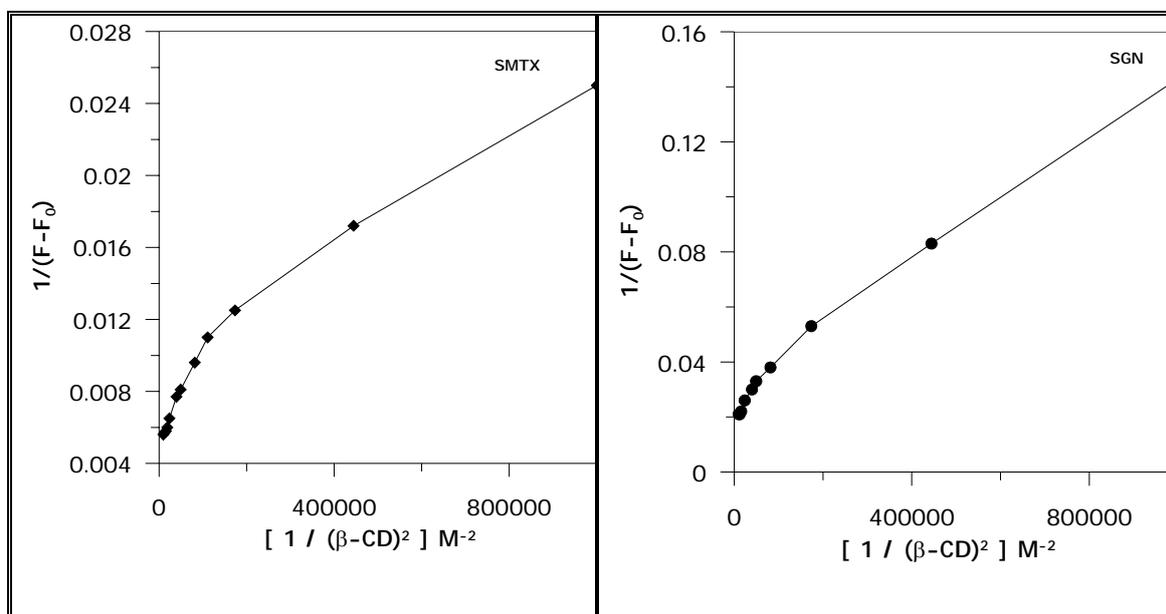


Figura IV.13.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 para los complejos SMTX: β -cd y SGN: β -cd, en presencia de un 2% de etanol

Tabla IV.7.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2, para los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b), en ausencia de etanol

$1/[\beta\text{-cd}]^2(\text{M})^{-2}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$1/[\beta\text{-cd}]^2(\text{M})^{-2}$	$[1/(F-F_0)]^b$
1000000	0,0095	1000	0,037
444444	0,0070	444444	0,028
173613	0,0059	173613	0,0204
141140	0,0055	81632	0,0178
81632	0,0051	49382	0,0166
49382	0,0047	40000	0,0158
40000	0,0045	23678	0,0144
23678	0,0040	15625	0,0133
18765	0,0039	12345	0,0131
15625	0,0038	10000	0,0129
12345	0,0037		
10000	0,0037		

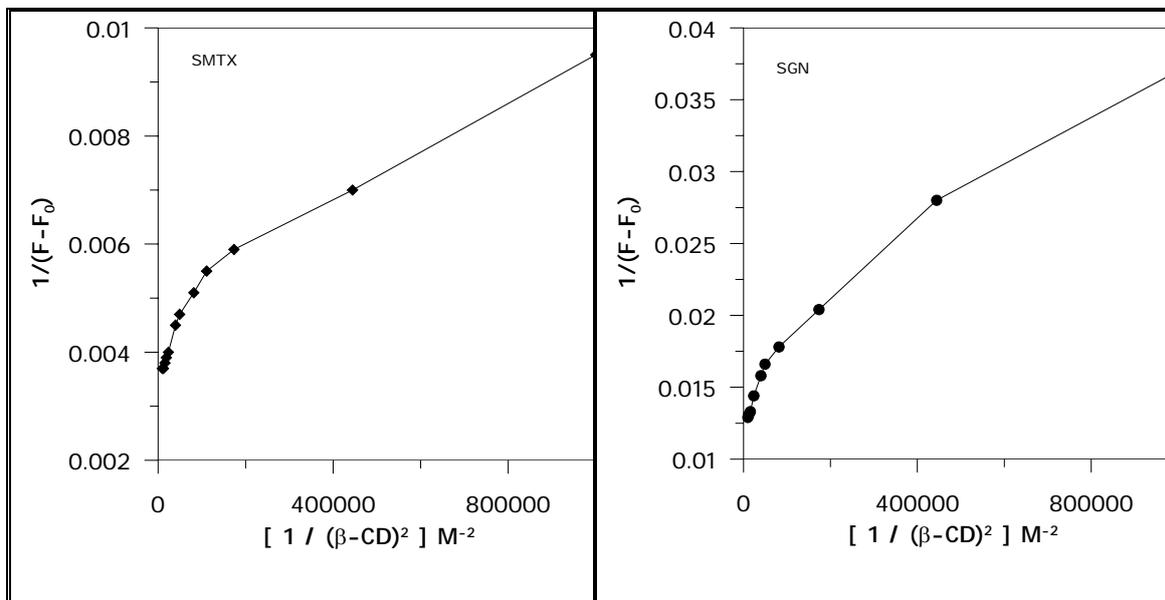


Figura IV.14.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 del complejo SMTX: β -CD y SGN: β -CD en ausencia de etanol

Como se observa en las Figuras IV.13 y IV.14, la representación de los datos experimentales no se ajusta a una línea recta, lo que aporta una evidencia adicional de que los complejos SMTX: β -CD y SGN: β -CD presenta una estequiometría 1:1.

Esta relación estequiométrica encontrada está de acuerdo con los resultados obtenidos por otros autores [59-61], sobre los complejos de inclusión de una serie de sulfamidas con β -CD. Según estos estudios, la estequiometría de dichos complejos era 1:1 en todos los casos investigados.

a.2.- Método de Scatchard [93]

Según la ecuación:

$$(F - F_0) / [CD]_0 = (F_\infty - F_0) K_1 - (F - F_0) K_1 \quad (15)$$

si al representar $(F - F_0) / [CD]_0$ frente a $(F - F_0)$ obtenemos una línea recta, es que la estequiometría es realmente 1:1. Este método nos permite confirmar la estequiometría calculada por el método de Benesi-Hildebrand, ya que según la ecuación 15, si obtenemos una línea recta, la estequiometría es realmente 1:1. En las Tablas IV.8 y IV.9 se encuentran los valores calculados para $(F - F_0) / [\beta\text{-CD}]$ y $(F - F_0)$, que se representan en la Figuras IV.15 y IV.16

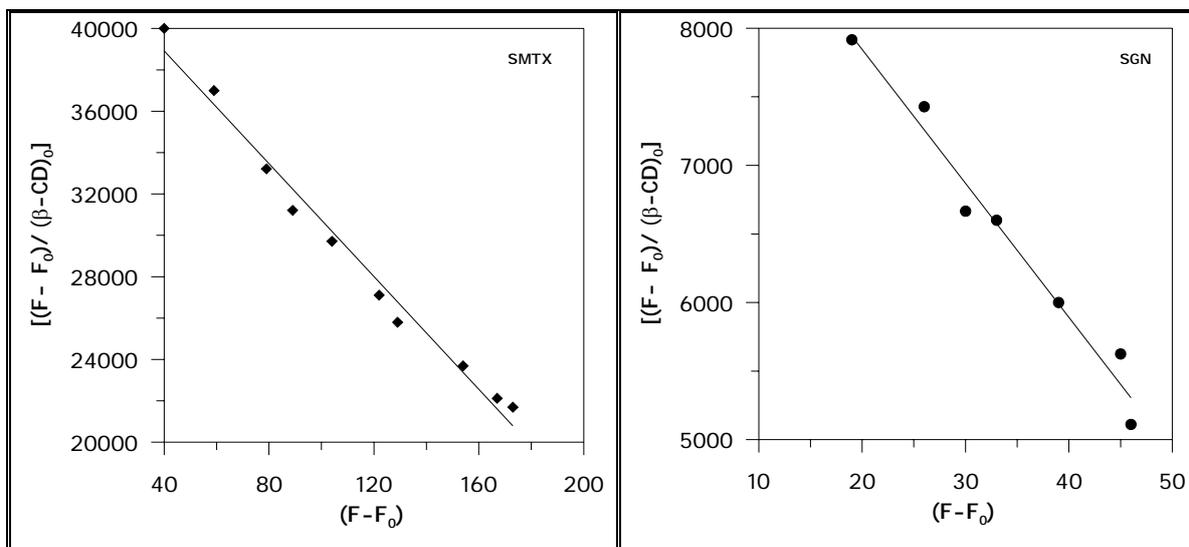


Figura IV.15.- Método de Scatchard para el cálculo de estequiometrías

$[(F-F_0) / (\beta-CD)_0]^a$	$(F-F_0)$	$[(F-F_0) / (\beta-CD)_0]^b$	$(F-F_0)$
40000	40	7916	19
36999	59	7428	26
33213	79	6666	30
31213	89	6600	33
29714	104	6000	39
27140	122	5625	45
25800	129	5111	46
23692	154		
22123	167		
21695	173		

Tabla IV.8.- Método de Scatchard para el cálculo de las estequiometrías de los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b), en presencia de un 2% de etanol

Tabla IV.9.- Método de Scatchard para el cálculo de las estequiometrías de los complejos SMTX: β -CD (a) y SGN: β -CD (b), en ausencia de etanol

$[(F-F_0) / (\beta-CD)_0]^a$	(F-F ₀)	$[(F-F_0) / (\beta-CD)_0]^b$	(F-F ₀)
68005,3	169	28888	27
59666,7	179	25555	32
55428,6	194	18982	49
47111,1	212	16000	56
43800	219	13333,3	60
37538,5	244	12600	63
35205,5	257	10615,4	69
32875	263	9375	75
29444,4	265	8444,44	76
26800	268	7700	77

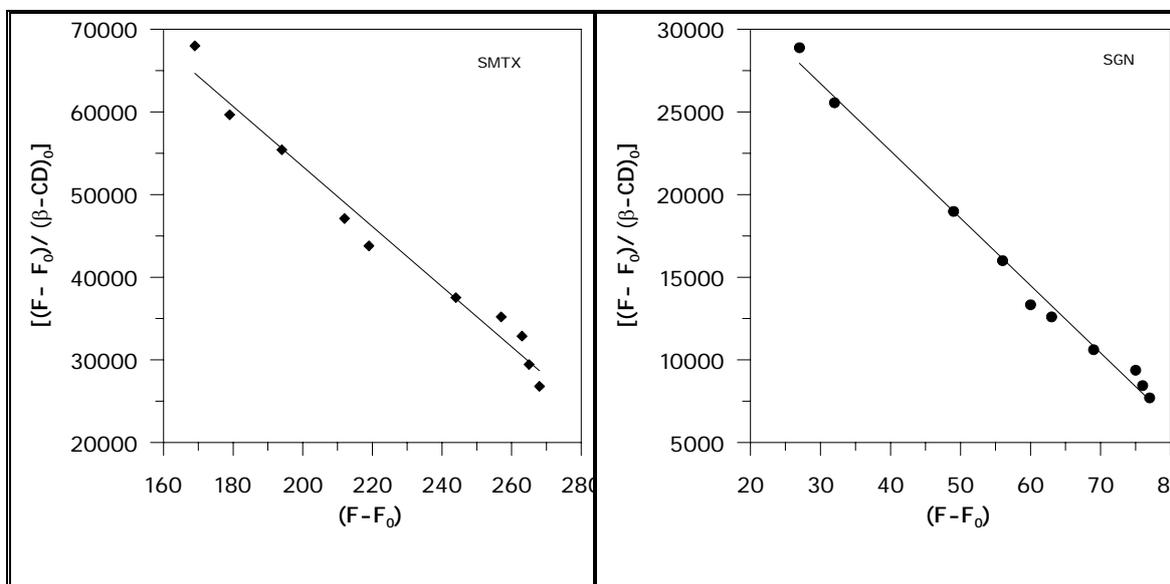


Figura IV.16.- Método de Scatchard para el cálculo de estequiometrías

En la gráfica se puede observar que en los dos casos se obtienen líneas rectas, lo que viene a confirmar la estequiometría 1:1, para los complejos estudiados.

b) Cálculo de la constante de formación del complejo

Se realizaron dos experiencias, una en presencia de un 2% de etanol, y otra en ausencia de etanol, para ver de que manera afectaba éste al valor de la constante de formación del complejo. Es de esperar que en presencia de etanol el valor sea menor, como se ha comentado anteriormente.

b.1.- Método de Benesi-Hildebrand

Mediante la representación de los datos experimentales según el método de Benesi-Hildebrand, es posible asimismo efectuar el cálculo de la constante de formación del complejo en estudio, una vez determinada su estequiometría.

En nuestro caso, en que la estequiometría es 1:1, a partir de la representación gráfica de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]_0$, y teniendo en cuenta la ecuación 12, la ordenada en el origen nos daría el valor de $1/(F_\infty - F_0)$, y k_1 podría ser estimada como la ordenada en el origen dividida por la pendiente de la recta.

En la Tabla IV.10 se recogen las ecuaciones de las rectas obtenidas al suponer una estequiometría 1:1, tanto en presencia de un 2% de etanol, como en ausencia de etanol.

Tabla IV.10.- Ecuaciones de las rectas de los complejos formados

Complejo	Ecuación de la recta	r ²	Etanol
<i>SMTX:β-CD</i>	$y = 2,16 \cdot 10^{-5} x + 0,0032$	0,997	Si
	$y = 7,35 \cdot 10^{-6} x + 0,0028$	0,998	No
<i>SGN:β-CD</i>	$y = 1,09 \cdot 10^{-4} x + 0,0085$	0,997	Si
	$y = 2,62 \cdot 10^{-5} x + 0,0102$	0,996	No

Los valores obtenidos por este método se resumen en la Tabla IV.11.

Tabla IV.11.- Parámetros hallados por el método de Benesi-Hildebrand

Complejo	F ₀	K (M ⁻¹)	Log K	Etanol
<i>SMTX:β-CD</i>	41	148	2,17	Si
	43	381	2,58	No
<i>SGN:β-CD</i>	33	78	1,89	Si
	34	389	2,59	No

Como se puede comprobar, la presencia de etanol en el medio provoca una considerable disminución del valor de la constante de formación, especialmente para el caso de la sulfaguanidina. Este hecho está de acuerdo con la suposición anterior y las causas también han sido ya explicadas.

b.2.- Método de Scatchard

Mediante el método de Scatchard, al representar $(F - F_0) / [CD]_0$ frente a $(F - F_0)$, obtenemos una línea recta que presenta una pendiente de $-K$, donde K sería la constante de formación del complejo.

En la Tabla IV.12. se recogen las ecuaciones de las rectas obtenidas, así como los parámetros obtenidos por este método .

Tabla IV.12.- *Ecuaciones de las rectas de los complejos formados y parámetros hallados por el método de Scatchard*

Complejo	Ecuación de la recta	K (M⁻¹)	Log K	Etanol
<i>SMTX:β-CD</i>	-136,27x + 44364,50	136	2,13	Si
	-363,36x + 126070,01	363	2,56	No
<i>SGN:β-CD</i>	-97,68x + 9799,33	98	1,98	Si
	-407,56x + 38951,20	407	2,61	No

Como se puede comprobar de nuevo, la presencia de etanol en el medio provoca una considerable disminución del valor de la constante de formación, sobre todo para el caso de la sulfaguanidina.

b.3.- Método de regresión no lineal

Sin embargo, las representaciones de Benesi-Hildebrand y, en general, los métodos de regresión lineal, tienden a poner más énfasis en los valores de concentraciones más bajas, que en los valores de concentraciones más altas. En consecuencia, la pendiente de la línea recta es más sensible a los valores del valor de ordenada del punto que tiene la concentración más baja, puesto que pequeñas variaciones en este valor se traducen en grandes variaciones en la pendiente de la recta. Se dice que los datos no están adecuadamente ponderados [92]. Por ello, para una estimación más precisa de la constante de estabilidad, se recomienda efectuar un análisis de regresión no lineal [94].

La relación directa entre el incremento de fluorescencia observado, y la concentración de β -CD, viene dada por:

$$F = F_0 + [(F_\infty - F_0)K_1[CD]_0 / (1 + K_1[CD]_0)] \quad (15)$$

Utilizando esta ecuación, los datos experimentales se pueden utilizar directamente en un programa de regresión no lineal. Esto produce una mejor estimación del valor de K_1 .

Para realizar el cálculo, se simplifica la ecuación 15 transformando las dos incógnitas, $(F_\infty - F_0)$ y K_1 , en dos parámetros $a(1)$ y $a(2)$ y, por tanto, la ecuación queda de la forma:

$$F = F_0 + [a(1) a(2) [CD]_0 / (1 + a(2) [CD]_0)] \quad (16)$$

Los parámetros iniciales que se necesitan para el método de regresión no lineal se obtienen a partir del gráfico lineal del método de Benesi-Hildebrand. La subrutina de regresión no lineal aporta una estimación de los dos parámetros desconocidos utilizando el proceso iterativo de Marquardt [94]. El valor de las constantes de formación obtenidas se resumen en la Tabla IV.15

Tabla IV.13.- Valores de las constantes de formación obtenidas por el método de regresión no lineal

Complejo	a(1)	a(2)	F ₀	K (M ⁻¹)	Log K	Etanol
SMTX:β-CD	303	165	41	143	2,15	Si
	349,6	452,7	42	414	2,61	No
SGN:β-CD	256,4	39	33	102	2,0	Si
	97,7	390,8	32	361	2,55	No

La presencia de etanol en el medio provoca una considerable disminución del valor de la constante de formación.

Los valores determinados para las constantes de estabilidad por este método se encuentra en el mismo orden de magnitud, que los valores encontrados por otros autores [62,63], para las constantes de estabilidad de los complejos de inclusión de diversas sulfamidas con β -CD.

Con objeto de ajustar los valores obtenidos experimentalmente a la ecuación correspondiente, en la que se hace uso de los valores de F_0 , $a(1)$ y $a(2)$, se emplea el programa Excel, obteniéndose las gráficas que se muestran en la Figura IV.17, comprobándose que hay un buen ajuste de los puntos experimentales a la ecuación.

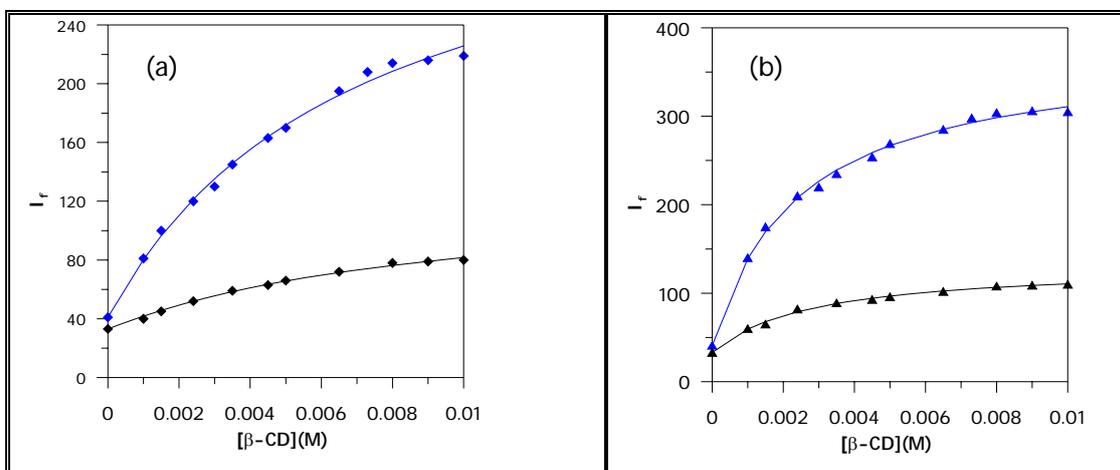


Figura IV.17.- Influencia de la concentración de β -CD en la señal de fluorescencia de **SMTX** y **SGN** en presencia de 2% de etanol (a) y en ausencia de éste (b). La línea continua se ha calculado usando el análisis de regresión no lineal, asumiendo una estequiometría 1:1 y usando los valores de F_∞ y K_1 obtenidos por el método de regresión no lineal.

Los valores calculados para las constantes de formación de los complejos, en ausencia de etanol, mediante cada uno de los métodos aplicados, se resumen en la Tabla IV.14

Tabla IV.14.-Constantes de formación obtenidas al aplicar diferentes métodos

	<i>Benesi-Hildebrand</i>		<i>Scatchard</i>		<i>Regresión no lineal</i>	
	K (M⁻¹)	Log K	K (M⁻¹)	Log K	K (M⁻¹)	Log K
<i>SGN: β-CD</i>	389	2,59	407	2,61	361	2,55
<i>SMTX: β-CD</i>	381	2,58	363	2,56	414	2,61

A la vista de los resultados resumidos en esta tabla, se concluye, que existe una buena concordancia entre los valores de constantes de formación calculados por los tres métodos, dentro del error experimental.

➤ **ESTRUCTURA DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN**

Uekama y col. [62], en sus estudios sobre los complejos de inclusión de una serie de sulfamidas con β-CD, encontraron que los máximos de absorción UV generalmente se desplazaban hacia longitudes de onda mayores al formar el complejo de inclusión. Asimismo, observaron cambios espectrales similares cuando las sulfamidas se disolvían en disolventes menos polares que el agua, como etanol o dioxano. Estos autores concluían que, los grupos cromóforos de las sulfamidas, deberían encontrarse localizados dentro de la cavidad hidrofóbica de la ciclodextrina al formarse el complejo de inclusión.

Encontraron asimismo [63], mediante estudios de resonancia magnética nuclear, que las señales del grupo fenilo de las sulfamidas mostraban unos desplazamientos significativos hacia campos más altos y que el espectro se ensanchaba;

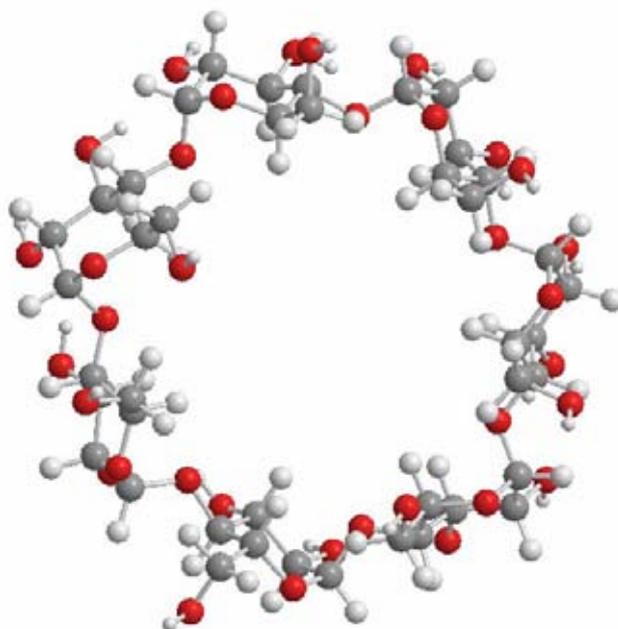
mientras que no se notaban cambios apreciables en las señales correspondientes a los sustituyentes heterocíclicos de las sulfamidas. Concluían, por tanto, que debía ser el anillo fenólico de las sulfamidas el que estuviera incluido en la cavidad de la ciclodextrina.

Se ha indicado, asimismo [1], que la molécula de sulfonamida se aproxima y penetra en la ciclodextrina a través del extremo de la cavidad en el que se encuentran situados los grupos hidroxilo secundarios, que es el más abierto y accesible.

ESTUDIO MEDIANTE MODELACIÓN MOLECULAR

Para corroborarlo y con objeto de caracterizar los complejos de inclusión formados entre β -CD, SMTX y SGN, se realizó un estudio de modelación molecular utilizando el programa Chem3D® *Ultra*, Versión 8.0.3. Para realizar todos los cálculos se ha utilizado el método semiempírico de mecánica molecular AM1.

En primer lugar, se obtienen las estructuras optimizadas de SGN, SMTX y β -CD (Figura IV.18). A continuación, se procede a obtener las estructuras optimizadas de los complejos SGN: β -CD y SMTX: β -CD. El modo de operar para cada complejo es ir introduciendo de forma progresiva las distintas partes de los analitos en la ciclodextrina e ir calculando, en cada caso, el calor de formación del complejo de inclusión resultante, una vez optimizada su estructura. Se elige como estructura óptima, aquella que presenta menor calor de formación. En estas condiciones, se obtienen los modelos mostrados en la Figura IV.19.



β -CD

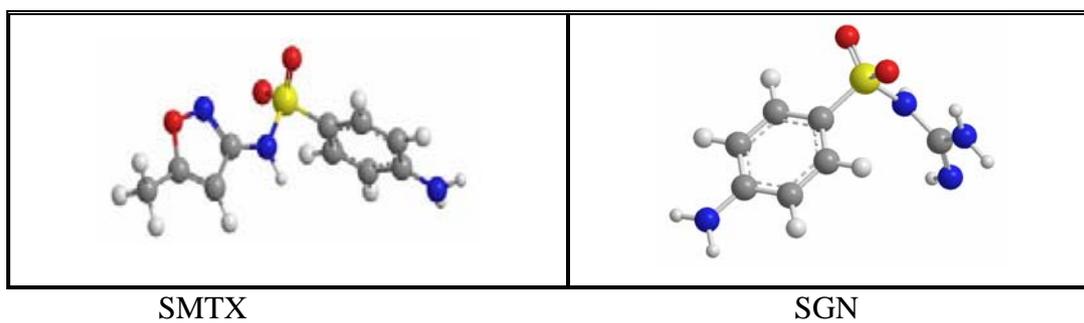


Figura IV.18.- Modelos de β -CD, SMTX y SGN

• N , • S , • O , • C , • H

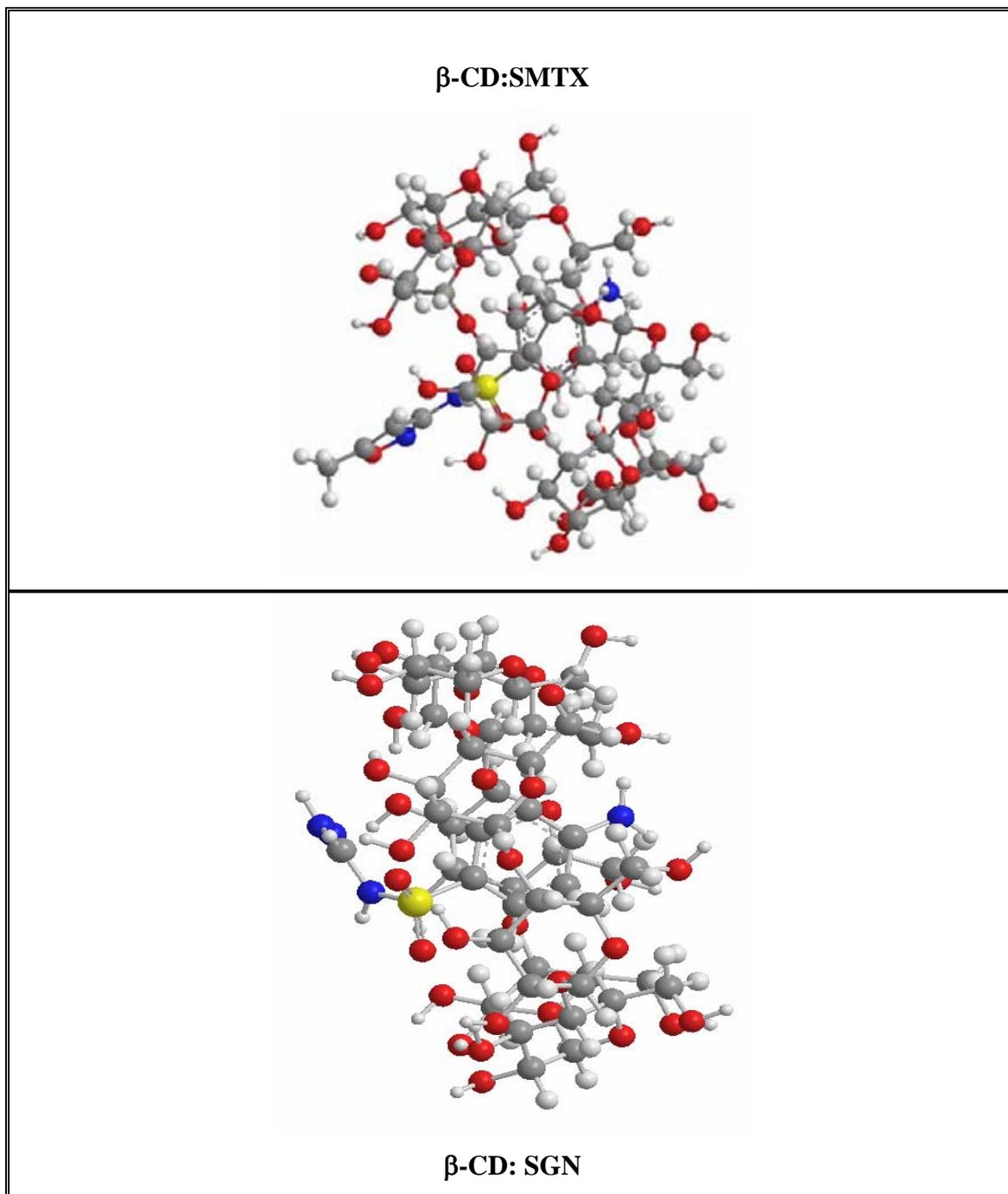


Figura IV.19.- *Modelos de los complejos de inclusión*

En estos modelos puede observarse que es el anillo bencénico de las moléculas el que estaría incluido dentro de la cavidad, junto con una parte de la cadena sulfanílica, a través del extremo más abierto de la estructura troncocónica de la ciclodextrina, quedando fuera de la misma el grupo heterocíclico del sulfametoxazol y el grupo amino de la sulfaguanidina.

Estos modelos están de acuerdo con los resultados experimentales, ya que en los dos complejos, la parte que se incluye en el interior de la ciclodextrina es la zona de los analitos en la que se encuentran los dobles enlaces conjugados, en definitiva, la zona responsable de la emisión de fluorescencia, lo que produce un aumento de dicha señal, como se comprueba en el laboratorio.

Nuestro objetivo ahora es la resolución de la mezcla SMTX y SGN, en presencia de β -ciclodextrina por técnicas de calibración multivariante y la posible determinación de ambas en alimentos y/o fluidos biológicos.

Se comenzó la posible resolución de la mezcla por técnicas derivadas, estudiando varias posibilidades, pero en ningún caso pudo resolverse dicha mezcla. A continuación se abordó la resolución mediante la utilización de PLS.

➤ **DETERMINACIÓN MULTIVARIANTE MEDIANTE PLS DE LA MEZCLA SMTX Y SGN EN PRESENCIA DE β -CD. MATRIZ DE CALIBRACIÓN**

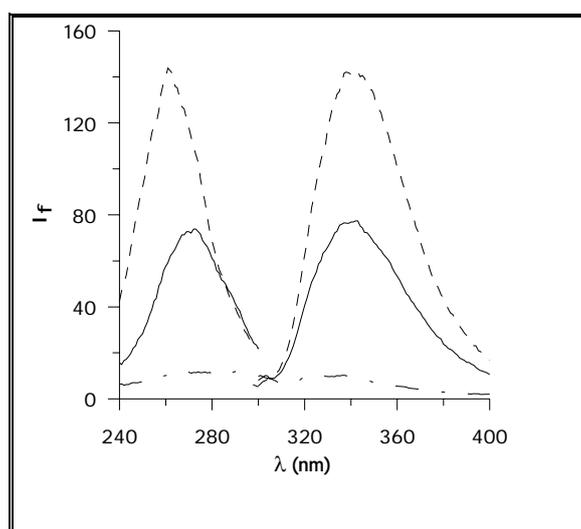


Figura IV.20.- Espectros de excitación y emisión de los complejos de $1\mu\text{g mL}^{-1}$ sulfaguanidina (- - -), $1\mu\text{g mL}^{-1}$ sulfametoxazol (_____) y β -CD (_ . . _)

En la Figura IV.20, se observa que los espectros de emisión de ambos complejos son prácticamente iguales, de ahí que se elija utilizar los espectros de excitación para realizar el estudio por PLS, ya que estos difieren algo más.

Se utiliza el método de diseño central compuesto. Este diseño es un paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una adecuada capacidad de resolución. Es importante evitar la colinealidad, emplear un número suficientemente bajo de patrones y, a la vez, abarcar un amplio rango de concentraciones, que incluyan relaciones entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés.

Cada uno de estos patrones se prepararon en matraces de 5 mL a partir de disoluciones concentradas de los analitos en agua. Se añadieron 1.5 mL de disolución tampón acético/acetato 1 M de pH 5.0, un volumen tal de disolución de β -ciclodextrina para obtener una concentración final de $9 \cdot 10^{-3}$ M, y se enrasó con agua desionizada. Previo a realizar la medida, es necesario agitar vigorosamente el matraz para conseguir una perfecta homogeneización.

Al aplicar este diseño, el número de patrones que son necesarios para la construcción de la matriz, es de 9. Las concentraciones de cada componente se recogen en la Tabla IV.15.

Tabla IV.15.- Composición de la matriz de calibración

<i>Muestra</i>	SMTX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SGN ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>Mt1</i>	75	150
<i>Mt2</i>	75	850
<i>Mt3</i>	430	150
<i>Mt4</i>	430	850
<i>Mt5</i>	250	0
<i>Mt6</i>	250	1000
<i>Mt7</i>	0.0	500
<i>Mt8</i>	500	500
<i>Mt9</i>	250	500

Como se ha señalado, los espectros de emisión de ambas sulfamidas en presencia de β -CD son prácticamente iguales, mientras que los espectros de excitación difieren entre ellos aproximadamente 10 nm, es por esto, por lo que seleccionaremos los espectros de excitación para registrar la matriz bidimensional.

También se prepararon un total de 6 muestras por duplicado (Tabla IV.16), construidas con concentraciones del analito, diferentes de las empleadas para la calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. Este grupo de muestras será utilizado para validar el modelo.

Tabla IV.16.- Composición de la matriz del conjunto de validación.

<i>Muestra</i>	SMTX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SGN ($\mu\text{g L}^{-1}$)
<i>Val1</i>	0.0	900
<i>Val2</i>	100	700
<i>Val3</i>	200	500
<i>Val4</i>	300	300
<i>Val5</i>	400	0.0
<i>Val6</i>	450	600

En las condiciones experimentales indicadas anteriormente, la máxima información fluorescente de estas sulfamidas, se obtiene en el intervalo de longitudes de onda de excitación comprendidas entre 240-290 nm, fijando la emisión a 338 nm, estando situados los máximos de excitación de sulfaguanidina y de sulfametoxazol en 263 y 273 nm, respectivamente. Las rendijas de excitación y emisión se mantuvieron en 10 y 5 nm, respectivamente y los espectros se digitalizaron cada 1 nm.

Para calcular la matriz de calibración, se hizo uso de la interfase gráfica MVC1 [95]. Esta interfase ha sido diseñada bajo el entorno MATLAB; es una interface que nos permite llevar a cabo calibración multivariante, mediante diversos algoritmos tales como PCR, PLS y otros basados en la señal neta del analito, como HLA/GO. Esta interface permite también llevar a cabo validaciones cruzadas, calibración y predicción de muestras desconocidas, proporcionándonos los límites de confianza para las concentraciones calculadas, la sensibilidad y selectividad del método aplicado, los

parámetros indicadores de error y residuales basados en el NAS. También permite obtener la señal neta para el analito, residuos espectrales, factores espectrales, coeficientes de regresión final y escalares.

El programa MVC1 puede trabajar en entorno Windows. Tiene una presentación muy sencilla, que permite su fácil utilización. Requiere que los espectros del conjunto de calibración sean registrados en formato ASCII. A modo de ejemplo, se muestra la pantalla principal del programa (Figura IV.21):

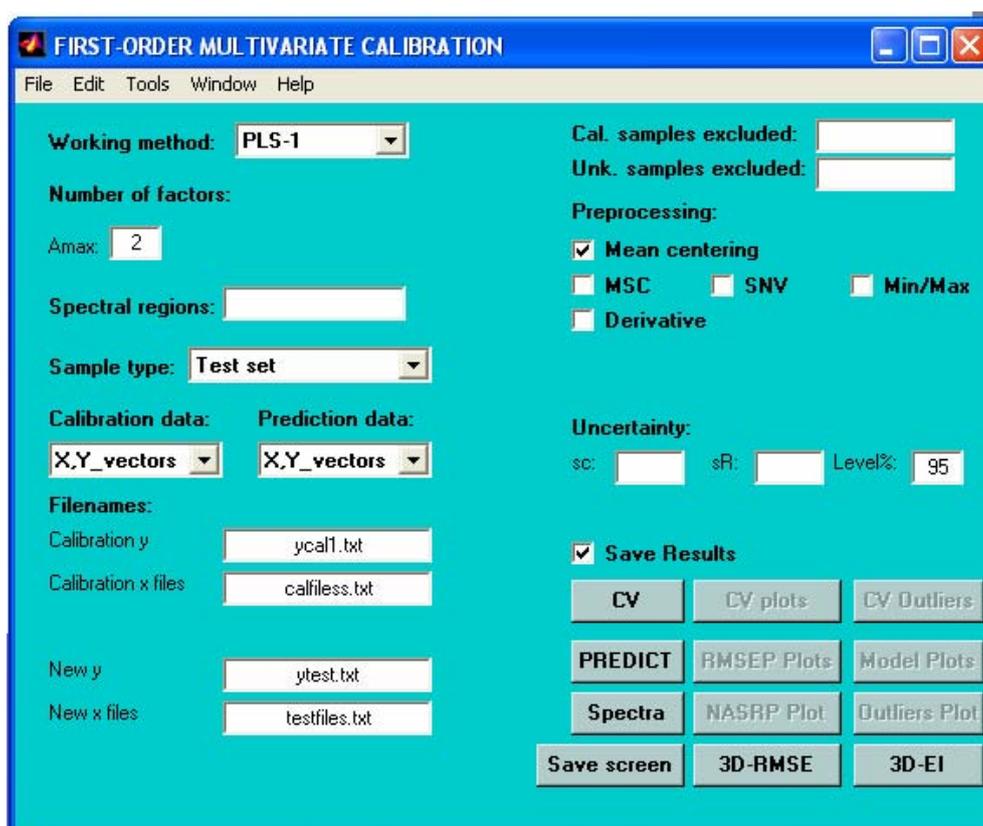


Figura IV.21.- Interfase gráfica del programa MVC1

DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE FACTORES ÓPTIMO

Se registraron los espectros de excitación fluorescente para el conjunto de muestras de la Tabla IV.15, a la longitud de onda de emisión de 338 nm, y utilizando como rango de excitación todo el intervalo, es decir desde 240 a 290 nm cada 1 nm. Se utilizó el método de validación cruzada para el conjunto de patrones de calibración para optimizar el número de factores. El análisis del coeficiente de regresión y el valor del PRESS (suma de los cuadrados de los errores residuales), nos permitieron seleccionar como óptimo el número de factores para el primer valor del PRESS, cuya probabilidad para la razón F es menor que 0.75, de acuerdo con el criterio de Haaland y Thomas [96]. El número óptimo de factores elegido es de 2, según dicho criterio. En la Tabla IV.17, se recogen los valores obtenidos para el PRESS y el coeficiente de correlación mediante PLS.

Tabla IV.17.- *Parámetros de la calibración mediante PLS*

Analito	Factores	PRESS	REP (%)	(R²)
<i>Sulfaguanidina</i>	2	0.013	7.6	0.986
<i>Sulfametoxazol</i>	2	0.003	9.7	0.982

➤ **Análisis de sulfaguanidina mediante PLS**

Una vez realizada la validación cruzada, el programa permite la obtención de diversos gráficos. En la Figura IV.22 observamos la variación del valor del PRESS, del

SEP y sus respectivos logaritmos decimales frente al número de factores. Del análisis de las diferentes gráficas podemos concluir que el número óptimo de factores es igual a 2.

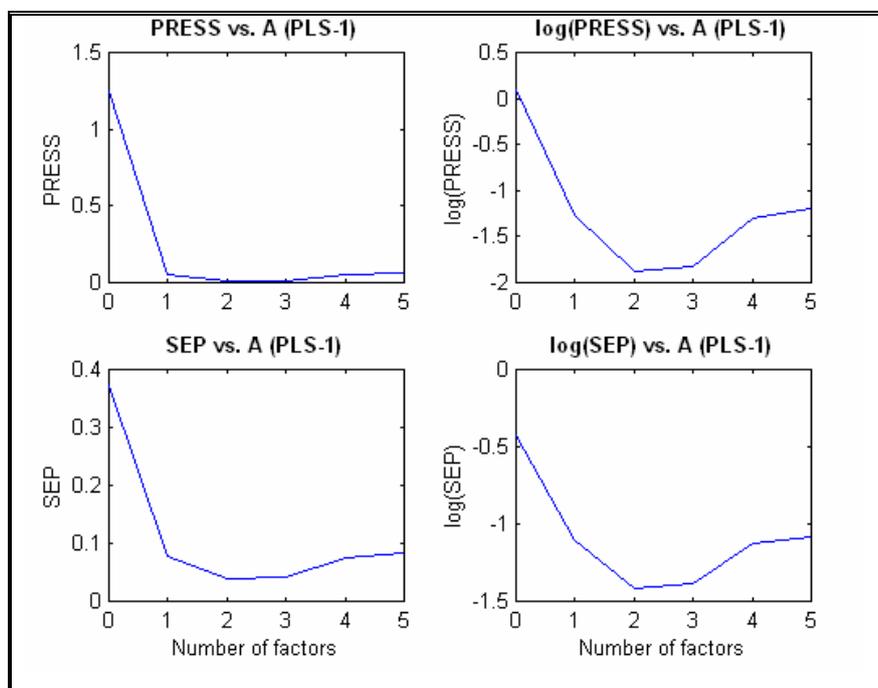


Figura IV.22.- Variación del valor de PRESS, SEP y sus respectivos logaritmos en función del número de factores

El programa nos permite realizar la detección de muestras desechables, tanto para las muestras de calibración como para las de validación. Estas muestras desechables son aquellas cuyo valor de relación F sea mayor que uno, siendo F la relación entre el error de predicción al cuadrado para la muestra dejada fuera y el promedio del error de predicción al cuadrado. Para el caso de la sulfaguanadina, no se encontraron muestras desechables. En la Figura IV.23 se representan los valores obtenidos para esta relación F , así como los valores de los residuos espectrales.

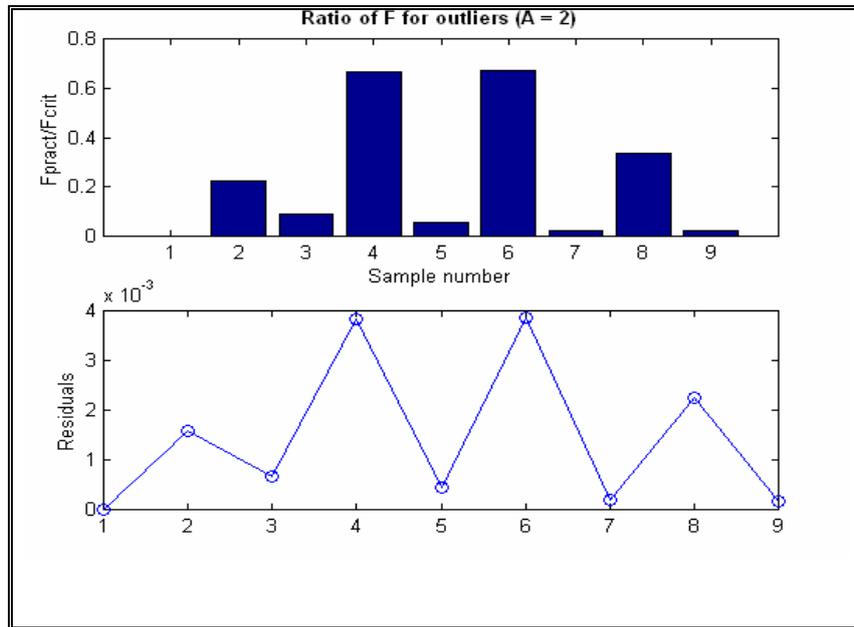


Figura IV.23.- Detección de muestras desechables para las muestras de calibración

Una vez realizada la selección del modelo, se pasó a su validación. Para ello se hizo uso de las muestras de predicción recogidas en la Tabla IV.16. En la siguiente Tabla IV.18 se recogen los valores de concentración para cada una de estas muestras de predicción así como el valor de concentración predicho por el modelo. Cada una de las muestras fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento que el establecido para preparar los patrones de la matriz de calibración.

Tabla IV.18.- Aplicación del modelo PLS optimizado para la determinación de sulfaguanidina (SGN) en muestras binarias e individuales

<i>Muestra</i>	SMTX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SGN ($\mu\text{g L}^{-1}$)	<i>SGN</i> ^{Predicha} ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R
<i>Val1</i>	0.0	900	860	95
<i>Val2</i>	100	700	680	97
<i>Val3</i>	200	500	502	100
<i>Val4</i>	300	300	307	102
<i>Val5</i>	400	0.0	0.001	----
<i>Val6</i>	450	600	588	98

Cálculo de los parámetros de calidad

El programa MVC1 también nos permite obtener los parámetros de calidad tras aplicar el modelo PLS, de este modo se hallaron los parámetros de sensibilidad, selectividad y límite de detección. El cálculo del límite de detección se basa en el registro de los espectros de un número de muestras blanco, siguiendo las mismas condiciones que las establecidas para la construcción de la matriz de calibración. Este procedimiento está basado en la utilización de la señal neta del analito (NAS). Una vez obtenidos los espectros de las muestras blanco y mediante un programa de cálculo se estimó el valor de $||S_b||$, dicho valor se aproxima al valor del ruido instrumental, S_r . El LOD se puede calcular como:

$$\text{LOD} = 3 \cdot S_r \cdot ||b|| = (3 \cdot S_r) / \text{SEN}$$

siendo SEN la sensibilidad calculada por el modelo.

En la siguiente tabla se resumen los valores obtenidos para SEN, SEL y $\text{LOD}(3 \cdot S_r / \text{SEN})$ para la sulfaguanidina.

Tabla IV.19.- Parámetros de calidad para sulfaguanidina tras aplicar PLS

SEN ($L \mu g^{-1}$)	637
SEL	0.393
LOD ($\mu g L^{-1}$)	15

El programa nos permite obtener gráficas de la variación de RMS frente al número de factores. También se obtiene una representación de la concentración real frente a la predicha para cada analito, así como la variación del error residual. Por último, nos permite representar las gráficas obtenidas al realizar el test de la elipse (EJCR) usando regresión de mínimos cuadrados ordinario o ponderado. En la Figura IV.24 se recogen todas estas gráficas.

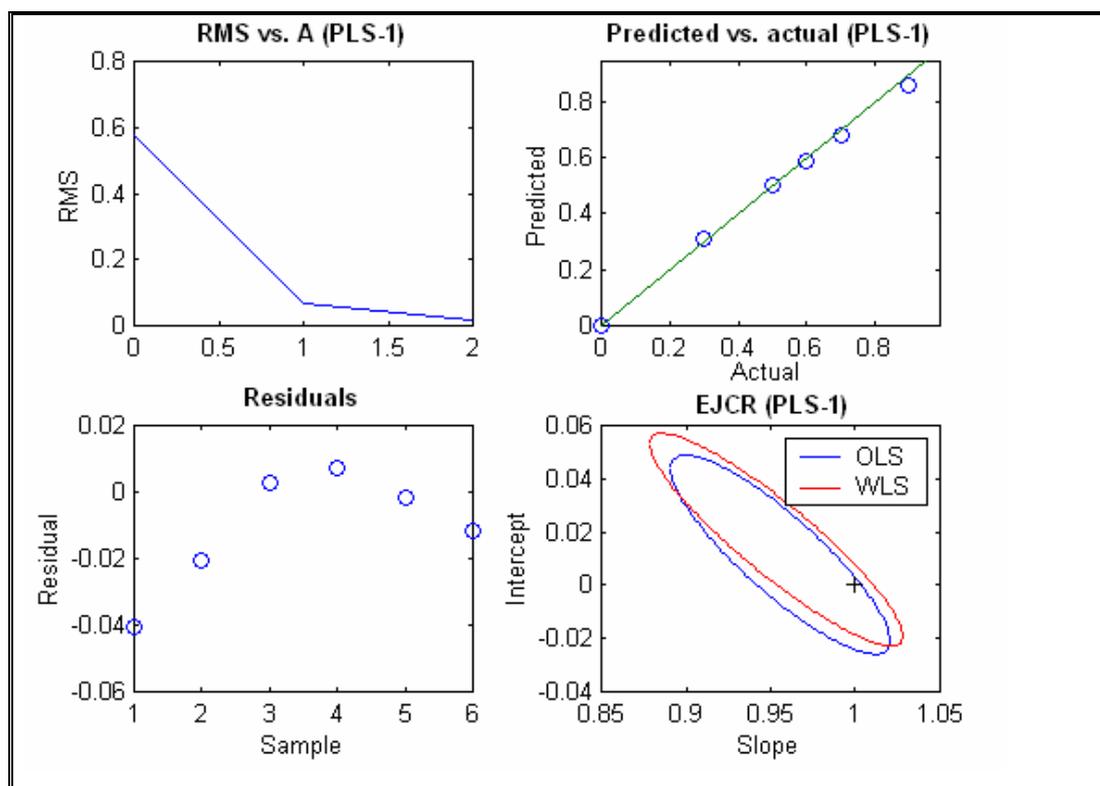


Figura IV.24.- Gráficas estadísticas obtenidas con el programa MVC1 para la determinación de sulfaguanidina

➤ **Análisis de sulfametoxazol mediante PLS**

El mismo análisis llevado a cabo con la sulfaguanidina se realizó con el sulfametoxazol. En la Figura IV.25 observamos la variación del valor del PRESS; del SEP y sus respectivos logaritmos decimales frente al número de factores. Del análisis de las diferentes gráficas no podemos concluir cuál es exactamente el número óptimo de factores, esto puede ser debido a que en la matriz de calibración haya muestras desechables.

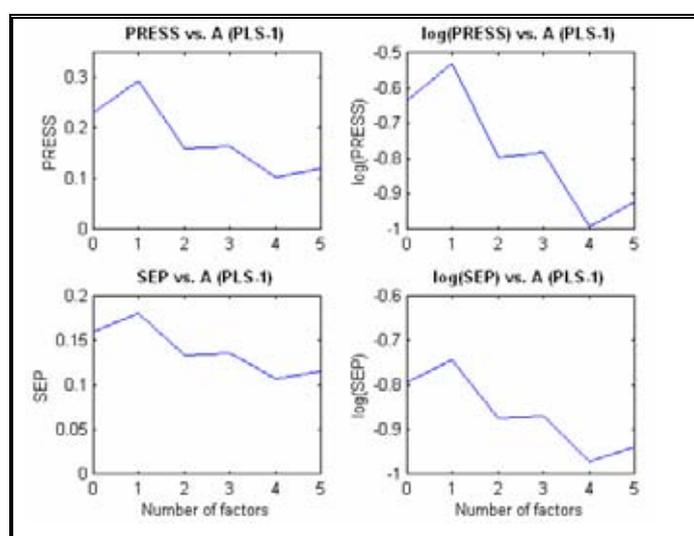


Figura IV.25.- Variación del valor de PRESS, SEP y sus respectivos logaritmos en función del número de factores

Para el caso del sulfametoxazol, se encontraron dos muestras desechables en la calibración. Por tanto, se realizó de nuevo la validación cruzada eliminando estas dos muestras. Se representaron de nuevo el valor del PRESS y SEP y sus respectivos logaritmos, de donde puede concluirse que el número óptimo de factores es igual a 2 (Figura IV.26)

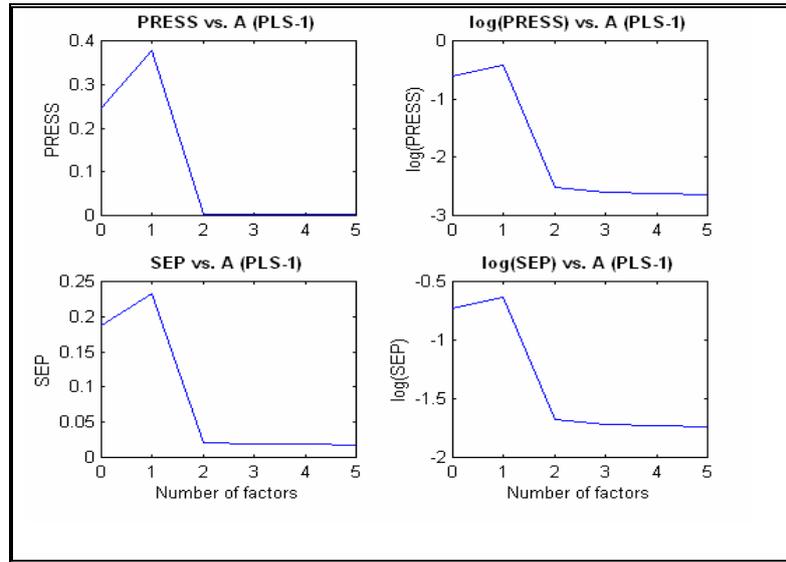


Figura IV.26.- Variación del valor de PRESS, SEP y sus respectivos logaritmos en función del número de factores

En la Figura IV.27 se representan los valores obtenidos para la relación F, así como los valores de los residuos espectrales.

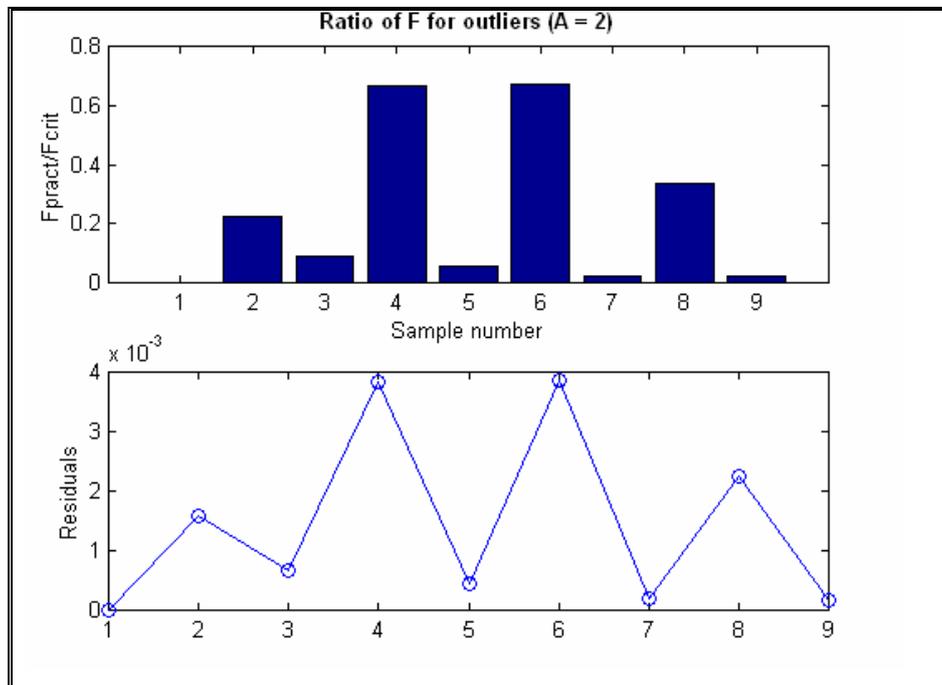


Figura IV.27.- Detección de muestras desechables para las muestras de calibración

Una vez realizada la selección del modelo, se pasó a su validación. Para ello se hizo uso de las muestras de predicción recogidas en la Tabla IV.16. En la Tabla IV.20 se recogen los valores de concentración para cada una de estas muestras de predicción, así como el valor de concentración predicho por el modelo. Cada una de las muestras fueron preparadas siguiendo el mismo procedimiento que el establecido para preparar los patrones de la matriz de calibración.

Tabla IV.20.- Aplicación del modelo PLS optimizado para la determinación de sulfametoxazol (SMTX) en muestras binarias e individuales

<i>Muestra</i>	SMTX ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SGN ($\mu\text{g L}^{-1}$)	SMTX <i>Predicho</i> ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R
<i>Val1</i>	0.0	900	-0.01	---
<i>Val2</i>	100	700	95	95
<i>Val3</i>	200	500	206	103
<i>Val4</i>	300	300	281	94
<i>Val5</i>	400	0.0	401	100
<i>Val6</i>	450	600	431	96

Cálculo de los parámetros de calidad

Se hallaron los parámetros de sensibilidad, selectividad y límite de detección. En la siguiente Tabla IV.21 se resumen los valores obtenidos para SEN, SEL y LOD($3 \cdot \text{Sr}/\text{SEN}$) para el sulfametoxazol.

Tabla IV.21.- Figuras de mérito para sulfametoxazol tras aplicar PLS

SEN ($L \mu g^{-1}$)	236
SEL	0.539
LOD ($\mu g L^{-1}$)	24

Si se comparan estos valores con los obtenidos para SGN, vemos que la sensibilidad es más baja para el caso del SMTX, así como que el límite de detección es algo mayor.

En la Figura IV.28 se recogen las gráficas de RMS frente al número de factores, de la concentración actual frente a la predicha para cada analito, así como la variación del error residual y las obtenidas al realizar el test de la elipse (EJCR) usando regresión de mínimos cuadrados ordinario o ponderado .

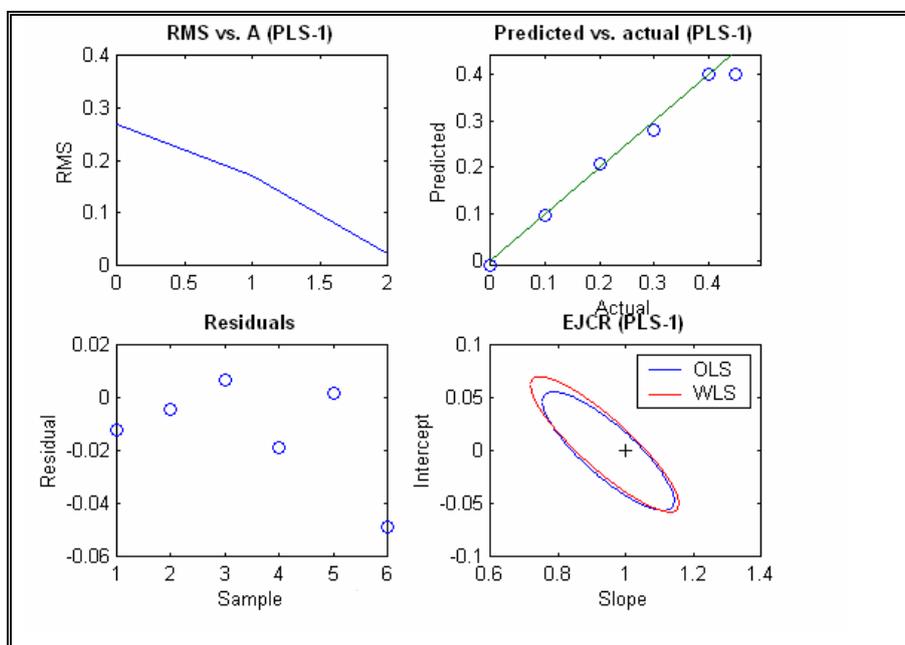


Figura IV.28.- Gráficas estadísticas obtenidas con MCV1 para la determinación de sulfametoxazol

➤ **Determinación simultánea de SGN y SMTX en fluidos biológicos.**

Se pretende la aplicación del modelo del cálculo PLS optimizado, a la determinación simultánea o individual, en presencia de la otra sulfamida en estudio, en muestras de orina. Estos analitos suelen administrarse en formulaciones farmacéuticas via oral en dosis en torno a 250-500 mg L⁻¹, siendo su absorción del 70-90% aproximadamente, eliminándose principalmente en la orina sin ser alteradas en un 20% aproximadamente, después de sufrir una pequeña metabolización en el hígado.

En primer lugar, se estudió el grado de dilución al que se puede someter a la orina, de forma tal que la señal del fondo fuese mínima, y siempre estableciendo como condición que las concentraciones finales de los analitos quedasen comprendidas en los rangos de la matriz de calibración, teniendo en cuenta las concentraciones biológicas. Tras este estudio, fijamos como dilución óptima la de 0.1 mL en 10 mL. Se prepararon muestras de orina contaminadas con los dos analitos procediendo de la siguiente manera:

- ✓ Tomar 0.1 mL de orina en matraz de 10 mL.
- ✓ Contaminar la orina con los analitos de interés.
- ✓ Dejar transcurrir 10 minutos para favorecer las posibles interacciones entre los analitos y la matriz de la orina.
- ✓ Fijar la concentración de β -CD ($9 \cdot 10^{-3}$ M), el pH en 5.0 mediante la adición de disolución reguladora acético-acetato y enrasar con agua desionizada.
- ✓ Registrar el espectro de excitación, fijando constante una $\lambda_{em} = 338$ nm, con un potencial de 600 V.

Como se puede comprobar en la Figura IV.29 la señal producida por el fondo de orina en estas condiciones es muy grande, lo cual dificultará en gran medida la determinación de las dos sulfamidas en muestras de orina. Además, el fondo tiene un máximo aproximadamente a 270 nm, que se corresponde con el máximo de excitación del sulfametoxazol, lo que afectará seguramente a su determinación.

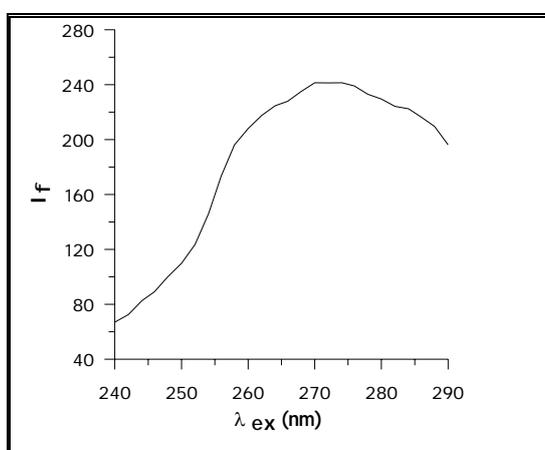


Figura IV.29- *Espectro de excitación de una dilución 1:100 de la orina ($\lambda_{em} = 338$ nm)*

A continuación, se procede a predecir dichas muestras mediante el modelo PLS optimizado.

En primer lugar, se preparó un conjunto de muestras problemas, para su predicción, empleándose para ello la matriz de calibración optimizada anteriormente. Los resultados de la predicción aparecen en la Tabla IV. 22

Tabla IV.22.- Concentraciones predichas de SMTX y SGN en muestras de orina

Muestra	SMTX ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			SGN ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Ca	Cp	R (%)	Ca	Cp	R (%)
<i>Orina 1</i>	10	13,0 \pm 1,2	130	10	10,9 \pm 0,9	109
<i>Orina 2</i>	25	27,9 \pm 0,9	112	15	14,3 \pm 1,2	95
<i>Orina 3</i>	20	24,0 \pm 0,8	120	40	42,5 \pm 2,1	106
<i>Orina 4</i>	--	0,1 \pm 0,1	--	20	21,0 \pm 1,4	105
<i>Orina 5</i>	20	25,1 \pm 1,4	125	--	--	--
<i>Orina 6</i>	0.0	0,001 \pm 0,002	--	0.0	0,001 \pm 0,001	--

En función de los resultados anteriores, observamos que sólo obtenemos valores adecuados para la sulfaguanidina, mientras que, para el caso del sulfametoxazol, el modelo no puede realizar una predicción adecuada. Esto es debido a que la señal de excitación debida al sulfametoxazol es menos sensible y solapa totalmente con la señal que produce el fondo de la orina.

Por ello, se decidió recalcular la matriz de calibración, introduciendo en los patrones de calibración orina, así como un cierto número de blancos de orina, con el objetivo de modelar la señal adecuadamente.

Tabla IV.23.- Parámetros de la calibración mediante PLS

Analito	Factores	PRESS	REP (%)	(R ²)
<i>Sulfaguanidina</i>	3	0.014	8,6	0.985
<i>Sulfametoxazol</i>	3	0.015	9,4	0.932

En la Tabla IV.23, se comprueba que el número de factores ha aumentado a 3, lógico, debido a que en la matriz de calibración se ha introducido orina. Como se puede observar, los parámetros estadísticos obtenidos en muestras que contienen orina son adecuados, obteniéndose valores de coeficientes de correlación muy satisfactorios. En el caso del SMTX, el valor del coeficiente es algo menor, debido posiblemente a su menor sensibilidad y a su solapamiento total con SGN y con la señal que produce la orina.

El procedimiento se intentará aplicar también a muestras de orina conteniendo sulfametoxazol (SMTX) y trimetoprim (TMP), debido al amplio uso de estos dos compuestos en combinación, y con objeto de conocer si la presencia de trimetoprim interfiere en la determinación de sulfametoxazol.

La combinación trimetoprim-sulfametoxazol es rápida y extensamente absorbida por el tracto gastrointestinal. Después de una dosis única de 160 mg TMP + 800 mg SMTX ; ambos fármacos se eliminan preferentemente por vía renal, después de haber experimentado un cierto metabolismo en el hígado. Hasta el 80% del TMP y el 20% del SMTX son eliminados en la orina sin ser alterados.

Tabla IV.24. – Determinación de SMTX y SGN en muestras de orina

Muestra	<i>Sulfametoxazol</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			<i>Sulfaguanidina</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Ca	Cp (RSD)	R (%)	Ca	Cp (RSD)	R (%)
<i>Orina 1</i>	10	10,6 ± 0,8	106	10	11,0 ± 1,0	110
<i>Orina 2</i>	25	24,1 ± 1,2	96	15	13,4 ± 0,9	89
<i>Orina 3</i>	20	19,2 ± 1,3	96	40	43,5 ± 1,0	108
<i>Orina 4</i>	--	--	--	20	19,3 ± 1,2	96
<i>Orina 5</i>	20	21,2 ± 1,2	106	--	---	--
<i>Orina 6</i>	15	15,1 ± 2,3	100	20	22,1 ± 0,9	110
<i>Orina 8</i>	20	17,8 ± 1,8	89	45	44,0 ± 2,1	98
<i>Orina 9</i>	30	29,0 ± 0,9	97	30	27,0 ± 1,1	90
<i>Orina 10</i>	0.0	0,001±0,002	--	0.0	0,001±0,001	--
	<i>Sulfametoxazol</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			<i>Trimetoprim</i> ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Ca	Cp (RSD)	R (%)	Ca		
<i>Orina 11</i>	30	28,0 ± 0,9	93	15		
<i>Orina 12</i>	25	26,1 ± 1,2	104	10		

Al predecir las mismas muestras que en el caso anterior, así como varias muestras más, se concluye que introduciendo en los patrones de calibración la misma proporción de orina que en las muestras reales, así como blancos de orina, los resultados obtenidos son más satisfactorios (Tabla IV.24). También se puede concluir que la presencia de trimetoprim no interfiere en la determinación de sulfametoxazol.

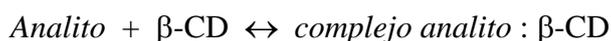
ESTUDIO DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ENTRE SULFAMETOXAZOL Y SULFAGUANIDINA CON β -CICLODEXTRINA EN UREA

Solubilización de β -ciclodextrina en urea. Aplicaciones en luminiscencia molecular

Dado que el tamaño de su cavidad es intermedio entre el de α -CD y γ -CD; β -CD forma complejos con un mayor número de moléculas que las otras dos ciclodextrinas. Esto, unido a consideraciones económicas, ya que su precio es bastante más bajo que el de α - o γ -, hace que sea la más utilizada de las tres.

Sin embargo, en muchos casos se ha observado que la magnitud del aumento de fluorescencia que se consigue utilizando β -CD está limitado por su solubilidad en agua (0,014 - 0,016 M). Es decir, la intensidad de fluorescencia de muchos compuestos de interés analítico se incrementa con la concentración de ciclodextrina, hasta que se alcanza el límite de solubilidad en agua.

El proceso de complejación entre el analito y la ciclodextrina es una situación de equilibrio dinámico:



Por tanto, la dependencia de la fluorescencia con la concentración de ciclodextrina es indudablemente debida a un incremento del porcentaje de molécula de analito que está incluido en la cavidad de la ciclodextrina.

Se concluye entonces que la intensidad de fluorescencia de muchos analitos podría aumentarse aún más, si hubiera algún modo de incrementar la concentración de β -CD por encima de su límite de solubilidad en agua.

Mientras que las solubilidades de α -CD y γ -CD a 25 ° son 0,121 y 0,168 M respectivamente, la de β -CD es aproximadamente diez veces menor, es decir, 0,0163 M [97,98]. En consecuencia, esto crea problemas en las aplicaciones analíticas en las que se utiliza β -CD y limita sus posibles efectos beneficiosos. Con objeto de paliar este problema, se han utilizado mezclas de disolventes [99] o derivados de β -CD solubles en agua, como son hidroximetil- o metil-ciclodextrinas [100,101] y ciclodextrinas poliméricas [102]. Sin embargo, aunque son una valiosa alternativa muy a tener en cuenta, los derivados de β -CD solubles en agua son muchos más caros que β -CD [103] y su uso, al igual que la utilización de mezclas de disolventes, puede alterar la interacción entre la ciclodextrina y el analito de interés [100,104].

Recientemente, se ha sugerido la utilización de medios básicos y/o urea para aumentar la solubilidad acuosa de las ciclodextrinas, y en particular de β -CD, habiendo sido propuesta su utilización en algunos procedimientos analíticos [105-107].

La urea es un molécula aquiral planar, soluble en agua hasta una concentración 16,65 M [108] y que tiene la facultad de aumentar la solubilidad acuosa de un serie de compuestos orgánicos polares y no polares [109].

En la tabla IV.26., se reúnen los valores de la solubilidad de las ciclodextrinas en agua y en las disoluciones acuosas de urea y de hidróxido sódico en diferentes concentraciones [110].

Tabla IV.26.- Solubilidad de las ciclodextrinas (en molaridad) en diferentes medios acuosos

Ciclodextrina	Agua	Urea (4M)	Urea (8M)	NaOH (0,2 M)	NaOH (0,5 M)	NaOH (1,0 M)
α -CD	0,1197	0,056	0,086	> 0,20	> 0,38	> 0,55
β -CD	0,0168	0,089	0,226	\approx 0,15	\approx 0,29	\approx 0,40
γ -CD	0,180	0,370	---	\approx 0,20	\approx 0,37	---

Puede observarse que, tanto las disoluciones acuosas de urea como las de hidróxido sódico, aumentan la solubilidad de las ciclodextrinas, y especialmente la solubilidad de β -CD. Así, se ha sugerido su uso en aplicaciones analíticas, en vez de la utilización de derivados sintéticos de β -CD, solubles en agua, que son mucho más caros.

Se prefiere la utilización de urea en vez de hidróxido sódico debido a dos razones. En primer lugar, β -CD es algo inestable en disoluciones concentradas de hidróxido sódico [113] y, además, son más fáciles de utilizar y de manipular las disoluciones de β -CD en urea, debido a que son menos viscosas que las disoluciones de β -CD en hidróxido sódico.

Hasta la fecha, solamente se han descrito algunas aplicaciones analíticas de β -CD disuelta en urea [105-107,110,111]. Los primeros que la utilizaron con fines analíticos fueron Kinoshita y col. en sus estudios sobre la intensificación de la fluorescencia de dansil derivados de aminoácidos y proteínas [107]. Estos autores prepararon disoluciones de β -CD de concentración 0,18 M en urea 8 M.

Riehl, Mahehorn y Hinze [105], solubilizaron β -CD 0,1 M en urea 4.0 M, con objeto de investigar su influencia en la emisión quimiluminiscente del sistema lucigenina-peróxido de hidrógeno.

Por su parte, Armstrong y Jin [106] utilizaron ciclodextrinas en urea como membranas líquidas para la separación de isómeros. En concreto, prepararon disoluciones 0,7 M de β -CD, mezclando la cantidad adecuada de ciclodextrina, en 20 mL de agua que contenía 7.5 g de urea y 1.5 g de NaOH.

Hinze y col. [110] propusieron recientemente la utilización de disoluciones de β -CD en urea y en medios básicos como fases móviles en cromatografía en capa fina, para separar diferentes compuestos fenólicos isómeros, en fases estacionarias de poliamida.

Por último, de nuevo Hinze y col. [111], han efectuado un amplio estudio sobre las ventajas derivadas de la utilización de ciclodextrinas modificadas, así como de ciclodextrinas disueltas en urea y en medios básicos, para incrementar la fluorescencia de una serie de compuestos. Estudiaron el efecto de estos medios en el comportamiento fluorescente de 14 ácidos dansil amino y de 33 compuestos orgánicos de interés farmacológico.

Parte experimental

En este apartado, se investigan las características de los complejos SMTX: β -CD y SGN: β -CD utilizando disoluciones de β -CD disueltas en urea con el objetivo de aumentar la solubilidad β -CD y posiblemente la sensibilidad de los métodos fluorescentes que se propongan.

En primer lugar, se comprobó el efecto que provocaba la concentración de urea en la solubilidad de la ciclodextrina y en la señal de fluorescencia. Se observó un gran

aumento de la solubilidad de la ciclodextrina en dicho medio, consiguiendo preparar disoluciones de β -CD de 10^{-1} M, casi diez veces más concentrada que las disoluciones acuosas de dicha ciclodextrina. Preparada la disolución madre, a continuación se estudió el efecto que provocaba la concentración de urea en la señal de fluorescencia. Se prepararon disoluciones de trabajo en matraces de 5mL, donde se adicionaron diferentes concentraciones de ciclodextrina en una concentración final de urea de 0, 4 y 8 M, así como una concentración de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ de los analitos estudiados. Los valores obtenidos se recogen en las siguientes gráficas, donde puede observarse un considerable aumento de la señal de fluorescencia al utilizar urea en el medio, así como un aumento de solubilidad de la ciclodextrina. Se puede observar también que se obtiene mayor sensibilidad al utilizar una concentración 4 M de urea. Las rendijas de los monocromadores utilizadas para el SMTX son 5, 10 nm excitación-emisión respectivamente, mientras que para el caso de la SGN se han utilizado unos valores de rendija de 5,5 nm con el objeto de no saturar el detector, de ahí, que se obtengan valores de señales más grande para el caso de SMTX que para SGN. Se registraron también los diferentes blancos, no encontrándose diferencias significativas cuando la urea está presente en la disolución de ciclodextrina. A partir de los resultados obtenidos, se elige una concentración final de urea de 4 M.

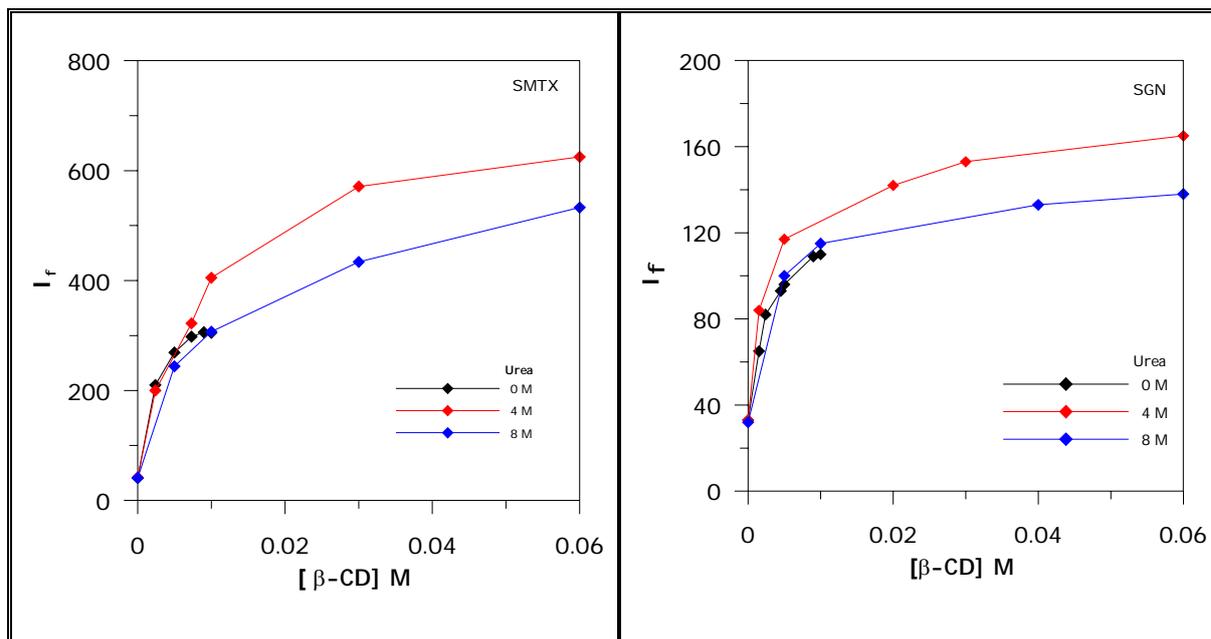


Figura IV.30.- Efecto de la concentración de urea en la intensidad de fluorescencia de SMTX y SGN

➤ INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE β-CICLODEXTRINA

Seguidamente se realizó un estudio de la influencia de la concentración de β-CD sobre la señal de fluorescencia, basándonos en la posible formación de un complejo de inclusión entre SMTX y SGN con β-CD en presencia de urea, de estequimetría 1:1. Para ello se prepararon distintas disoluciones, manteniendo constante en todas ellas una concentración de SMTX y SGN de 1.10^{-6} M y variando la concentración de β-CD entre 0 y 6.10^{-2} M, por dilución exacta de una disolución madre de β-CD/Urea 4M de 10^{-1} M.

Se comprueba el efecto de la presencia de β-CD, registrando los espectros de emisión, excitando a 274 y 264 nm, respectivamente. Los valores de concentración de β-CD ensayados y las intensidades de fluorescencia corregidas (intensidad producida por el complejo menos la que produce la β-CD) se resumen en la Tabla IV. 27.

Tabla IV.27.- Influencia de la concentración de β -CD sobre la señal de fluorescencia corregida del complejo SMTX : β -CD (I^a_{fc}) y SGN: β -CD (I^b_{fc})

$[\beta\text{-CD}] \text{ M}$	I^a_{fc}	I^b_{fc}
0	27	43
0,005	284	100
0,010	370	130
0,015	453	157
0,030	485	180
0,045	512	185
0,06	525	190

Se observa un incremento en la señal de fluorescencia en presencia de β -CD en ambos casos. Hay que tener en cuenta que la disolución de β -CD emite una señal debido al efecto de dispersión. Por tanto, a la señal de fluorescencia emitida por la disolución que contiene el complejo, hay que restarle la señal debida a la disolución de β -CD. De este modo, se obtiene la verdadera señal de fluorescencia debida al complejo de inclusión formado.

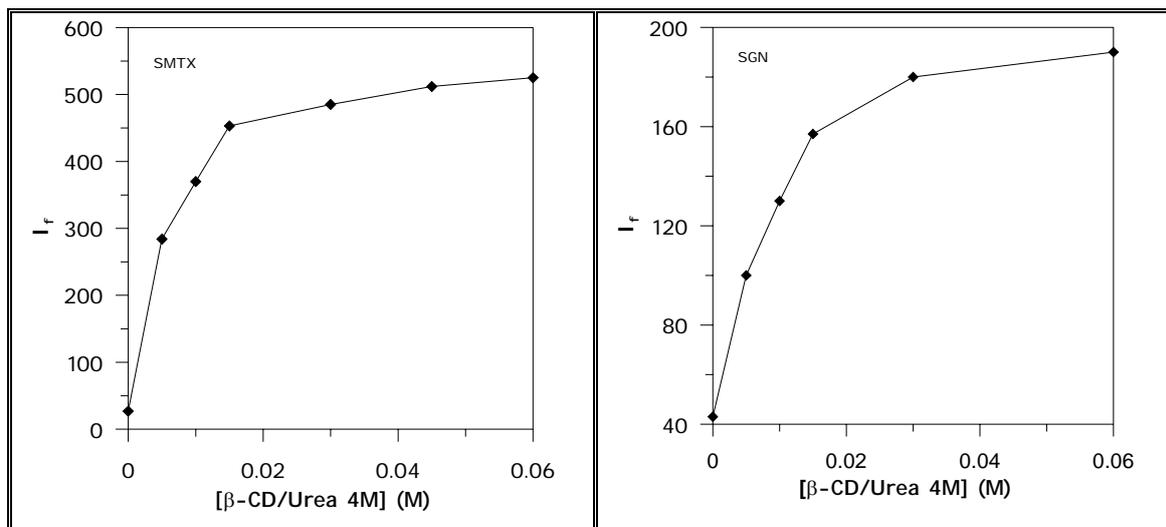


Figura IV.31.- Variación de la I_f con la concentración de $\beta\text{-CD/urea 4M}$

➤ **INFLUENCIA DEL pH SOBRE LA INTENSIDAD DE FLUORESCENCIA DE LOS COMPLEJOS SMTX : $\beta\text{-CD}$ Y SGN: $\beta\text{-CD}$**

Se realizó también un estudio del orden de adición, no observándose en ningún caso una variación apreciable de la intensidad de fluorescencia medida, lo que nos lleva a concluir que la formación de los correspondientes complejos es independiente del orden de adición de los reactivos. Aún así, se decide mantener para posteriores experiencias el siguiente orden de adición: analito + disolución reguladora + ciclodextrina + agua desionizada.

Para comprobar el efecto que ejerce el pH sobre la intensidad de fluorescencia, se realizó un estudio de la variación de ésta a distintos valores de pH. Se prepararon muestras conteniendo $1 \mu\text{g. mL}^{-1}$ de SMTX y SGN y una concentración de $\beta\text{-CD/Urea 4M}$ de $6 \cdot 10^{-2}$ M. El pH se fue variando por la adición de pequeños volúmenes de disoluciones de HCl y NaOH; la fuerza iónica se controló manteniendo una concentración 0,1 M de KCl en todas las disoluciones.

Se registraron los correspondientes espectros de emisión utilizando unas longitudes de onda de excitación de 274 y 264 nm, respectivamente. Como puede observarse en la Figura IV.32., donde se representan los valores de intensidad de fluorescencia frente a los distintos valores de pH, en medios muy básicos la formación del complejo es más débil que a pH comprendidos entre 3 y 5.5, para el caso de sulfametoxazol, y entre 4.5 y 6.5, para sulfaguanidina.

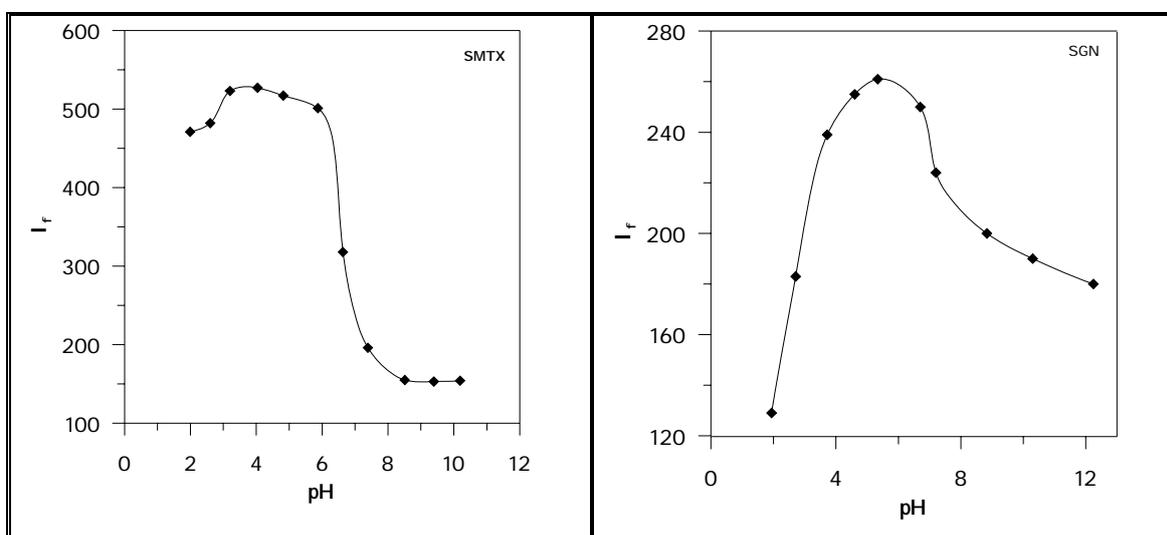


Figura IV.32.- Variación de la intensidad de fluorescencia de los complejos de inclusión con el pH

A la vista de los resultados se eligió un pH de trabajo de 4.5 para el SMTX y de 5.5 para SGN, por adición de tampón acético/acetato sódico.

Seguidamente se realizó un estudio de la influencia de la concentración de tampón acético/acetato, encontrando que la concentración de éste no afecta a la If de los complejos estudiados, por lo que se selecciona una concentración final de tampón de 0,4 M.

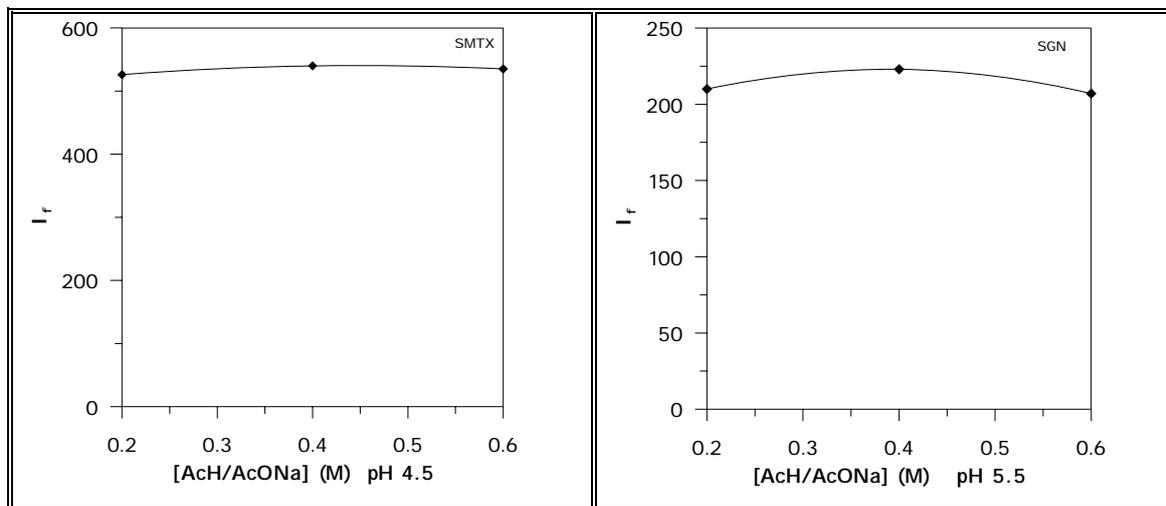


Figura IV.33.- Influencia de la concentración de tampón acético/acetato sódico

➤ INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SMTX Y SGN

Para estudiar de que forma influye la concentración de SMTX sobre la señal de fluorescencia, se prepararon muestras de concentraciones crecientes del analito en matraces aforados de 5 mL, a los que se añadió, 3 mL de disolución 10^{-1} M de β -CD/ Urea 4M, 1.5 mL de disolución reguladora de pH 4.5, y agua desionizada hasta enrase. En el caso de SGN utilizamos disolución reguladora de pH 5.5.

Se registraron los espectros de emisión a 342 nm, empleando como longitud de onda de excitación 274 nm, para el caso de SMTX, y utilizando 343 y 263 nm, respectivamente para el caso de SGN. Se utilizaron como valores de rendija los de 5, 10 nm excitación:emisión para SMTX y 5, 5 nm, respectivamente, para SGN, con objeto de no saturar el detector en el caso de SGN. Los resultados obtenidos se representan en la Figura IV.34, en la que se puede observar que la señal de

fluorescencia aumenta de forma lineal a medida que lo hace la concentración de SMTX y SGN hasta que ésta alcanza un valor de $200 \mu\text{g L}^{-1}$.

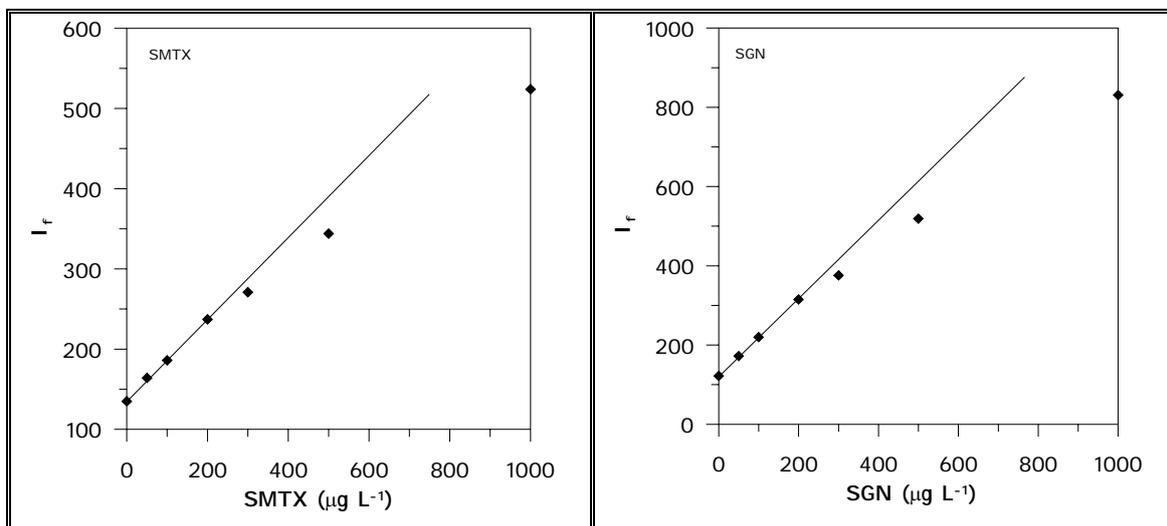


Figura IV.34.- Variación de la intensidad de fluorescencia con la concentración de SMTX y SGN

➤ **ESTABILIDAD DE LAS DISOLUCIONES DE TRABAJO Y DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN FORMADOS**

Mediante medidas de fluorescencia se realizó el estudio de la estabilidad de las disoluciones de trabajo, así como de los complejos de inclusión formados, observándose que las disoluciones madres eran estables al menos 15 días, guardadas en frascos color topacio y en el frigorífico, mientras que las disoluciones diluidas preparadas a partir de éstas, lo eran al menos 7 días en las mismas condiciones. En cuanto a los complejos se comprueba que éstos se forman instantáneamente y permanecen estables, al menos durante 1 hora desde el momento de su preparación.

➤ **RECTA DE CALIBRADO. PARÁMETROS DE CALIDAD**

Fijadas las condiciones de trabajo, así como el rango de linealidad, se procedió a establecer la correspondiente recta de calibrado.

En matraces de 5 mL se prepararon patrones, por triplicado, en el rango de concentraciones comprendido entre 0 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$, para el caso de SMTX y SGN, agregando en cada caso 3 mL de disolución 10^{-1} M de β -CD/Urea 4M, 1.5 mL de disolución reguladora de 0.5 M pH 4.5 y 5.5 respectivamente, y agua ultrapura hasta enrase. Excitando a 274 y 263 nm respectivamente, se registraron los espectros de emisión y se midió la intensidad de fluorescencia a una longitud de onda de emisión de 342 y 343 nm respectivamente. Los resultados obtenidos, tratados con el programa ACOC, muestran una adecuada linealidad entre 29 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para el SMTX y entre 11 y 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ para la SGN. Los parámetros de calidad se recogen en la Tabla IV.28. Ambas rectas pasaron positivamente el test ANOVA.

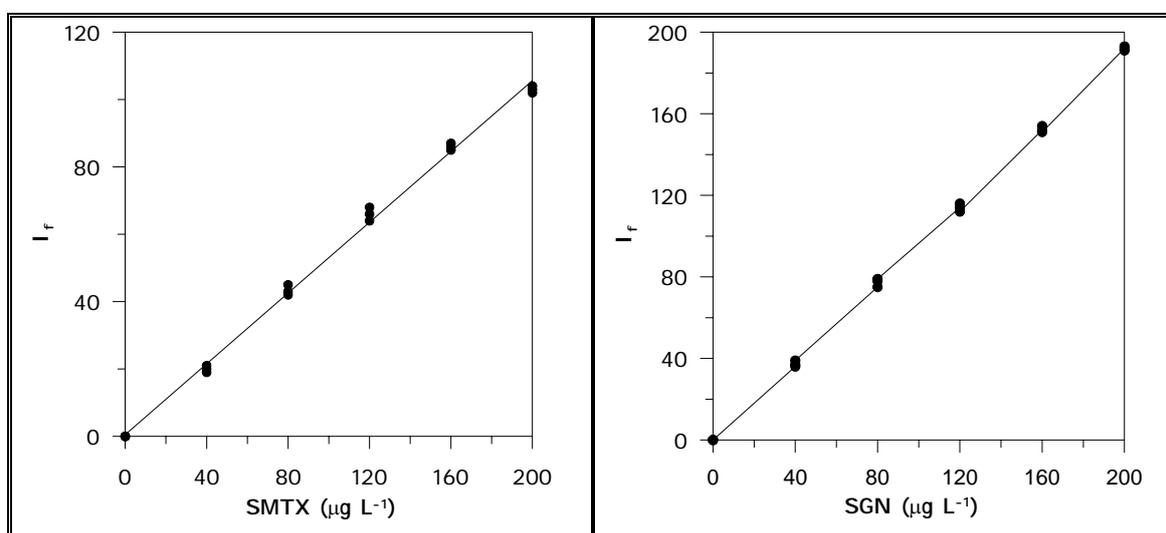


Figura IV.35.- Rectas de calibrado

Tabla IV.28.- Parámetros de calidad

	<i>SMTX</i>	<i>SGN</i>
Pendiente (b)	0.53	0.96
Ordenada en el origen (a)	0.50	0.33
Desviación típica de la pendiente (S_b)	0.01	0.01
Desviación típica de la ordenada en el origen (S_a)	0.89	0.63
Coefficiente de determinación (r^2)	0.997	0.999
Linealidad (1- $DER(b)$) %	98.62	99.21
Sensibilidad analítica ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	4.0	1.5
LOD (Winefordner y Long)($\mu\text{g.L}^{-1}$)	5.0	2.0
LOD (Clayton)($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g.L}^{-1}$)	9.9	3.8

Si se comparan los límites de detección con los obtenidos en ausencia de urea, se ve que se consiguen límites más bajos en presencia de Urea 4M.

➤ ***ESTEQUIOMETRÍA Y CONSTANTE DE FORMACIÓN DE LOS COMPLEJOS DE INCLUSIÓN ENTRE SULFAMETOXAZOL Y SULFAGUANIDINA CON β -CICLODEXTRINA/UREA 4M***

A partir de los resultados obtenidos del estudio de la influencia de la concentración de β -ciclodextrina sobre la I_f , se determinaron la estequiometría y la constante de formación del complejo de inclusión de SMTX y SGN con β -ciclodextrina/Urea 4 M, de la siguiente manera:

a) Cálculo de la estequiometría de los complejos

a.1.-Método de Benesi-Hildebrand

La ecuación (11) puede ponerse también en la forma más familiar del “gráfico doble recíproco” o gráfico de Benesi-Hildebrand.

$$1/(F - F_0) = [1 / (F_\infty - F_0) K_1 [CD]_0 + 1 / (F_\infty - F_0)] \quad (12)$$

Una representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]_0$ debería darnos una línea recta en el caso en que la estequiometría del complejo fuera efectivamente 1:1. En la Tabla IV.27 se resumen los valores calculados de $1/(F-F_0)$ y de $1/[CD]_0$.

Tabla IV.27.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:1 de los complejos SMTX: β -cd/Urea 4M (a) y SGN: β -cd/4M (b)

$1/[\beta\text{-CD}](M)^{-1}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$[1/(F-F_0)]^b$
200	0,0039	0,0017
100	0,0029	0,0011
66,6	0,0025	0,0097
33,3	0,0022	0,0072
22,2	0,0021	0,0070
16,6	0,002	0,0068

En la Figura IV.36 se muestra una representación gráfica de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]$.

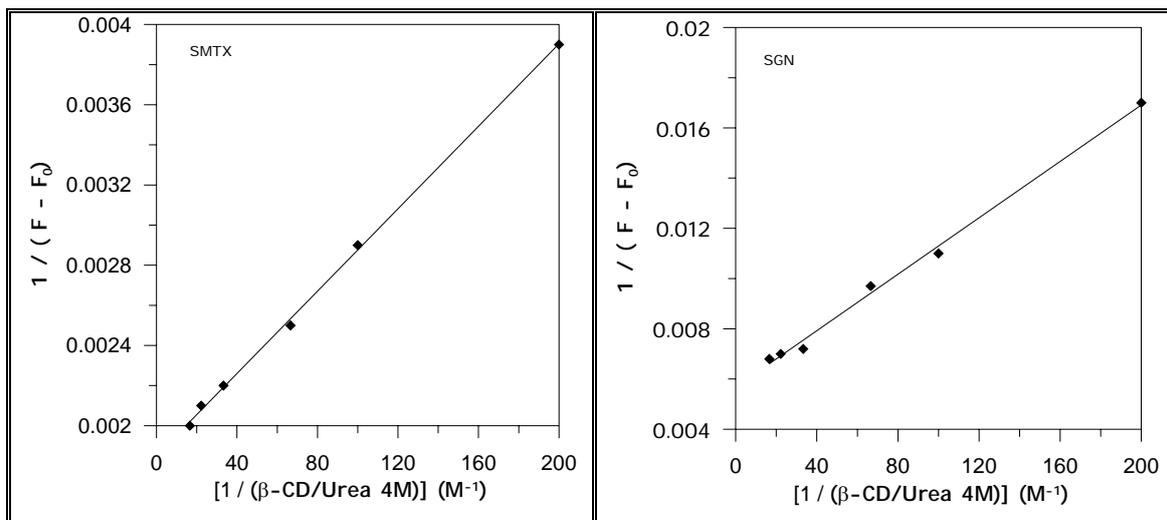


Figura IV.36.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:1 del complejo SMTX: β -cd/Urea 4M y SGN: β -cd/Urea 4M

Si en vez de asumir una estequiometría 1:1, supusiéramos una estequiometría 2:1 del complejo β -CD : SULFA, en este caso, la representación de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[\text{CD}]^2$ debería ser una línea recta (116).

Los valores de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[\text{CD}]^2$, calculados a partir de los datos experimentales obtenidos, están recogidos en la Tabla IV.28 y representados en la Figura IV.37.

Tabla IV.28.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 del complejo SMTX: β -CD/Urea 4M (a) y SGN: β -CD/Urea 4M (b)

$1/[\beta\text{-CD}]^2(\text{M})^{-2}$	$[1/(F-F_0)]^a$	$[1/(F-F_0)]^b$
40000	0,0039	0,0017
10000	0,0029	0,0011
4444,4	0,0025	0,0097
1111,1	0,0022	0,0072
493,8	0,0021	0,0070
277,7	0,002	0,0068

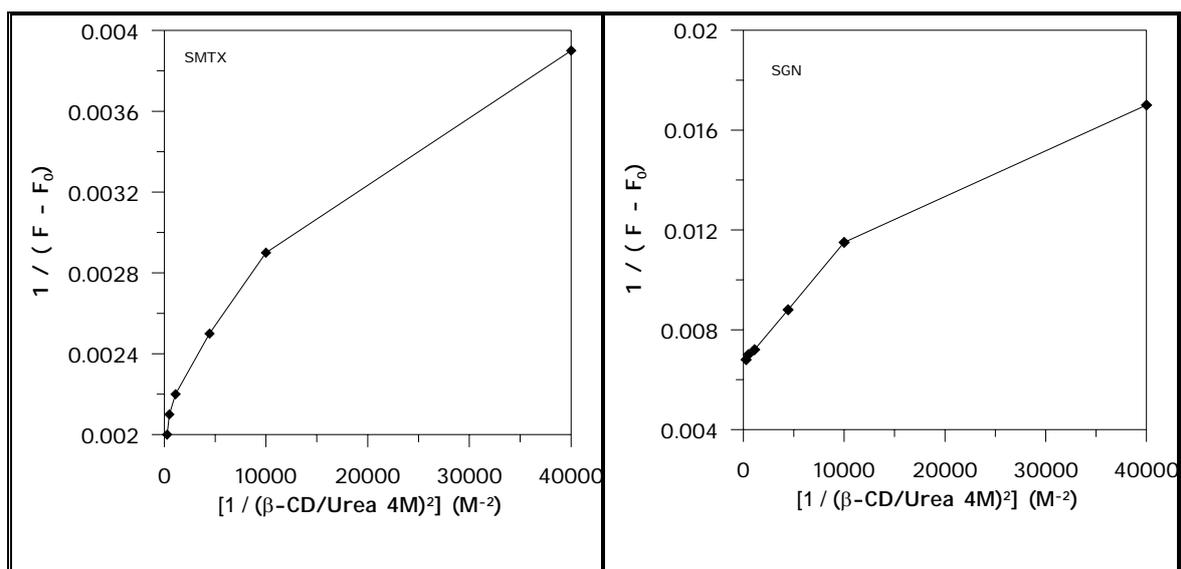


Figura IV.37.- Método de Benesi-Hildebrand para una estequiometría 1:2 del complejo SMTX: β -CD/Urea 4M y SGN: β -CD/Urea 4M

Como se observa en las Figura IV.37, la representación de los datos experimentales no se ajusta a una línea recta, lo que aporta un evidencia adicional de que los complejos SMTX: β -CD y SGN: β -CD presentan una estequiometría 1:1.

a.2.- Método de Scatchard

Según la ecuación:

$$(F - F_0) / [CD]_0 = (F_\infty - F_0) K_1 - (F - F_0) K_1 \quad (15)$$

si al representar $(F - F_0) / [CD]_0$ frente a $(F - F_0)$ obtenemos una línea recta, es que la estequiometría es realmente 1:1. Este método nos permite confirmar la estequiometría calculada por el método de Benesi-Hildebrand ya que según la ecuación 15, si obtenemos una línea recta, la estequiometría es realmente 1:1. En la Tabla IV. 29 se encuentran los valores calculados para $(F - F_0) / [\beta\text{-CD}]$ y $(F - F_0)$ y se representan en la Figura IV.38.

Tabla IV.29- *Método de Scatchard para el cálculo de las estequiometrías de los complejos SMTX: β-cd/Urea 4M(a) y SGN: β-cd/Urea 4M (b)*

$(F - F_0)$	$[(F - F_0) / (\beta\text{-CD})]^a$	$(F - F_0)$	$[(F - F_0) / (\beta\text{-CD})]^b$
257	51400	57	11400
343	34300	77	9500
426	22345,5	114	6700
458	15266,6	137	4566,6
485	10777,7	143	3545
498	8300	147	2900

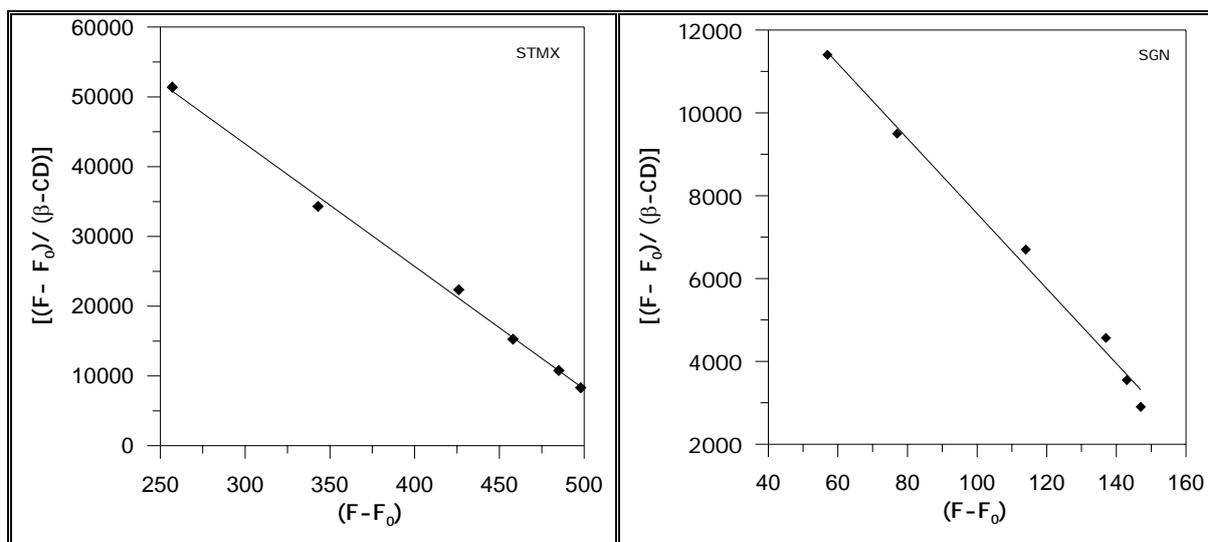


Figura IV.38.- Método de Scatchard para el cálculo de estequiometrías

En la gráfica se puede observar que en los dos casos se obtienen líneas rectas, lo que viene a confirmar la estequiometría 1:1, para los complejos estudiados.

b) Cálculo de la constante de formación de los complejos

b.1.- Método de Benesi-Hildebrand

Mediante la representación de los datos experimentales según el método de Benesi-Hildebrand, es posible asimismo efectuar el cálculo de la constante de formación del complejo en estudio, una vez determinada su estequiometría.

En nuestro caso, en que la estequiometría es 1:1, a partir de la representación gráfica de $1/(F-F_0)$ frente a $1/[CD]_0$, y teniendo en cuenta la ecuación 17, la ordenada en el origen nos daría el valor de $1/(F_\infty - F_0)$, y k_1 podría ser estimada como la ordenada en el origen dividida por la pendiente de la recta.

En la Tabla IV.30 se recogen las ecuaciones de las rectas obtenidas al suponer estequiometría 1:1.

Tabla IV.30.- Ecuaciones de las rectas de los complejos formados

Complejo	Ecuación de la recta	r^2
<i>SMTX:</i> β -CD/Urea 4M	$y = 4,02 \cdot 10^{-6} x + 0,0018$	0,998
<i>SGN:</i> β -CD/Urea 4M	$y = 1,20 \cdot 10^{-5} x + 0,0056$	0,997

Los valores obtenidos por este método se resumen en la Tabla IV.31.

Tabla IV.31.- Parámetros hallados por el método de Benesi-Hildebrand

Complejo	F_0	$K (M^{-1})$	Log K
<i>SMTX:</i> β -CD/Urea 4M	27	447	2,65
<i>SGN:</i> β -CD/Urea 4M	43	467	2,67

b.2.- Método de Scatchard

Mediante el método de Scatchard, al representar $(F - F_0) / [CD]_0$ frente a $(F-F_0)$ obtenemos una línea recta que presenta una pendiente de $-K$, donde K sería la constante de formación del complejo.

En la siguiente Tabla se encuentran resumidas las ecuaciones de las rectas obtenidas, así como los parámetros obtenidos por este método.

Tabla IV.32.- Ecuaciones de las rectas de los complejos formados y parámetros hallados por el método de Scatchard

Complejo	Ecuación de la recta	K (M ⁻¹)	Log K
SMTX:β-CD/Urea 4M	-435,70 x + 95977,37	435	2,64
SGN:β-CD/Urea 4M	-451,48 x + 16620,74	451	2,65

b.3.- Método de regresión no lineal

Los parámetros iniciales que se necesitan para el método de regresión no lineal han sido obtenidos a partir del gráfico lineal del método de Benesi-Hildebrand. La subrutina de regresión no lineal aporta una estimación de los dos parámetros desconocidos utilizando el proceso iterativo de Marquardt. El valor de las constantes de formación obtenidas son:

Tabla IV.33.- Valores de las constantes de formación obtenidas por el método de regresión no lineal

Complejo	a(1)	a(2)	F ₀	K (M ⁻¹)	Log K
SMTX:β-CD	180	465,5	27	446	2,64
SGN:β-CD	185	450	43	453	2,65

Con objeto de ajustar los valores obtenidos experimentalmente a la ecuación correspondiente, en la que se hace uso de los valores de F₀, a(1) y a(2), se emplea el programa Excel, obteniéndose las gráficas que se muestran en la Figura IV.39, comprobándose que hay un buen ajuste de los puntos experimentales a la ecuación.

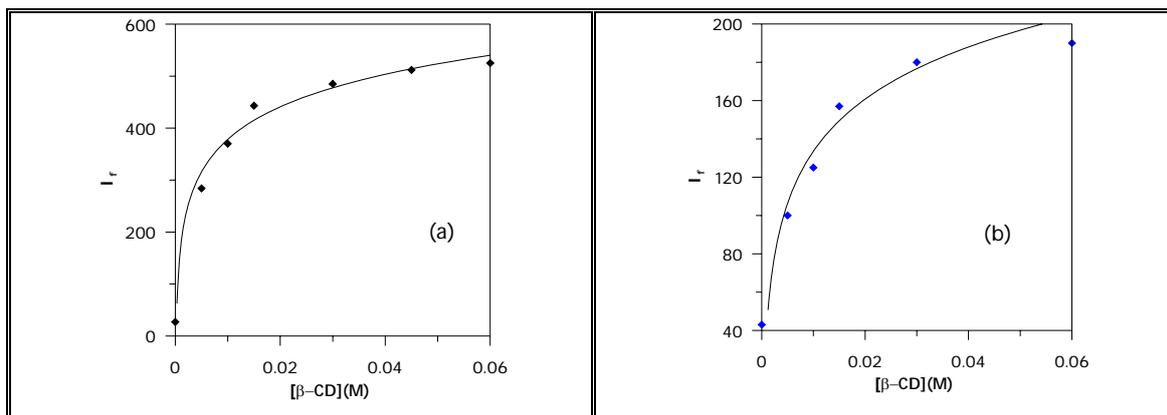


Figura IV.39.- Influencia de la concentración de β -CD/Urea 4M en la señal de fluorescencia de SMTX (a) y SGN (b). La línea continua ha sido calculada usando el análisis de regresión no lineal, asumiendo una estequiometría 1:1 y usando los valores de F_{∞} y K_1 obtenidos por el método de regresión no lineal.

Los valores calculados para las constantes de formación de los complejos, en ausencia de etanol, mediante cada uno de los métodos aplicados, se resumen en la Tabla IV.34

Tabla IV.34.- Constantes de formación obtenidas al aplicar diferentes métodos

	Benesi-Hildebrand		Scatchard		Regresión no lineal	
	K (M ⁻¹)	Log K	K (M ⁻¹)	Log K	K (M ⁻¹)	Log K
SGN: β -CD/Urea 4M	467	2,67	451	2,65	453	2,65
SMTX: β -CD/Urea 4M	448	2,65	435	2,64	446	2,64

A la vista de los resultados resumidos en esta tabla, se concluye que existe una buena concordancia entre los valores de constantes de formación, calculados por los tres métodos.

➤ ESTUDIO MEDIANTE MODELACIÓN MOLECULAR

Se realizó el mismo estudio de modelación molecular que en el caso en ausencia de urea, encontrándose los mismos resultados.

DETERMINACIÓN DE SULFAGUANIDINA EN MIELES Y DETERMINACIÓN EN PRESENCIA DE SULFAMETOXAZOL UTILIZANDO MÉTODOS DE CALIBRACIÓN DE SEGUNDO ORDEN CON ADICIÓN PATRÓN (PARAFAC-IS).

En la Figura IV.40 se muestra el espectro tridimensional de una muestra patrón de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, en las condiciones operatorias establecidas. El barrido de excitación se realizó inicialmente de 220 a 290 nm, con un incremento de 5 nm, y la emisión de 310 a 380 nm, con un incremento de 2 nm.

ANÁLISIS DE LAS MATRICES DE EXCITACIÓN-EMISIÓN FLUORESCENTE. SELECCIÓN DE LOS RANGOS ESPECTRALES

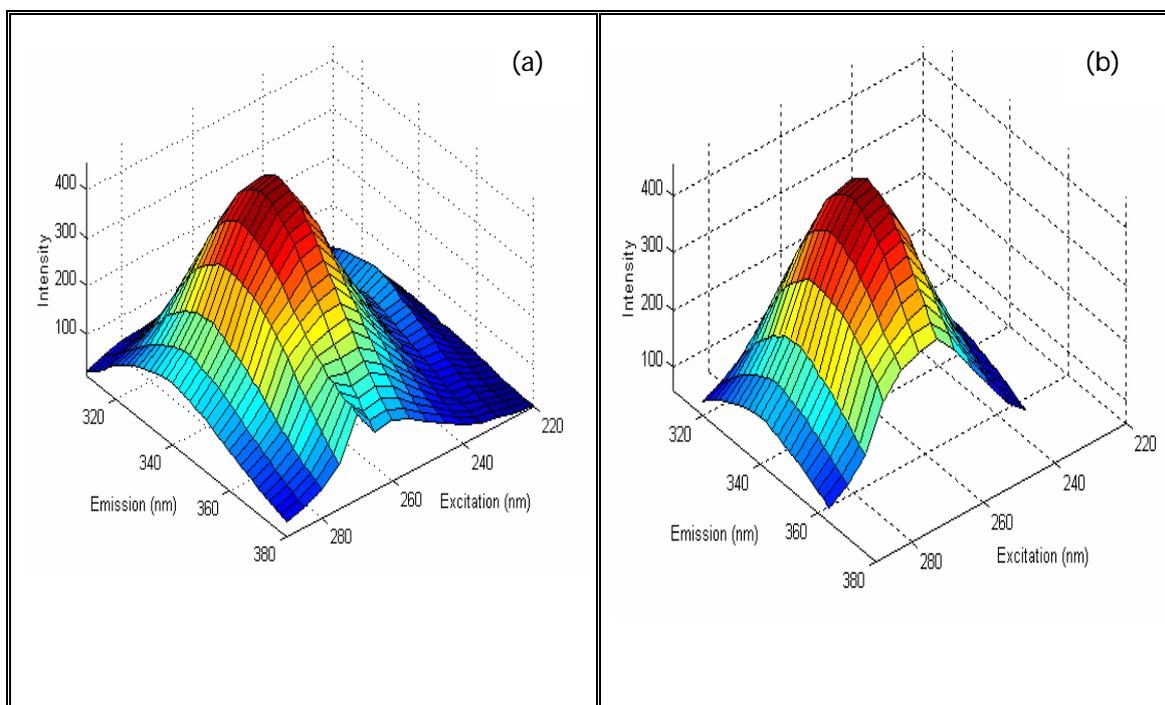


Figura IV.40.- Espectro tridimensional del patrón sulfaguanidina en todo el rango de medida (a), así como en la región seleccionada (b)

Para eliminar señales que no sean producidas por el propio analito, se ha reducido el rango de longitudes de onda de excitación-emisión, para la futura cuantificación de las muestras problema. La región espectral seleccionada para este analito fue de 320 a 364 nm, con un incremento de 2 nm, para el caso de la emisión, y de 235 a 290 nm, con un incremento de 5 nm, para la excitación, ya que así se evitan los efectos de dispersión; dicho espectro se recoge en la Figura IV.40b.

El objetivo de este trabajo es la determinación de este analito en muestras de miel. De ahí que, a continuación, se registró también un espectro tridimensional de una muestra de miel a la que se le ha aplicado una dilución tal que, una vez que sea contaminada con el analito y se realice tal dilución, la concentración de éste se encuentre dentro de nuestro rango de linealidad. Como se observa en la Figura IV.41. la señal producida por el fondo de miel es muy grande, solapando con la señal del analito y complicando la determinación. Debido a esto se decidió aplicar por primera vez en nuestro grupo de investigación la técnica de adición patrón (PARAFAC-IS), para la determinación de sulfguanidina en muestras de miel.

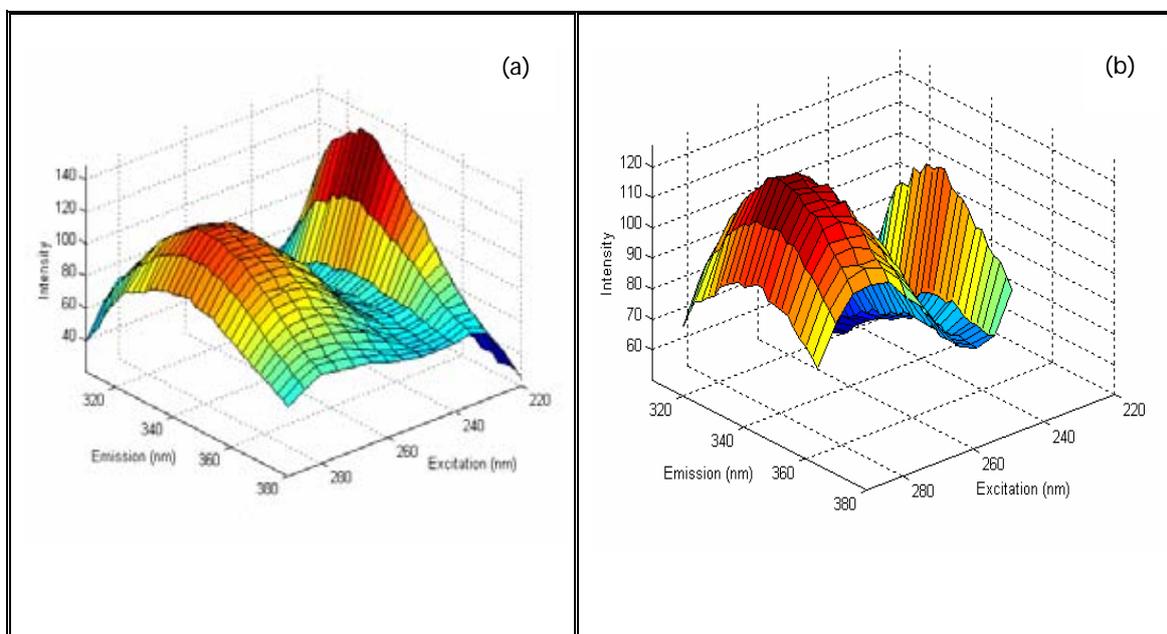


Figura IV.41.- *Espectro tridimensional de una muestra de miel en todo el rango de medida (a), así como en la región seleccionada (b).*

Optimizadas los rangos de trabajo, se pasó a la determinación de dicho analito en miel. Primero se abordará la determinación de sulfaguanidina individualmente, para pasar posteriormente a la determinación de dicha sulfamida en presencia de sulfametoxazol. Se realizaron unas pruebas previas para la determinación utilizando calibración externa (PARAFAC-ES), pero no se encontraron resultados satisfactorios, por lo que se decide trabajar utilizando la técnica de adición patrón (PARAFAC-IS).

➤ **Determinación de sulfaguanidina en muestras de miel**

La sulfaguanidina es uno de los antibióticos utilizados para el tratamiento de colmenas, con el consecuente riesgo de la aparición de residuos de ésta en las muestras de miel, de ahí la importancia de establecer métodos para la identificación y cuantificación de esta sulfamida, en muestras de miel, y realizar los respectivos controles de calidad.

Se estudiaron las posibles diluciones que se podrían aplicar a la miel para que, una vez diluida, la concentración del analito estuviese dentro del rango de linealidad encontrado. Optimizada la dilución, el método operatorio a seguir fue el siguiente:

1°.- En un matraz de 5 mL se pesa 1 g de miel

2°.- Se contamina dicha miel con una disolución concentrada de sulfaguanidina. Se deja en contacto durante 5 minutos para favorecer las interacciones

3°.- Se diluye con agua desionizada hasta 5 mL; se disuelve la miel mediante agitación vigorosa y con ayuda del ultrasonido

4°.- Se toman 0.7 mL de esta disolución y se llevan a un matraz de 3 mL, al que se añaden 0.9 mL de tampón HAc/AcONa 1 M de pH 5.5 , 1.4 mL de disolución 10^{-1} M de β -CD/Urea 4M, se enrasa con agua desionizada y se agita.

5°.- La disolución se transfiere a la cubeta de cuarzo y se le registra el primer espectro tridimensional.

6°.- Se realizan distintas adiciones sobre la disolución contenida en la cubeta , considerando que no hay variación de volumen y de manera que se mantenga el rango de linealidad. Después de cada adición y de agitar, se le registra la matriz tridimensional.

La forma de trabajar con PARAFAC-IS es parecida a como se hace con calibración externa, la variación es que no se construye una matriz de calibrado de la manera usual, sino que se trabaja directamente con muestras problemas, a las que se le realizan distintas adiciones patrón del analito a determinar. En esta modalidad de calibración, se sigue aprovechando la “ventaja de segundo orden”. El procedimiento es un poco más tedioso, porque para cada problema a determinar se deben realizar una serie de adiciones patrón, a las cuales se les debe registrar el espectro tridimensional. En la interfase gráfica (MVC2) los datos se introducen de forma algo diferente a como se hacen al trabajar con PARAFAC-ES, pues se debe introducir un fichero con las distintas adiciones patrón realizadas, así como la concentración añadida en cada caso.

Se realizaron las medidas de diferentes blancos de mieles, obteniendo en todos los casos unos valores de concentración muy cercanos a cero.

A continuación, como ejemplo, se reúnen en la Tabla IV.35 los volúmenes adicionados de sulfaguanidina de concentración $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ al problema 1, así como las concentraciones finales en la cubeta. Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de miel analizadas.

Tabla IV.35.- Valores de volúmenes de sulfaguanidina $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS a una de las muestras de miel.

<i>Muestra</i>	<i>μL añadidos a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g L}^{-1}$ SGN</i>
<i>Problema</i>	----	---
<i>Problema + Adición 1</i>	5.00	40
<i>Problema + Adición 2</i>	10.00	80
<i>Problema + Adición 3</i>	15.00	120
<i>Problema + Adición 4</i>	20.00	160

Selección del número de factores

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza en función del método denominado Core Consistency Diagnostic (Corcondia). Cuando el valor del Core Consistency (Consistencia de núcleo) baja desde un valor alto, por encima aproximadamente del 60%, a un valor bajo, por debajo del 50%, esto indica que se ha llegado al número apropiado de componentes.

Es de esperar que, en nuestro caso, en el que se tiene un analito y la miel, el número óptimo de factores sea igual o superior a dos. Se analizaron, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura IV.42.

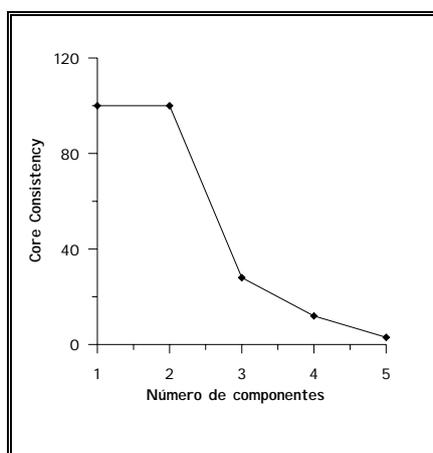


Figura IV.42.- *Representación del core consistency en función del número de factores, para una muestra de miel contaminada con sulfaguanidina*

En la Figura IV.43, se observan los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar una muestra problema tras aplicar PARAFAC. En esta figura se han asignado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo. Los componentes aparecen en orden, en función de su contribución al total de la señal.

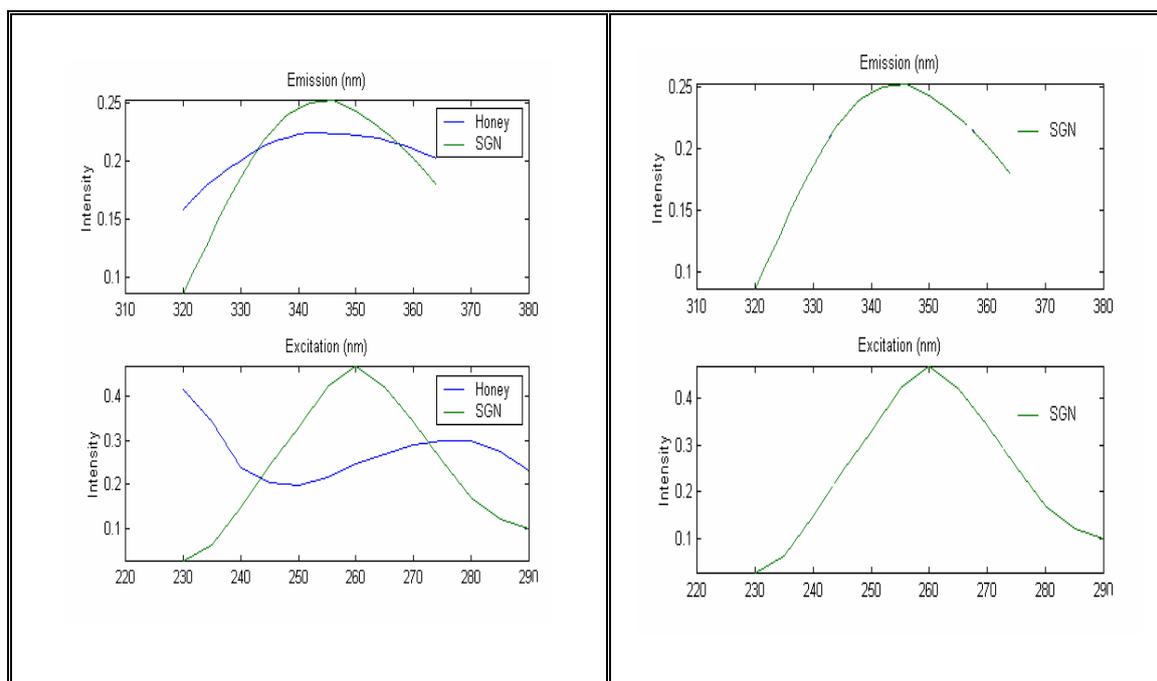


Figura IV.43.- *Perfiles de emisión y excitación de los factores optimizados: espectros de una muestra de miel en presencia de sulfaguanidina y espectros de un patrón de sulfaguanidina*

En este caso concreto, la interferencia de la miel aparece en primer lugar, lo cual indica que es la principal fuente de fluorescencia. A continuación aparece el analito.

Comparando los perfiles dados por PARAFAC, con el espectro del analito puro, se puede asignar que el número uno corresponde a la miel, mientras que el número dos corresponde a la sulfaguanidina.

Se obtienen gráficos de calibración pseudounivariante, Figura IV.44, donde se representan las distintas adiciones realizadas, así como la concentración calculada, cuyo valor se muestra en el espacio de MATLAB, junto con los parámetros estadísticos.

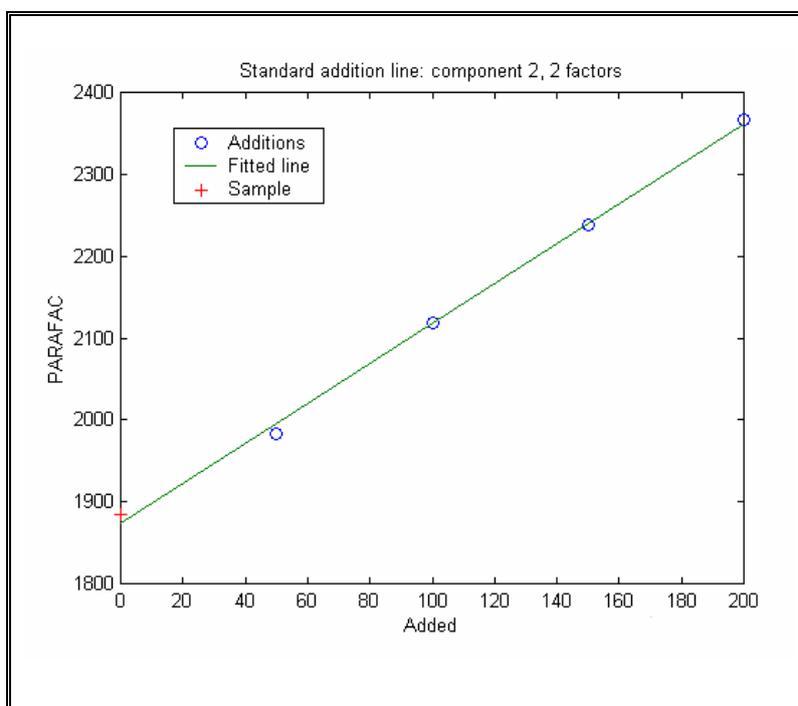


Figura IV.44.- *Gráfico de la calibración pseudounivariante obtenida al aplicar PARAFAC-IS a una muestra de miel contaminada con sulfaguanidina*

En la Tabla IV.36, se resumen los valores de concentración encontrados para las muestras de miel analizadas. Cada valor de concentración analizada se realizó por triplicado. Los resultados estadísticos mostrados en la Tabla IV.36, presentan un valor de REP bastante aceptable. La determinación se realizó en mieles de diversos países.

Tabla IV.36.- Resultados de la determinación de sulfaguanidina en mieles mediante calibración de segundo orden

Muestra	Añadido($\mu\text{g Kg}^{-1}$)	C.Final ($\mu\text{g L}^{-1}$)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g L}^{-1}$)	%R
<i>Miel suiza</i>	899	42	44 ± 2	105
	984	46	43 ± 1	93
<i>Miel canadiense</i>	1091	51	53 ± 3	104
	1151	56	54 ± 3	96
<i>Miel española</i>	941	44	47 ± 4	107
	1048	49	46 ± 3	94
REP(%)			8.7	
RMSEP			0.04	

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva del método empleado, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y predicha. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para el método, se ha comparado con los valores (0,1) teóricos, mediante el denominado test de la elipse (EJCR, Elliptical Joint Confidence Region)[112]. Como se puede observar en la Figura IV.46, la elipse contiene el punto teórico (0,1),

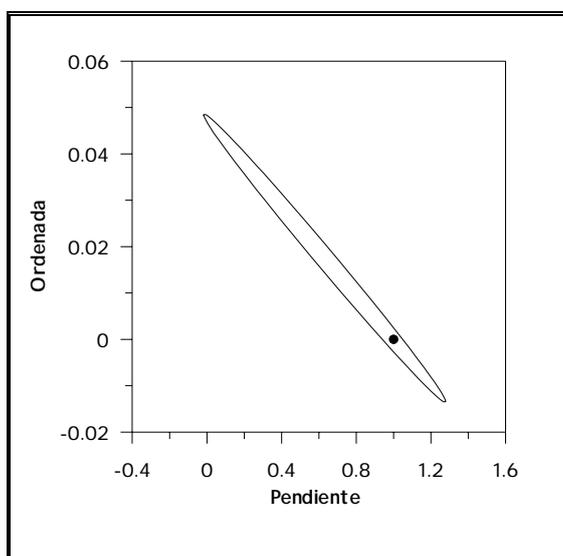


Figura IV.45.- Test de la elipse (EJCR) de la pendiente y la ordenada, correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual. El punto marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$)

➤ **Determinación de sulfaguanidina en muestras de miel en presencia de sulfametoxazol**

Debido a que sulfametoxazol también es usado para el tratamiento de colmenas, con el consecuente riesgo de la presencia de residuos de éste en la miel, se decidió establecer un método para la determinación de sulfaguanidina en presencia de sulfametoxazol.

Al igual que en el caso de la determinación de sulfaguanidina individualmente, se estudiaron las posibles diluciones que podríamos aplicar a la miel para que, una vez diluida, la concentración del analito estuviese dentro del rango de linealidad encontrado. Una vez optimizada la dilución, el método operatorio a seguir fue el siguiente:

- 1°.- En un matraz de 5 mL se pesa 1 g de miel
- 2°.- Se contamina dicha miel con sulfaguanidina y sulfametoxazol. Se deja en contacto durante 5 minutos para favorecer las interacciones
- 3°.- Se diluye con agua desionizada hasta 5 mL disolviendo la miel mediante agitación vigorosa y con ayuda del ultrasonido
- 4°.- Se toman 0.7 mL de esta disolución y se llevan a un matraz de 3 mL, al que se añaden 0.9 mL de tampón AcH/AcONa 1 M de pH 5,5, 1.4 mL de disolución $10 \cdot 10^{-2}$ M β -cd/Urea 4M , se enrasa con agua desionizada y se agita.
- 5°.- La disolución la transferimos a la cubeta de fluorescencia y se le registra el primer espectro tridimensional.
- 6°.- Se realizan distintas adiciones de disolución de sulfaguanidina sobre la disolución contenida en la cubeta, de manera que nos mantengamos dentro del rango de linealidad. Tras cada adición y después de agitar, se le registró la matriz tridimensional.

Como ejemplo, se reúnen en la Tabla IV.37. los volúmenes adicionados de sulfaguanidina de concentración $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ a un problema concreto, que contiene $51 \mu\text{g L}^{-1}$ de sulfaguanidina y $46 \mu\text{g L}^{-1}$ de sulfametoxazol; así como las concentraciones finales en la cubeta . Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de miel analizadas.

En este procedimiento el calibrado se realiza respecto de un analito, considerando el otro como interferencia.

Tabla IV.37.- Valores de volúmenes de sulfaguanidina $24 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS a una de las muestras de miel.

<i>Muestra</i>	<i>μL añadidos a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g L}^{-1}$ SGN /SMTX</i>
<i>Problema</i>	----	-----
<i>Problema + Adición 1</i>	5.00	40 /46
<i>Problema + Adición 2</i>	10.00	80 /46
<i>Problema + Adición 3</i>	15.00	120 /46
<i>Problema + Adición 4</i>	20.00	160 /46

Selección del número de factores

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza de la misma manera que se ha hecho para el analito individualmente. Si se trabajara en el modo de calibración externa, sería de esperar, en este caso, en el que tenemos dos analitos y la miel, que el número óptimo de factores fuese igual o superior a tres. Pero en este procedimiento, en el que se trabaja en el modo de calibración interna, el calibrado se realiza respecto de un analito considerando el otro como interferencia, por tanto es de esperar un número óptimo de factores igual o superior a dos. Se analizaron, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura IV.46.

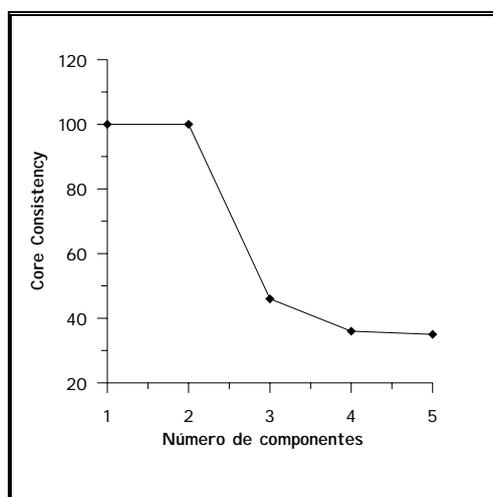


Figura IV.46.- Representación del core consistency en función del número de factores para una muestra de miel contaminada con sulfaguanidina y sulfametoxazol

En la Figura IV.47, se observan los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar una muestra problema por PARAFAC. Los componentes aparecen de acuerdo con el orden asignado por el modelo en función de su contribución al total de la varianza.

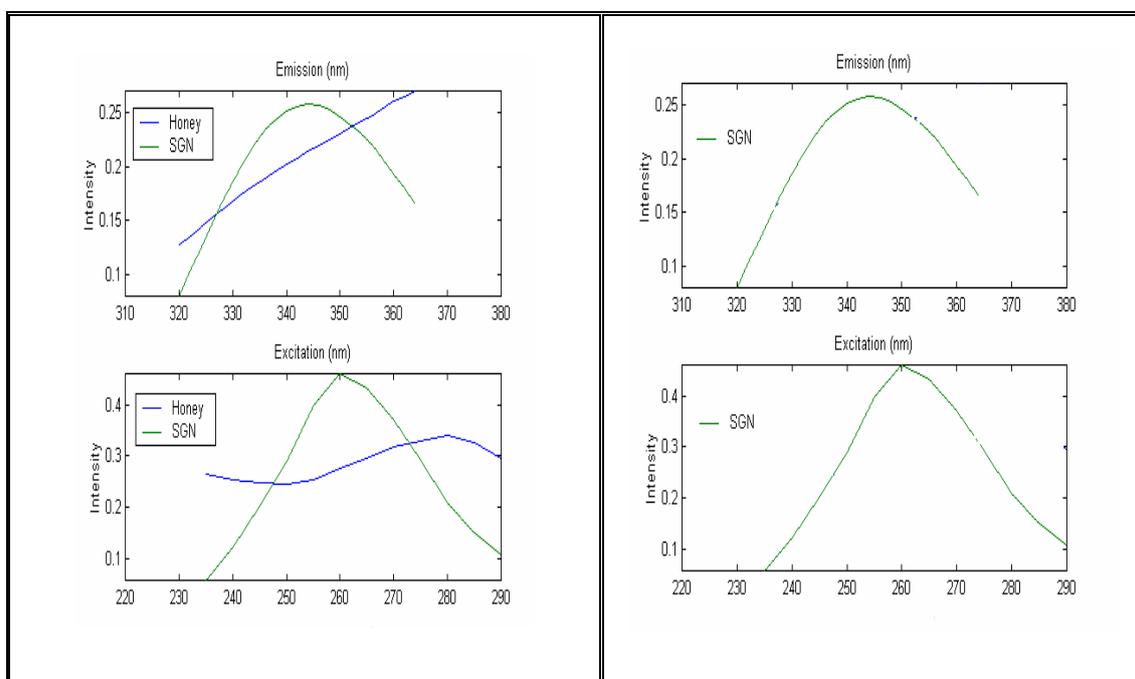


Figura IV.47.- *Perfiles de emisión y excitación de los factores optimizados: espectros de una muestra de miel en presencia de sulfaguanidina y sulfametoxazol y espectros de un patrón de sulfaguanidina*

La interferencia de la miel aparece en primer lugar, apareciendo el analito a continuación.

Comparando los perfiles dados por PARAFAC, con el espectro del analito puro, se puede asignar que el número uno corresponde a la miel, mientras que el número dos corresponde a la sulfaguanidina.

Se obtienen gráficos de calibración pseudounivariante, donde se representan las distintas adiciones realizadas, así como la concentración calculada, cuyo valor se muestra en el espacio de MATLAB, junto con los parámetros estadísticos.

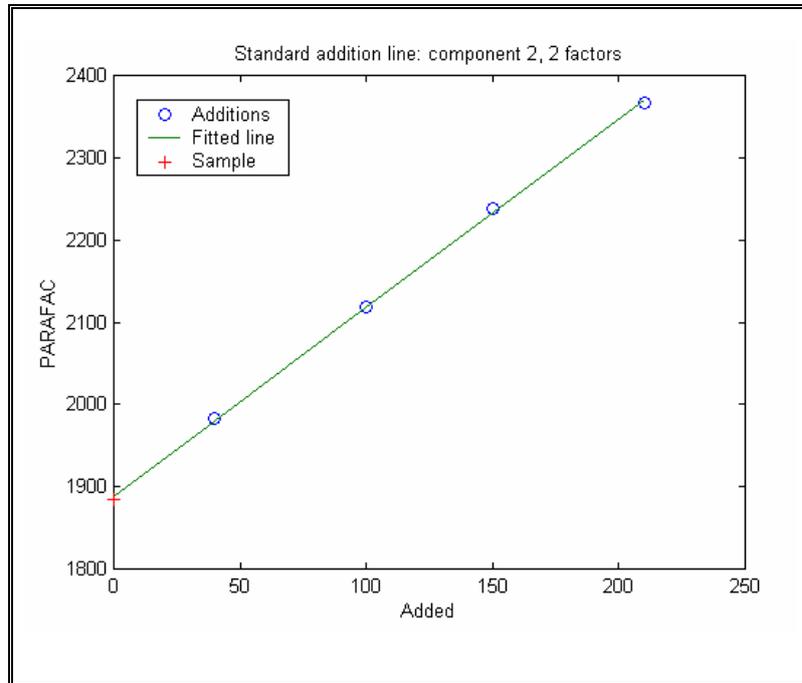


Figura IV.48.- Gráfico de la calibración pseudounivariante obtenida al aplicar PARAFAC-IS a una muestra de miel fortificada con sulfaguanidina y sulfametoxazol

En la Tabla IV.38, se resumen los valores de concentración encontrados para las muestras de miel analizadas por triplicado. El valor de REP obtenido es bastante aceptable.

Muestra	C.Final ($\mu\text{g L}^{-1}$ SGN/SMTX)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g L}^{-1}$ SGN)	%R
<i>Miel belga</i>	42 / 44	44 \pm 3	104
	46 / 49	45 \pm 2	98
<i>Miel suiza</i>	51 / 42	52 \pm 1	102
	54 / 46	53 \pm 2	98
<i>Miel española</i>	44 / 51	46 \pm 2	104
	49 / 54	47 \pm 4	96
REP(%)		6,8	
RMSEP		0,03	

Tabla IV.38.- Resultados de la determinación de sulfaguanidina en presencia de sulfametoxazol en mieles mediante calibración de segundo orden

Se ha realizado el denominado test de la elipse (EJCR, Elliptical Joint Confidence Region), observando en la Figura IV.50 que la elipse contiene el punto teórico (0,1).

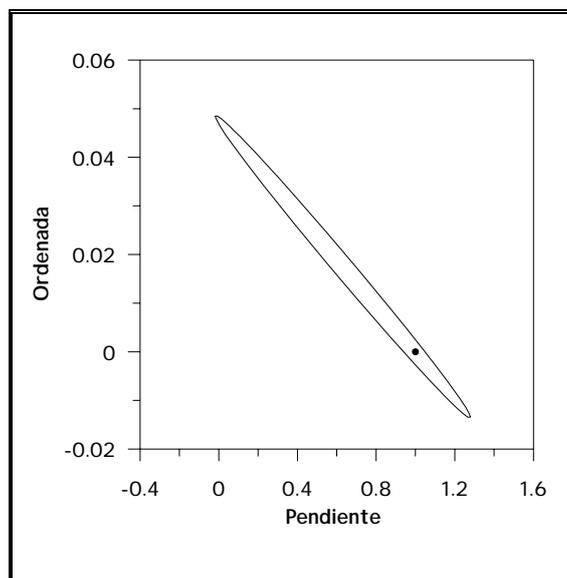


Figura IV.50.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual. El punto marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$)

3.- CONCLUSIONES

En este Capítulo se han desarrollado dos métodos para la determinación de sulfamidas tanto en orina como en mieles. Las sulfamidas estudiadas son sulfametoxazol y sulfaguanidina. Se han realizado los correspondientes estudios de los complejos de inclusión que forman con β -ciclodextrina. Se consigue un aumento de sensibilidad cuando se utiliza dicha ciclodextrina disuelta en Urea 4M. Es necesario la utilización de métodos de calibración multivariante de primer (PLS) y segundo orden (PARAFAC-IS) para la determinación de dichos analitos en las muestras reales. Las recuperaciones obtenidas en todos los casos son satisfactorias.

- 1.- Bender M.L., Komiyama M., *Cyclodextrin Chemistry*; Springer_Verlag: New York (1978)
- 2.- Cramer F., Saenger W., Spatz H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1967 ,89 ,14
- 3.- Saenger W, Inclusion compounds. Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., (eds). Academic Press: London Vol. 2, p. 232 ,1984
- 4.- Szejtli J., "*Cyclodextrin Technology*". Kluwer Academic Publishers, Boston 1988
- 5.- Uekama K., *Int. J. Pharm.*, 1982, 10 , 1
- 6.- Vikmon M., Stadler-Szoke A., Szejtli J., *J. Antibiot.*, 1985, 38, 1822
- 7.- Szejtli J. "*Cyclodextrins and their inclusion complexes*". Akademiai Kiado, Budapest 1982
- 8.- Frank D.W., Gray J.E., Weaver R.N., *Am. J. Pathol.*, 1976, 83, 367
- 9.- Szejtli J., *Pharm. Technol. Int.*, 1991, 3, 15
- 10.- Schlenk W., Sand D.M., *J. Am. Chem. Soc.* , 1961, 83, 2312
- 11.- Harata K., Uedaira H., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1975, 48 , 375.
- 12.- Armstrong D.W., Nome F., Spino L.A., Golden T.D., *J. Am. Chem. Soc.* 1986, 108, 1418
- 13.- Sybilska D., Debowski J., Jurczak J., Zukowski J., *J. Chromatogr.*, 1984, 286, 163
- 14.- Smolkova-Keulemansova E., *J. Chromatogr.*, 1982, 251 , 17
- 15.- Armstrong D.W., *Anal. Chem.*, 1987, 59 , 2594
- 16.- Komiyama M., Hirai H., *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106 , 174
- 17.- French D., *Adv. Carbohydr. Chem.*, 1957, 12 , 189
- 18.- Frömring K.H., Szejtli J., "*Cyclodextrins in pharmacy*". Kluwer Academic Publishers, The Netherlands ,1994
- 19.- Szejtli J., "*Proceedings of the starch convention*", Detmol ,1985
- 20.- Duchêne D., "*Cyclodextrins and their industrial uses*". Editions de Santé. Paris, France ,1987
- 21.- Duchêne D., "*Minutes of the 5th International Symposium on Cyclodextrins*". Editions de Santé. Paris, France , 1990
- 22.- Bottoni G., *Prod. Chim. Aerosol Sel.*, 1984, 25 , 4
- 23.- Frömring K.H., *Pharm. Unserer Zeit.*, 1973, 2 , 109

- 24.- Jones T.S., *Acta Pharm. Technol.*, 1984, 30 , 263
- 25.- Pitha J., Szente L., Szejtli J., “*Molecular encapsulation of drugs by cyclodextrins and congeners*”. En: S D Bruck (ed) *Controlled drug delivery*. Vol 1. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA ,1983
- 26.- Szejtli J., “*Molecular entrapment and release properties of drugs by cyclodextrins*”. En: W.F. Smolen, L.A. Ball (eds). *Controlled drug bioavailability*. Vol 3. Wiley, New York, USA , 1985
- 27.- Atwood J.L., Davies J.E.D., MacNicol D.D., “*Inclusion compounds. Physical properties and applications*”. Vol 3. Academic Press Inc London. United Kingdom 1984
- 28.- Duchêne D., Debrueres B., Vaution C., *S.T.P. Pharma*, 1985, 1 , 37
- 29.- Duchêne D., Vaution C., Glomot F., *Ibid*, 1985, 1, 323
- 30.- Duchêne D., Wouessidjewe D., *Pharm. Technol. Int.*, 1990, 2 , 21
- 31.- Freudenberg K., Cramer F. , Plieninger H., *Ger. Pat.* 1953, 895, 769
- 32.- Tesis Doctoral: “*Nuevos métodos luminiscentes para la determinación de pesticidas en agua*”, Antonia Bautista Sanchez, Badajoz 2001
- 33.- Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Warner I.M., “*Spectroscopic Studies in Organized Media. An Overview*”, en “*Advances in Multidimensional Luminescence*, Vol. 2”, Editores Warner I.M. y McGawn L.B., JAI Press, Inc.: Greenwich, CT, USA (1993)
- 34.- Warner I.M., Muñoz de la Peña A., Smith V., Ndou T., Zung J.B., Nelson G., “*Studies of cyclodextrin complexes in the presence of third components*” . En “*Minutes of 5th International Symposium on Cyclodextrins*”, Editor D. Duchêne, Editions de Santé, París (1990)
- 35.- Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Zung J.B., Warner I.M., *J. Phys. Chem.*, 1991, 95, 3330
- 36.- Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Zung J.B., Greene K.L., Live D.H., Warner I.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 1572
- 37.- Zung J.B., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Warner I.M., *J. Phys. Chem.*, 1991 95 ,6701

- 38.- Muñoz de la Peña A., Anigbogu V., Ndou T.T., Warner I.M., *Anal. Chem.*, 1991, 6, 1018
- 39.- Anigbogu V., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Warner I.M., *J. Chromatogr.*, 1992, 594, 37
- 40.- Will A.Y., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Warner I.M., *Appl. Spectrosc.* 1993, 47, 277
- 41.- Will A.Y., Muñoz de la Peña A., Ndou T.T., Warner I.M., *Ibid*, 1995 ,49 ,520
- 42.- Schuette J.M., Ndou T.T., Muñoz de la Peña A., Greene K.L., Williamson C.K., Warner I.M., *J. Phys. Chem.* 1991, 95 ,4897
- 43.- Schuette J.M., Ndou T.T., Muñoz de la Peña A., Mukundan S. Jr., Warner I.M., *J. Am. Chem. Soc.*, 1993 ,115, 292
- 44.- Smith V.K., Ndou T.T., Muñoz de la Peña A., Warner I.M., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 1991, 10 ,471
- 45.- Husain N., Ndou T.T., Muñoz de la Peña A., Warner I. M., *Appl. Spectrosc.*, 1992 ,46 ,652
- 46.- Muñoz de la Peña A., Salinas F., Gómez M.J., Acedo M.I., Sánchez-Peña M., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 1993, 15, 131
- 47.- Durán-Merás I., Muñoz de la Peña A., Salinas F., Rodríguez Cáceres I., *Analyst*, 1994 , 119, 1215.
- 48.- Muñoz de la Peña A., Salinas F., Durán-Merás I., Moreno M.D., *Anal. Lett.*, 1994, 27 ,1893
- 49.- Aaron J.J., Laassis B., Mahedero M.C, Muñoz de la Peña A., Salinas F., *J. Inclus. Phenom. Mol. Recog. Chem.*, 1994, 18, 69
- 50.- Maafi M., Laassis B., Aaron J.J., Mahedero M.C., Muñoz de la Peña A., Salinas F., *J. Fluorescence*, 1997, 7 ,25S
- 51.- Muñoz de la Peña A., Manzano Durán R. ,1999
- 52.- Durán-Merás I., Muñoz de la Peña A., Salinas F., Rodríguez Cáceres I., *Appl. Spectrosc.*, 1997, 51, 684
- 53.- Mahedero M.C., Muñoz de la Peña A., Bautista-Sánchez A., Aaron J.J., *Luminescence*, 2000, 15, 103

- 54.- Mahedero M. C., Muñoz de la Peña A., Bautista-Sánchez A., Aaron J.J., *J. Inclus. Phenom. And macrocyclic chemistry*. 2002, 42, 61
- 55.- Escandar G.M, Muñoz de la Peña A., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 370, 199
- 56.- Muñoz de la Peña A., Mahedero M.C., Espinosa Mansilla A., Bautista Sánchez A., Reta M., *Talanta*, 1999, 48, 15
- 57.- Escandar G.M., Muñoz de la Peña A., *Appl. Spectrosc.* 2001, 55, 496
- 58.- Muñoz de la Peña A., Mahedero M.C., Bautista-Sánchez A., *Anal. Lett.* 2001, 34, 2391
- 59.- Muñoz de la Peña A., Pérez-Rodríguez M., Escandar G.M., *Talanta*. 2000, 51, 949
- 60.- Durán-Merás I., Muñoz de la Peña A., Salinas López F., Rodríguez Cáceres M.I., *J. Inclus. Phenom. Macrocyclic. Chem.* 2005, 51, 137
- 61.- Min S.H, *J. Pharm. Soc. Korea*, 1971, 15, 8
- 62.- Uekama, K., Hirayama F., Otagiri M., Otagiri Y., Ikeda K., *Chem. Pharm. Bull*, 1978, 26, 1162
- 63.- Uekama, K., Hirayama F., Nasu S., Matsuo N., Irie T., *Chem. Pharm. Bull*, 1978, 26, 3477
- 64.- Abd-El Hamid, Ahmed N., El-Gizawy M., *Analyst*, 1989, 114,571
- 65.-Uekama K., Hirayama F., Koinuma H., *Chem. Lett.* 1977, 12, 1393
- 66.-Chen J.Y, Tsai W.Y, *Kao-hsing I Hsueh K' o Hsueh Tsa Chih*, 1989, 5 , 206
- 67.- Wang M., Ueda H., Nagai T., *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1990, 16, 571
- 68.- Krajnyak J., Racz I., David A., Szejtli J., *Acta Pharm. Hung.* 1984, 54,90
- 69.- Toth K., Apostol I., *Acta Pharm. Hung.* 1986, 56, 133
- 70.- Msagati T.M., Nindi N.M., *Talanta*, 2004, 64,87
- 71.-Heller D.N, Ngoh M.A., Donoghue D., Podhorniak L., Righter H., Thomas M.H., *J. Chromatogr –B: Anal-Technol-Biomed-Life-Sci.* 2002, 774, 39
- 72.- Haller M.Y., Mueller S.R., Mc Ardell C.S., Alder A.C, Suter M.J., *J-Chromatogr, -A*, 2002, 952, 111
- 73.-Numan A., Villemur J.L., Lockett K.K., Danielson N.D., *Microchem J.*, 2002, 72, 147

- 74.- García-Alvarez-Coque M.C., Simo-Alfonso E.F, Ramis-Ramos G., Esteve-Romero J.S, *J. Pharm-Biomed-Anal.* 1995, 13, 237
- 75.-Caballero R.D., Torres-Lapasio J.R., Baeza-Baeza J.J., García-Alvarez-Coque M.C. *J-Liq-Chromatogr-Relat-Technol.* 2001, 24, 117
- 76.- Esteve-Romero J., Carda-Broch-S., Gil-Agusti M., Capella-Peiro M.E., Bose D., *Trends-Anal-Chem.* 2005, 24, 75
- 77.- Nagaraja P., Yathirajan H.S., Sunitha K.R., Vasantha R.A., *J-AOAC-Int.*, 2002, 85, 869
- 78.- Catala-Icardo M., García-Mateo J.V., Fernandez-Lozano M., Martinez Calatayud J., *Anal. Chim. Acta.* 2003, 499, 57
- 79.- Mahedero M.C., Mora Diez N., Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gomez D., Bohoyo Gil D., *Talanta* 2004, 65, 806
- 80.- Kaufmann A., Roth S., Roser B., Widmer M., Guggisberg D., *J-AOAC-Int.* 2002, 85, 853
- 81.-Maudens K.E., Zhang G.F, Lambert W.E. *J-Chromatogr,-A*, 2004, 1047, 85
- 82.-Szymanski A., *Chem-Anal*, 2000, 45, 521
- 83.- Schwaiger I., Schuch R., *Dtsch-Lebensm-Rundsch.* 2000, 96, 93
- 84.- Belliaro F., *J-Apic-Res.*, 1981, 20, 44
- 85.- Okamoto H., Uetake A., Tamaya R., Nakajima T., Sagara K., Ito Y., *J.Chromatogr,-A.* 2000, 888, 299
- 86.-Muñoz de la Peña A., Salinas F., Durán Merás I., Dolores Moreno M., *Anal. Lett.*, 1994, 27, 1893
- 87.- Matsui Y., Mochido K., *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 1979, 52, 2808
- 88.- Buvári A., Szejtli J., Barcza I., *J. Inclusion Phenom.*, 1983, 1, 151
- 89.- Muñoz de la Peña A., Anigbogu V., Ndou T.T, Warner I.M, *Anal. Chem*, 1991, 63, 1018
- 90.- Muñoz de la Peña A., Anigbogu V., Ndou T.T, Warner I.M, *J. Chrom*, 1992, 594, 37
- 91.-Benesi H.A., Hildebrand J.H. *J. Am. Chem. Soc.* 1949, 71, 2703

- 92.- Connors K.A., “*Binding constants. The measurement of molecular complex stability*”, John Wiley & Sons, New York, 1987
- 93.- Scatchard G., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1949, 51, 660
- 94.- SAS/STAT, Release 6.03, SAS Institute Inc., Cary, NC, 1988
- 95.- MVC1: “*MVC1: an integrated Matlab toolbox for first-order multivariate calibration*” (Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems, Volume 73, Issue 2, 28 October 2004, Pages 189-197, Alejandro C. Olivieri, Héctor C. Goicoechea and Fernando A. Iñón)
- 96.- Haaland, D.M., Thomas, E.V., *Anal. Chem.*, 1988, 60, 1202
- 97.- Wiedenhof N., Lammers J.N., *Carbohydr. Res.* 1968, 7, 1
- 98.- Jozquiakowski M.J., Connors K.A. *Carbohydr. Res.* 1985, 143, 51
- 99.- Debowski J., Sybilska D., *J. Chromatogr.*, 1986, 353, 409
- 100.-Cserhati T., Bojarski J., Fenyvesi E., Szejtli J., *J. Chromatogr.*, 1986, 351, 356
- 101.-Tanaka M., Miki T., Shono T., *J. Chromatogr.* 1985, 339, 253
- 102.- Szejtli J., *J. Incl. Phenom.*, 1983, 1, 135
- 103.- Pagington J., *Chem. Brit.*, 1987, 23, 455
- 104.- Harata K., Uekama K., M. Otagiri, Hirayama F., *J. Incl. Phenom.*, 1984, 1, 279
- 105.- Riehl T.E., Malehorn C. L., Hinze W.L., *Analyst*, 1986, 11, 931
- 106.- Armstrong D.W., Jin H.L., *Anal. Chem.* 1987, 59, 2237
- 107.- Kinoshita T., Iimuna F., Tsuji A., *Chem. Pharm. Bull.*, 1974, 22, 2755
- 108.- Windholz M., “The Merck Index”, 9ª edición, Merck&Co., Inc., Rahway:NJ, 1976, p 1266
- 109.- Nakai S., Li-Chan E., “*Hidrophobic Interations in Food Systems*”, Capítulo 1, CRC Press: Boca Raton, Fl, 1988
- 110.- Pharr D.Y., Sheng Fu Z., Smith T.K., Hinze W.L., *Anal. Chem.* 1989, 61, 275
- 111.- Frankewich R.P., Thimmaiah K.N., Hinze W.L., *Anal. Chem.* 1991, 63, 2994
- 112.- González A.G., Herrador M.A., Asuero A.G., *Talanta*, 1999, 52, 727

1.-AGENTES ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES

En farmacología existen dos grupos importantes de agentes antiinflamatorios:

- 1) Los antiinflamatorios esteroides o glucocorticoides, que son los antiinflamatorios más potentes.
- 2) Los analgésicos o antipiréticos, antiinflamatorios no esteroides (AINEs) o fármacos tipo aspirina.

También existen dos grupos importantes y bien diferenciados de analgésicos: Los opiáceos como la morfina, meperidina y fentanilo, y los no opiáceos o AINEs o fármacos tipo aspirina.

Los fármacos analgésicos antipiréticos antiinflamatorios no esteroides (AINEs) son un grupo de agentes con estructuras químicas diferentes, que tienen como efecto primario inhibir la síntesis de las prostaglandinas, a través de la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Estos fármacos comparten acciones farmacológicas y efectos indeseables semejantes. La *aspirina* es el prototipo del grupo y es el fármaco con el cual se comparan los distintos agentes. Debido a esto también son llamados fármacos “tipo aspirina”. Otra denominación común para este grupo de agentes es el de fármacos “anticiclooxigenasa” debido a que inhiben esta enzima, responsable de la síntesis de las prostaglandinas, las cuales son agentes mediadores en la producción de **fiebre, dolor e inflamación**.

Estos fármacos son los agentes más vendidos en el mundo, siendo muy comúnmente utilizados por prescripción o automedicación. Se expenden toneladas por año.

Existe una alta prevalencia de enfermedades reumáticas en el mundo. Aproximadamente un 8% de la población tiene un síndrome reumático alguna vez. Sin embargo, se sabe poco sobre que AINEs son realmente necesarios para un tratamiento óptimo de estas afecciones.

CLASIFICACIÓN

Dentro de los muchos grupos en que se clasifican, nos centraremos en el de los fenamatos o arilntranflicos, por pertenecer los analitos a dicha familia

- Fenamatos o arilntranflicos.- Dentro de este grupo tenemos los tres antiinflamatorios estudiados en este trabajo, que son: ácido mefenámico, ácido flufenámico y ácido meclofenámico. Los fenamatos son inhibidores reversibles y competitivos de la ciclooxigenasa. *In Vitro* pueden inhibir las prostaglandinas formadas. Son más antiinflamatorios que analgésicos y antipiréticos.

MECANISMO DE ACCIÓN

El mecanismo de acción de estos antiinflamatorios es la inhibición de la enzima ciclooxigenasa. Por tanto, inhiben la síntesis de prostaglandinas. El orden de potencia como inhibidores de la síntesis de prostaglandinas *in vitro* refleja su poder antiinflamatorio *in vivo*.

La mayoría de los AINES son inhibidores reversibles y competitivos de la ciclooxigenasa, mientras que el ácido acetil salicílico es un inhibidor irreversible. Acetila la enzima en el sitio activo, por ello es uno de los agentes más útiles como antiagregante plaquetario, ya que inhibe la enzima ciclooxigenasa plaquetaria (COX1) durante toda la vida de la plaqueta (7-11 días) y, como las plaquetas son fragmentos celulares, son incapaces de sintetizar nueva enzima.

Algunos estudios sugieren que existen otros mecanismos de acción, sobre todo para sus acciones antiinflamatorias. De acuerdo a estas teorías se comprobó que algunos AINEs inhiben la enzima lipoxigenasa *in vitro* y, en algunos modelos animales, utilizando diclofenaco e indometacina, éstos dos agentes disminuyen los leucotrienos y prostaglandinas de leucocitos y células sinoviales, por estimular la reincorporación de ácido araquidónico libre en los triglicéridos de las membranas.

Los AINEs interfieren en muchos procesos asociados a la membrana celular, como la activación de fosfolipasa C en los neutrófilos, o la de NADPH oxidasa de los macrófagos. También se piensa que los AINEs pueden inhibir algunos procesos celulares por desacoplar las interacciones proteína-proteína dentro de la bicapa lipídica de la membrana celular, incluyendo los procesos regulados por proteína G.

EFFECTOS FARMACOLÓGICOS

- ✓ Efecto analgésico.- Los AINEs son analgésicos con efectos de leves a moderados. El efecto analgésico parece depender de la inhibición de la síntesis de las prostaglandinas. Las prostaglandinas parecen sensibilizar los receptores del dolor. Además, los AINEs tienen un mecanismo de acción antiinflamatorio que puede contribuir a sus efectos analgésicos. No existen evidencias de que durante el uso crónico de los AINEs se desarrolle dependencia psíquica o física a estos agentes.
- ✓ Efecto antiinflamatorio.- Las prostaglandinas parecen mediar en muchos efectos inflamatorios y producen directamente muchos de los síntomas y signos de la inflamación. Los efectos antiinflamatorios de estos antiinflamatorios pueden deberse, en parte, a la inhibición de la síntesis y liberación de las mismas durante la inflamación. Sin embargo, parecen existir otros mecanismos que contribuyen a este efecto. La patología inflamatoria es atenuada por los AINEs, aunque en los procesos reumáticos no se evitan las lesiones de los tejidos (articulares) ni se detiene el progreso de la enfermedad.
- ✓ Efectos antipiréticos.- La aspirina y los demás AINEs reducen la temperatura elevada, mientras que la temperatura corporal normal sólo se afecta suavemente. La disminución de la temperatura generalmente se relaciona con un incremento en la disipación, causado por la vasodilatación de vasos sanguíneos superficiales y puede acompañarse de sudoración profusa. El mecanismo de acción antipirético es por

inhibición de síntesis de prostaglandinas en el hipotálamo. Casi todas las prostaglandinas con excepción de la 12 son pirogénicas.

- ✓ Efectos antiagregantes plaquetarios.- La aspirina y los demás agentes antiinflamatorios no esteroideos inhiben la agregación plaquetaria y prolongan el tiempo de sangría, debido a una inhibición de la síntesis de tromboxano A₂ en las plaquetas. En general, el agente de elección para este efecto es la aspirina por ser inhibidor irreversible de la ciclooxigenasa, es decir, que acetila la enzima. Esta acción de los AINEs como antiagregantes, muchas veces puede ser un efecto colateral, sobre todo cuando los pacientes deben ser sometidos a cirugía.
- ✓ Efectos a nivel vascular.- Los AINEs inhiben la síntesis de prostaciclina (PGI₂) y de PGE₂ que poseen propiedades vasodilatadoras, pudiendo de este modo disminuir el efecto hipotensor de bloqueadores beta, inhibidores de la enzima de conversión de angiotensina (IECA) y diuréticos, entre otros.

FARMACOCINÉTICA

Existen similitudes y diferencias entre los AINEs, aunque en general estos agentes se absorben completamente por vía oral. Tienen escasa dependencia del metabolismo del primer paso hepático. Se unen con alta afinidad a la albúmina (el de menor unión es el paracetamol) y tienen un volumen de distribución pequeño.

Se ha observado que el naproxeno y el ibuprofeno tienen acciones antiinflamatorias semejantes, dependiendo de la dosis y la concentración plasmática, en la artritis reumatoide. Sin embargo, esto no explica la variación individual en la respuesta a estos y otros agentes.

Con respecto a la vida media de estos agentes, podemos dividirlos en dos grupos de acuerdo a su vida media de eliminación. Los de vida media corta (menos de 6 horas) y los de vida media larga (más de 10 horas) [1].

DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS MEFENÁMICO, MECLOFENÁMICO Y FLUFENÁMICO

Los ácidos **flufenámico** (*N*- (α,α,α - trifluoro-*m*-tolil) ácido antranílico), **mefenámico** (*N*-(2,3-xilil) ácido antranílico) y **meclofenámico** (*N*-(2,6-dicloro-*m*-tolil) ácido antranílico) son derivados del ácido *N*-fenilantranílico. Son ampliamente utilizados como anti-inflamatorios no-esteroides (AINEs) en el tratamiento de artritis reumatoide, osteoartritis y otras discapacidades oseo-musculares. Se ha demostrado que el ácido mefenámico es también efectivo para el cierre de vasos sanguíneos específicos en neonatos prematuros [2]. Los fenamatos aparecen debido a sus propiedades primarias y a su capacidad de inhibir la ciclooxigenasa. A diferencia de otros AINEs, éstos también pueden antagonizar ciertos efectos de las prostaglandinas [3]. Sin embargo, el uso de estos fármacos se ha asociado a algunos casos de nefrotoxicidad, incluyendo fallos renales agudos y nefritis en tumulos intestinales [4].

Los ácidos fenámicos se absorben fácilmente después de su administración oral y se metabolizan en sus dos metabolitos principales y, en menor medida, en sus seis metabolitos menores. Se metabolizan por oxidación del grupo 3'-metil al metabolito farmacológicamente activo 3'-hidroximetil, el cual puede oxidarse después al metabolito inactivo 3'-carboxi. También ocurren, aunque en menor medida, la hidroxilación del anillo y la monodeshalogenación. Se han recomendado varios métodos para la determinación de estos ácidos fenámicos. Entre las técnicas utilizadas tenemos, volumétricas [5,6], polarográficas [7], espectrofotométricas [8,9,10], cromatográficas [11,12], inyección de flujo [13,14,15], electroforesis capilar [16], fluorescencia inducida

fotoquímicamente [17], fluorescencia sensibilizada por lantánidos [18, 19] y utilización de surfactantes [20].

Se ha empleado también la fluorescencia nativa que muestran estos derivados del ácido N-fenilntranílico en disolventes orgánicos, para su detección y determinación [21]. La formación de complejos con aluminio [16, 22, 23] y las reacciones de ciclación utilizando formaldehído o ácido sulfúrico, para dar benzoxazinas o mezclas de acridonas, respectivamente, se han utilizado, asimismo, para la determinación fluorimétrica de ácidos fenámicos [24,25].

Cada vez más, se están utilizando mezclas binarias de estos fármacos en la terapia de una serie de enfermedades [26], por lo que el control simultáneo de AINEs en fluidos biológicos es de gran interés. La aplicación de técnicas luminiscentes para el análisis de mezclas complejas es una opción particularmente atractiva, debido a la alta sensibilidad de estas técnicas. Sin embargo, la espectrofluorimetría convencional presenta limitaciones en el análisis de mezclas complejas, dado que la selectividad se reduce debido al solapamiento espectral, aunque esto se puede mejorar utilizando técnicas luminiscentes sincrónicas [27, 28, 29] y derivadas [30].

En el análisis espectroscópico, la aplicación de técnicas de calibración multivariante para la resolución de mezclas con gran solapamiento espectral es cada vez más usual. Entre los posibles métodos de regresión, mínimos cuadrados parciales (PLS) es el más usado. Este método se aplica principalmente utilizando todo el rango de longitudes de onda (método de espectro total), pero se ha demostrado recientemente, que los resultados pueden mejorarse si se realiza una selección del rango espectral, particularmente para sistemas multicomponentes [31, 32, 33]. Con una adecuada selección del rango de longitudes de onda del espectro total, es posible eliminar aquellas que son irrelevantes para la calibración del modelo [34]. La selección de longitudes de onda hace disminuir la complejidad del modelo, reduciendo la correlación de datos y el

número de muestras necesarias para preparar la matriz de calibración y mejora la capacidad predictiva y del modelo de calibración, con respecto al modelo de espectro total. Recientemente, se ha propuesto la determinación de la correlación global de las longitudes de onda, por un índice de correlación multivariante k [35,36].

En un trabajo reciente [37], se propone un método para la determinación de los ácidos flufenámico, mefenámico y meclofenámico en muestras sintéticas y preparados farmacéuticos, aplicando PLS a las señales de emisión fluorescente, con una previa selección de longitudes de onda realizada con redes neuronales artificiales tipo Kohonen (K-ANN), aunque el método no ha sido propuesto para su determinación en fluidos biológicos.

Una interesante característica de PLS es que se puede efectuar la calibración sin tener en cuenta la concentración de todos los componentes en la muestra, excepto la del analito de interés. Sin embargo, todos los métodos de primer orden, incluyendo PLS, son sensibles a la presencia de interferencias no modeladas. Esta situación se encuentra cuando se analizan muestras naturales de composición compleja, como es el caso de la orina.

Una buena alternativa para resolver el problema de las interferencias no modeladas es utilizar los métodos de segundo orden [38]. Estas técnicas son de interés para los químicos analíticos, porque permiten conocer la contribución fundamental de cada analito individual a la señal medida. Además, tenemos hoy día a nuestro alcance instrumentos que generan fácilmente datos multidimensionales experimentales. Un ejemplo de este tipo de instrumento sería un cromatógrafo de líquidos acoplado con un detector de batería de diodos (diode array) (HPLC-DAD). Un espectrofluorímetro también proporciona este tipo de datos de segundo orden, porque permite la adquisición de datos multivariantes, cuando se registran matrices de excitación-emisión (EEMs).

Recientemente, se han descrito varios métodos de calibración de segundo orden para el análisis de EEMs, con objeto de resolver mezclas de componentes o para determinar algún componente en muestras complejas, incluso en presencia de interferentes no calibrados [39]. Algunos ejemplos son la determinación de 1-naftol, carbaril y carbofurano [40]; naftaleno, 1-naftol y 2-naftol[41]; trifeniltin [42,43]; clorofilas y feopigmentos [44]; verapamil [45]; propanolol, amilorido y dipiridamol [46]; naproxeno, ácido salicílico y ácido salicílico [47]; norfloxacin, enoxacin y ofloxacin [48]; doxorubicin [49]; piroxican [50]; carbendazina, fuberidazol y tiabendazol [51]; ibuprofeno [52]; ciprofloxacino [53]; carbamacepina y 1,10 epoxi-carbamacepina [54] y sulfatiazol [55].

El registro de este tipo de datos conlleva ciertas ventajas: la medida se realiza en un instrumento simple, las señales obtenidas son selectivas y de alta sensibilidad y los modelos obtenidos son trilineales. Sin embargo, existen otros aparatos o métodos que generan datos de segundo orden o mayor como, por ejemplo, un espectrofotómetro acoplado con medidas de pH o medidas cinéticas [56,57] o técnicas como la cromatografía acoplada con detección espectrométrica de masas [58].

Los diferentes métodos multivariantes de segundo orden usados para resolver mezclas multicomponentes pueden dividirse en tres grupos : **(1)** métodos de solución directa, **(2)** iterativos y **(3)** basados en mínimos cuadrados. El primer grupo incluye el método generalizado de reducción de rango (GRAM) [59] y el de descomposición trilineal directo (DTLD) [60]. Ejemplos de métodos iterativos son: Análisis en Factores Paralelos (PARAFAC) [61], Descomposición Trilineal Alternada Autodescompuesta (SWATLD) [62], Resolución Curva Multivariante Acoplada a Mínimos Cuadrados Alternos(MCR-ALS [63] y Mínimos Cuadrados Parciales N-dimensionales (N-PLS) [64]. Mínimos Cuadrados Bilineales (BLLS) es una técnica introducida recientemente que está basada en un procedimiento directo de mínimos cuadrados [65,66]. Los

algoritmos iterativos se utilizan más ampliamente debido a que se consideran menos sensibles al ruido instrumental y a las desviaciones del modelo.

Los métodos PARAFAC y SWATLD son especialmente usados, particularmente cuando los datos siguen un modelo trilinear [65]. Esto se debe al hecho de que la descomposición de los datos de tres vías construidos con las respuestas de la medida de matrices para un número de muestras es, a menudo, única, mostrando los perfiles espectrales y las concentraciones relativas de los componentes individuales de la muestra, de las que se extraen directamente las concentraciones puras. Esta propiedad ha sido denominada la “ventaja de segundo orden” [67] y se encuentra tanto en PARAFAC como en SWATLD. Hay que hacer notar que BLLS, acoplado con un procedimiento aparte, denominado bilinearización residual (RBL), también disfruta de dicha propiedad [68]. De todos los métodos citados hasta ahora, N-PLS es el único que no disfruta de dicha ventaja, porque no es capaz de modelar interferencias que no estén presentes en el conjunto de calibración. Una alternativa a N-PLS consiste en reordenar los datos de segundo orden en vectores, concatenando los espectros de emisión registrados a las diferentes longitudes de onda de excitación y, a continuación, aplicar el método de primer orden. Este procedimiento se conoce como unfolded-PLS, procedimiento principalmente usado antes de la popularización de los verdaderos métodos de segundo orden [65,66]

Como hemos comentado, BLLS se ha introducido recientemente como una técnica quimiométrica de segundo orden. Este método está basado en una filosofía diferente a PARAFAC. El método ha sido aplicado utilizando conjuntos de datos simulados y algunos datos experimentales sencillos, mostrando resultados al menos de la misma calidad que PARAFAC [68]. Sin embargo, BLLS no ha sido hasta ahora aplicado y comprobado en profundidad, frente a muestras reales de alta complejidad, como son las de origen biológico. Se ha encontrado una referencia en la que se utiliza BLLS para la determinación del antibiótico ciprofloxacina en muestras de orina, utilizando datos fluorescentes de segundo orden [69]. En este capítulo se aborda la

determinación de tres antiinflamatorios en muestras de orina mediante la medida de EEMs, utilizando diferentes métodos de segundo orden, entre ellos, BLLS.

Dado que, además de los métodos de segundo orden ya aplicados en capítulos anteriores, introducimos un nuevo método, Mínimos Cuadrados Bilineales (BLLS), a continuación se hará un breve resumen del algoritmo utilizado en BLLS. El resto de métodos utilizados ha sido ya descrito con anterioridad.

BLLS

El método BLLS, introducido por Linder y Sundberg, se describe en detalle en los dos trabajos originales que lo desarrollan [65,66].

A diferencia de PARAFAC, la información referente a la concentración se introduce en el método BLLS durante la etapa de calibración, sin incluir datos de la muestra desconocida, con objeto de obtener aproximaciones a las matrices de los analitos puros a concentración unidad.

En primer lugar, se obtienen la matriz producto de concentraciones \mathbf{D} y las N_{cal} matrices ponderadas respecto a la concentración \mathbf{T}_n , donde N_{cal} es el número de analitos calibrados. Para ello, se emplean los datos de las I matrices de calibración $\mathbf{X}_{i,cal}$ y las concentraciones de los analitos calibrados contenidas en la $I \times N_{cal}$ matriz \mathbf{Y} :

$$\mathbf{T}_n = \sum_{i=1}^I Y_{in} \mathbf{X}_{i,cal} \quad (1)$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \quad (2)$$

Las matrices \mathbf{S}_n que se requieren para el analito n a concentración unidad, se obtienen como:

$$\mathbf{S}_n = \sum_{n'=1}^N (D^{-1})_{nn'} \mathbf{T}_{n'} \quad (3)$$

Las matrices \mathbf{S}_n (JxK) permiten la estimación de los perfiles espectrales de los analitos calibrados. Para ello se han propuesto dos procedimientos: El estimador de perfiles BLLS y el estimador de perfiles basado en la descomposición en los valores singulares (SVD), siendo éste último el recomendado [65,66]. Para ello, se calcula el componente individual SVD, de cada \mathbf{S}_n (SVD₁):

$$(\mathbf{b}_n \mathbf{g}_n \mathbf{c}_n) = \text{SVD}_1(\mathbf{S}_n) \quad (4)$$

donde \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n son los perfiles de emisión (J x 1) y de excitación (K x 1). Los perfiles espectrales obtenidos se juntan en la matriz \mathbf{B}_{cal} y la matriz \mathbf{C}_{cal} , matrices directoras (loadings) de calibración, de manera similar a PARAFAC, excepto que no incluyen posibles componentes adicionales que pueden aparecer en la muestra desconocida.

Si el modelo de calibración es exacto, \mathbf{B}_{cal} y \mathbf{C}_{cal} pueden emplearse para estimar la concentración de los analitos en muestras desconocidas. El procedimiento de predicción emplea un mínimos cuadrados, según la siguiente expresión [65,66]:

$$\mathbf{y}_u = [(\mathbf{B}_{\text{cal}}^T \mathbf{B}_{\text{cal}}) * (\mathbf{C}_{\text{cal}}^T \mathbf{C}_{\text{cal}})]^{-1} \mathbf{G} \text{Diag}(\mathbf{B}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}}) \quad (5)$$

donde \mathbf{y}_u es un vector ($N_{\text{cal}} \times 1$), que contiene las concentraciones predichas de los N_{cal} analitos en la matriz de calibración, * indica la operación producto, \mathbf{X}_u es la matriz de datos desconocidos, G es una matriz diagonal $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ cuyos elementos diagonales son los valores de \mathbf{g}_n de la ecuación (4) y Diag convierte la principal diagonal de la matriz $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ $(\mathbf{B}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}})$ en el vector $N_{\text{cal}} \times 1$.

La existencia de compuestos no modelados en una muestra desconocida, se estudia mediante comparación de los residuos del ajuste por mínimos cuadrados de la predicción (S_p)[65,66], con el nivel de ruido instrumental.

$$s_p = \|\text{vec}(\mathbf{E}_p)\| / (JK - N_c)^{1/2} = \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{S}_{\text{cal}} \mathbf{y}_u\| / (JK - N_c)^{1/2} \quad (6)$$

Dicho nivel de ruido se calcula con facilidad haciendo medidas repetidas del blanco. Si se encuentran componentes no modelados, se realiza un procedimiento iterativo separado que se denomina bilinearización residual (RBL) [65,66] según las siguientes etapas:

(1).- Tomamos $N_{\text{int}} = 1$ como el número de componentes interferentes que contiene la muestra desconocida.

(2).- Se calcula \mathbf{y}_u con la ecuación (6) y la matriz \mathbf{E}_u de los errores residuales de la etapa de predicción con la ecuación (7). La primera vez que se utiliza este procedimiento RBL, se toma, $\mathbf{B} = \mathbf{B}_{\text{cal}}$ y $\mathbf{C} = \mathbf{C}_{\text{cal}}$:

$$\mathbf{y}_u = [(\mathbf{B}^T \mathbf{B})^{-1} * (\mathbf{C}^T \mathbf{C})]^{-1} \mathbf{G} \text{Diag}(\mathbf{B}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}) \quad (7)$$

$$\mathbf{E}_u = | \mathbf{X}_u - \mathbf{B} \mathbf{Y}_u \mathbf{C}^T | \quad (8)$$

donde \mathbf{Y}_u es una matriz diagonal cuyos elementos en la diagonal son los elementos del vector \mathbf{y}_u y el resto de elementos son ceros.

(3).- Se realiza el procedimiento de descomposición en valores singulares (SVD) con los N_{int} componentes de la matriz \mathbf{E}_u , y se obtienen los perfiles de la o las interferencias:

$$\mathbf{B}_{\text{int}} \mathbf{G}_{\text{int}} \mathbf{C}_{\text{int}}^T = \text{SVD}_{N_{\text{int}}}(\mathbf{E}_u) \quad (9)$$

(4).- Se expanden los perfiles para incluir \mathbf{B}_{int} y \mathbf{C}_{int} :

$$\mathbf{B} = [\mathbf{B}_{\text{cal}} \mid \mathbf{B}_{\text{int}}] \quad (10)$$

$$\mathbf{C} = [\mathbf{C}_{\text{cal}} \mid \mathbf{C}_{\text{int}}] \quad (11)$$

(5).- Se vuelve a la etapa 2 y se continua hasta llegar a la convergencia.

(6).- Si los residuales son todavía significativamente mayores que el nivel de ruido, volver a la etapa 1 e incrementar el número de interferentes en una unidad. Nótese que el valor final de N en BLLS vendrá dado por $N_{\text{cal}} + N_{\text{int}}$.

En resumen, la idea principal de BLLS es realizar un procedimiento de calibración-predicción en dos etapas, en el cual la predicción de las concentraciones se realiza mediante mínimos cuadrados. La “ventaja de segundo orden” se utiliza en una etapa posterior, en la cual los residuos de la matriz se bilinearizan para estimar los perfiles de las interferencias. Esta última etapa sirve para expandir los vectores directores (loadings) y para estimar correctamente las concentraciones del analito, aun en presencia de constituyentes no modelados.

Cálculo del número óptimo de factores

El número de factores en BLLS puede estimarse comparando el valor del residuo final s_u con el nivel de ruido instrumental, donde:

$$s_u = \|\text{vec}(\mathbf{E}_u)\| / [JK - (N_c + N_i)]^{1/2}$$

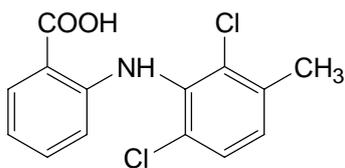
donde \mathbf{E}_u se calcula según la ecuación (8). Si representamos gráficamente el valor de S_u frente al número de componentes, se encuentra un decrecimiento en el valor de S_u , comenzando en un valor S_p , cuando $N_i = 0$, hasta que el valor de S_u se estabiliza con un

valor compatible con el ruido instrumental, permitiendo esto elegir el número correcto de factores.

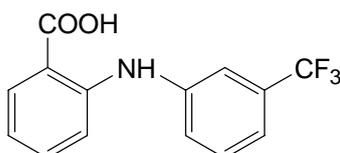
2.-DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE LOS TRES ÁCIDOS FENÁMICOS

ESTUDIOS PRELIMINARES

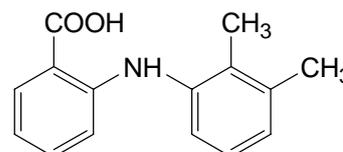
Los tres analitos objeto de estudio, presentan las siguientes estructuras químicas:



ÁCIDO MECLOFENÁMICO



ÁCIDO FLUFENÁMICO



ÁCIDO MEFENÁMICO

Como estudios preliminares se registraron los espectros de excitación y emisión de los tres analitos disueltos en cloroformo. Se elige este disolvente porque, en trabajos anteriores [70, 29, 71], se demuestra que estos analitos son altamente fluorescentes en cloroformo. Dos de los compuestos estudiados se encuentran en forma de ácido, son el flufenámico (FLU) y el mefenámico (MEF), lo que facilita su solubilidad en cloroformo. Sin embargo, el meclofenámico (MEC) se encuentra en forma de sal sódica, lo que imposibilita su solubilidad en cloroformo. Por ello, en primer lugar, se obtuvo la forma ácida a partir del producto en forma de sal. Para ello se pesa 1 g de la

sal, se disuelve en 100 mL de agua (solubilidad 1.5g /100 mL) y se añade el HCl justo para precipitar la forma ácida. Se filtra la disolución, se recoge el sólido, se recrystaliza y se seca en el desecador a vacío durante 4 días. Para comprobar que el producto obtenido corresponde con el ácido meclofenámico, se registró un espectro de IR, un espectro RMN y, por último, se le determinó el punto de fusión, confirmándose la identidad del compuesto.

Una vez que tenemos los tres analitos en forma de ácido, se prepararon soluciones de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ en cloroformo y a partir de éstas, otras de trabajo más diluidas. Tanto a las disoluciones madre como a las diluidas se les hizo un estudio de estabilidad, encontrando que eran estables al menos durante un mes. Para medir la estabilidad se utilizó como señal analítica la intensidad de fluorescencia.

Los espectros de excitación y emisión de los tres analitos se recogen en la Figura V.1, pudiéndose observar que el ácido mefenámico presenta dos máximos de excitación situados en 280 y 353 nm, respectivamente y tan sólo uno de emisión a 463 nm; el flufenámico presenta tres máximos de excitación a 252, 287 y 343 nm, respectivamente, y uno de emisión a 422 nm, mientras que el meclofenámico presenta otros tres máximos de excitación situados a 252, 280 y 334 nm, respectivamente, y uno de emisión a 422 nm.

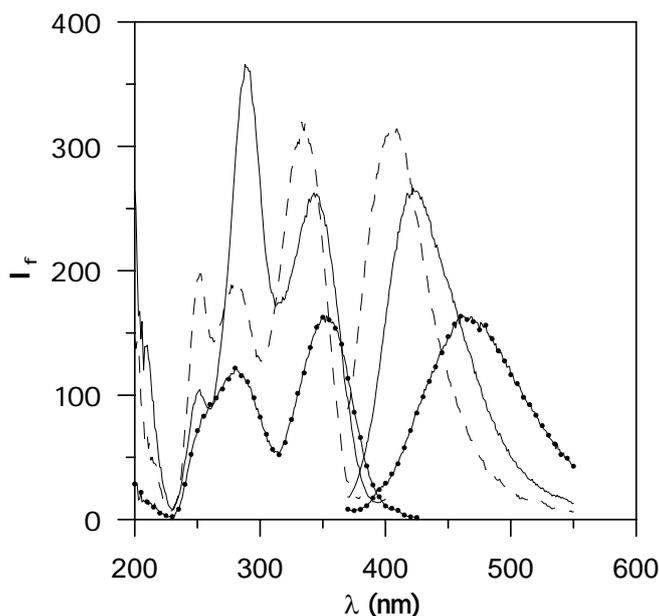


Figura V.1.- Espectros de excitación y emisión para (---●---) MEFENÁMICO ,
(_____) FLUFENÁMICO y (- - - -) MECLOFENÁMICO

Los máximos de excitación y emisión encontrados coinciden, dentro del error experimental, con los que dan otros autores. Así Ruiz y col. [29] encuentran máximos de excitación y emisión para el flufenámico a 286, 348 y 423 nm, para el mefenámico a 290,355 y 463 nm y, para el meclofenámico, a 286, 340 y 403 nm, respectivamente. Capitán y col [71] encuentran máximos de emisión para el flufenámico, mefenámico y meclofenámico de 422, 463 y 405 nm, respectivamente, utilizando como longitud de onda de excitación 352 nm. Por último, los máximos de excitación y emisión encontrados por Schulman y col. [70] son 340, 430 nm para el flufenámico, 365, 460 nm para el mefenámico y 340, 406 nm para el meclofenámico, respectivamente.

Una vez que tenemos determinados los máximos de excitación y emisión, se pasó a estudiar los intervalos de concentración en los que exista linealidad entre la señal de fluorescencia y la concentración de los tres analitos. Para ello se utilizó como señal analítica la intensidad de fluorescencia del espectro de emisión. Se utilizaron como

longitudes de onda de excitación los correspondientes máximos, pero, para el caso del flufenámico, se utilizó también la otra longitud de onda de excitación situada a 343 nm.

ESTUDIO DE LINEALIDAD. RECTAS DE CALIBRADO

En matraces de 5 mL se añadieron concentraciones crecientes de los analitos, enrasándolos con cloroformo. Se registraron los espectros de emisión y se midió la fluorescencia a las longitudes de onda de excitación y emisión adecuadas para cada analitocada. Se observó una linealidad adecuada para el caso del meclofenámico y del flufenámico hasta 0.8 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, mientras que, para el mefenámico, ésta aumenta hasta 3 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. En dichos rangos se establecieron, utilizando muestras por triplicado, las correspondientes rectas de calibrado; en el caso del flufenámico se obtuvieron dos rectas debido a que se utilizaron los dos máximos de excitación. Los parámetros de calidad de dichas rectas se recogen en la siguiente tabla.

Tabla V.1.- Parámetros de calidad de los tres ácidos

	Mefenámico ($\lambda_{\text{ex}}= 353 \text{ nm}$)	Meclofenámico ($\lambda_{\text{ex}} = 334 \text{ nm}$)	Flufenámico ($\lambda_{\text{ex}}= 287 \text{ nm}$)	Flufenámico ($\lambda_{\text{ex}}= 343 \text{ nm}$)
b \pm Sb	84.08 \pm 0.50	267.60 \pm 2.26	694.46 \pm 3.43	467.40 \pm 4.25
a \pm Sa	2.30 \pm 0.82	3.69 \pm 1.07	2.17 \pm 1.67	3.16 \pm 2.01
S_{y/x}	1.19	2.68	2.35	2.91
r²	0.999	0.999	0.999	0.999
Linealidad	99.31	99.15	99.46	99.34
(1-DER (b)) %				
γ^{-1} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.03	0.01	0.006	0.007
LD^a_{w&L} ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.03	0.01	0.007	0.01
LD^b_{Clayton} ($\alpha=\beta=0.05$)($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	0.07	0.03	0.01	0.02

Como nuestro objetivo es utilizar datos de segundo orden, registramos un espectro tridimensional de cada uno de los analitos y de una mezcla ternaria. Los parámetros instrumentales utilizados para registrar los espectros de excitación-emisión tridimensionales fueron los siguientes:

Rango de excitación: 230 – 400 nm, registrando cada 5 nm

Rango de emisión: 360 – 550 nm, registrando cada 3 nm

Dichos espectros tridimensionales se registraron a las muestras que se incluyen en los conjuntos de calibración y validación que se describen a continuación.

CONJUNTO DE CALIBRACIÓN Y CONJUNTO DE VALIDACIÓN

Se ha utilizado un método de diseño denominado “*diseño central compuesto*”. Éste es un paso fundamental para posteriormente obtener una matriz de calibrado con una buena capacidad de resolución. Es importante evitar colinealidades, así como emplear un número suficientemente bajo de patrones y, a la vez, abarcar un amplio intervalo de concentraciones, que incluyan las relaciones que pueden existir entre las concentraciones de los componentes en las muestras de interés.

Para un diseño central compuesto con tres analitos, es necesario utilizar un total de 15 patrones. Gráficamente podemos ver este diseño en el espacio como un cubo, en el que en cada uno de los vértices del cubo tenemos un patrón ($2^3=8$), en cada una de las caras del cubo, proyectadas hacia el exterior, en forma de estrella, tenemos otro patrón ($1 \times 6=6$) y, finalmente, un patrón en el centro del cubo; lo que da lugar a un total de 15 patrones (M1-M15). En la figura siguiente podemos ver de forma gráfica este diseño.

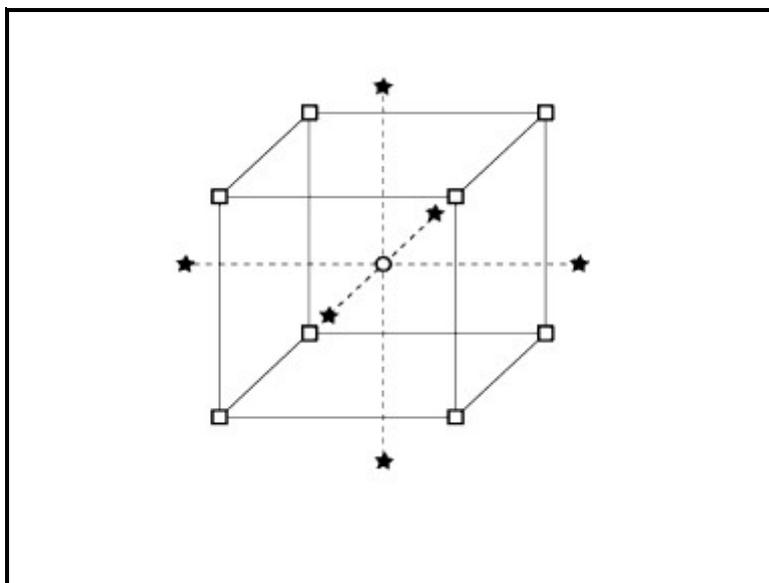


Figura V.2.- *Diseño central compuesto para 3 factores*

El intervalo de concentraciones de cada uno de los analitos, se optimizó de forma que el patrón más concentrado no saturase el detector, en las condiciones instrumentales fijadas. De este modo, las concentraciones de meclofenámico y flufenámico estarían dentro del intervalo de $0 - 0.8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ y las del mefenámico entre $0 - 3.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Tabla V.2.- Composición del conjunto de calibración

Muestra	Mefenámico	Meclofenámico	Flufenámico
	Concentración ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)		
M1	0.634	0.168	0.168
M2	0.634	0.168	0.632
M3	0.634	0.632	0.168
M4	0.634	0.632	0.632
M5	2.40	0.168	0.168
M6	2.40	0.168	0.632
M7	2.40	0.632	0.168
M8	2.40	0.632	0.632
M9	0.00	0.40	0.40
M10	3.00	0.40	0.40
M11	1.50	0.00	0.40
M12	1.50	0.80	0.40
M13	1.50	0.40	0.00
M14	1.50	0.40	0.80
M15	1.50	0.40	0.40

ANÁLISIS DE LAS MATRICES DE EXCITACIÓN-EMISIÓN FLUORESCENTE. SELECCIÓN DE LOS RANGOS ESPECTRALES

En la Figura V.3 se muestra, como ejemplo, el espectro tridimensional y el mapa de contorno correspondiente a las intensidades de excitación-emisión fluorescente para el patrón de calibración M1. El barrido de excitación se realizó inicialmente de 230 hasta 400 nm, con un incremento de 5 nm y la emisión se realizó de 360 a 550 nm, con un incremento de 3 nm.

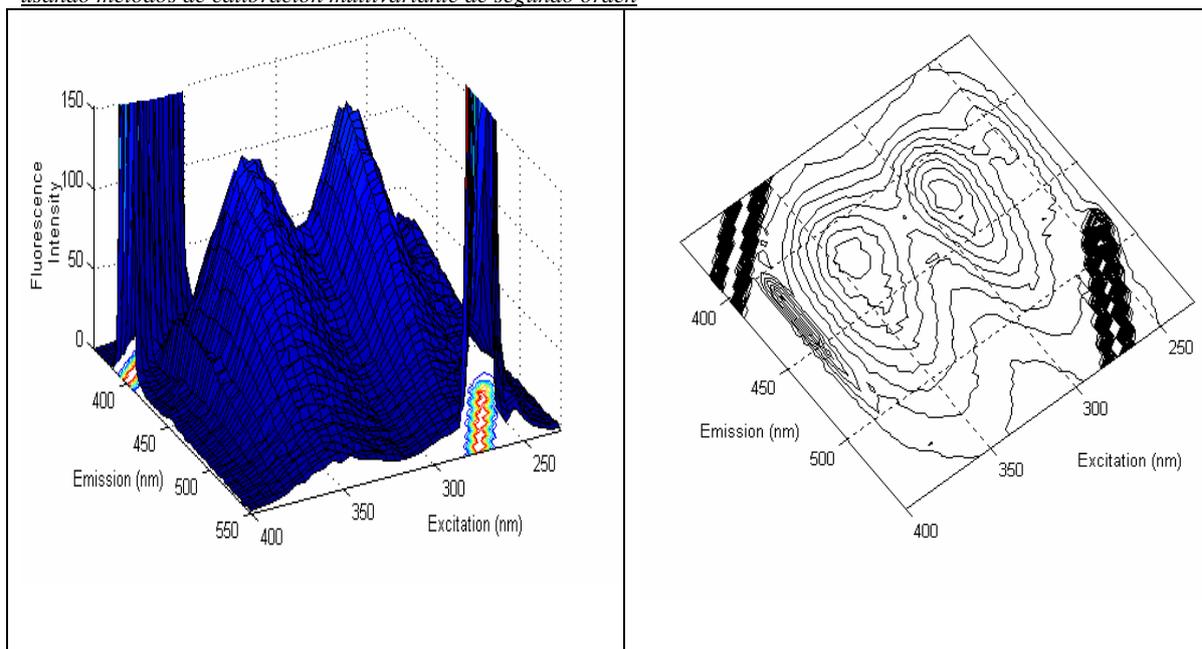


Figura V.3.- Espectro tridimensional y mapa de contorno del primer patrón de calibración M1.

Como se observa en las figuras anteriores, existen señales procedentes de procesos que no están relacionados con la concentración de los analitos, sino que son debidos a procesos de dispersión, efecto Rayleigh y dispersión de segundo orden. Para soslayar este hecho, se ha reducido el rango de longitudes de onda de excitación-emisión, tanto para la calibración como para la cuantificación de las muestras problema. La región espectral seleccionada fue de 381 a 537 nm con un incremento de 3 nm para el caso de la emisión, y de 273 a 370 nm, con un incremento de 5 nm para la excitación; ya que así se evitan los efectos de dispersión de primer y segundo orden. El espectro tridimensional y el correspondiente mapa de contorno para estos nuevos rangos se representan en la Figura V.4.

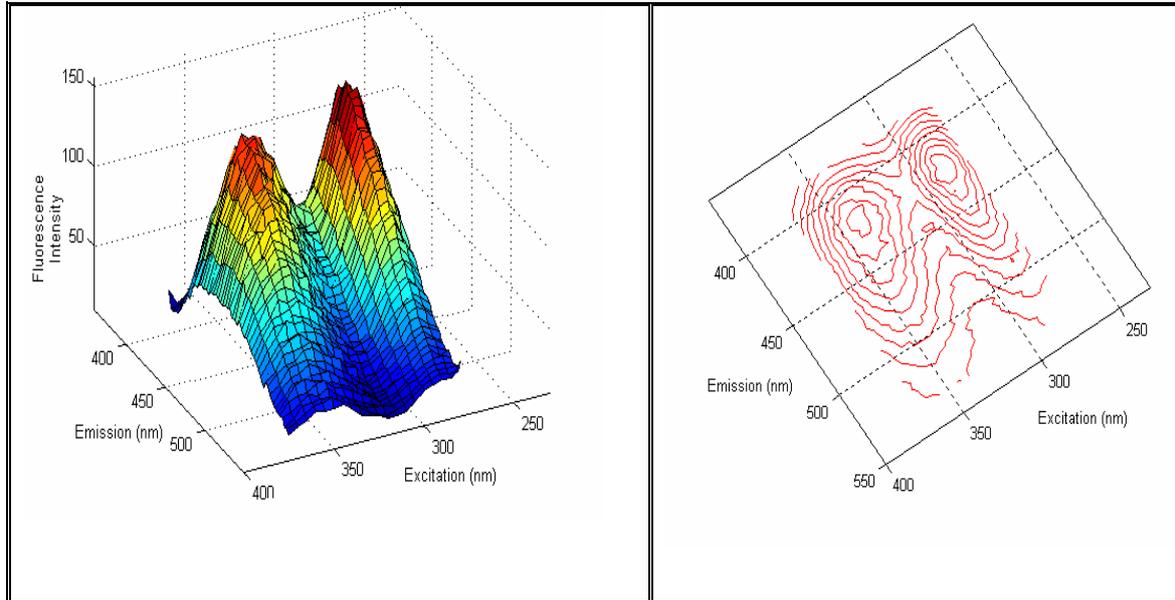


Figura V.4.-Espectro tridimensional y mapa de contorno del primer patrón de calibración M1, en la región seleccionada

CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEANDO UNFOLDED-PLS Y N-PLS

Se ha realizado la correspondiente calibración, utilizando tanto unfolded-PLS como N-PLS, empleando como señales de segundo orden los espectros tridimensionales de excitación-emisión fluorescentes (EEMs).

Los cálculos realizaron con programas informáticos no comerciales en entorno MATLAB 5.3. Las rutinas desarrolladas por Bro para aplicar N-PLS están disponibles en Internet. Se utilizó una interface gráfica similar a la utilizada para métodos que usan datos de primer orden, cedida por sus autores [72,73]. La interface, programa MVC2, permite aplicar los métodos unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS.

Permite asimismo seleccionar las regiones espectrales apropiadas, optimizar el número de factores, y representar los perfiles de excitación y emisión, así como las gráficas de calibración pseudovariante.

Para la determinación del número óptimo de factores, se empleó el método de validación cruzada y el criterio de Haaland y Thomas [74]. De acuerdo a este criterio, se calculó un número óptimo de factores de 3, para cada uno de los analitos, tanto con el método unfolded-PLS como con N-PLS, como puede observarse en la Figura V.5.

Los parámetros de la calibración aparecen en la Tabla V.3.

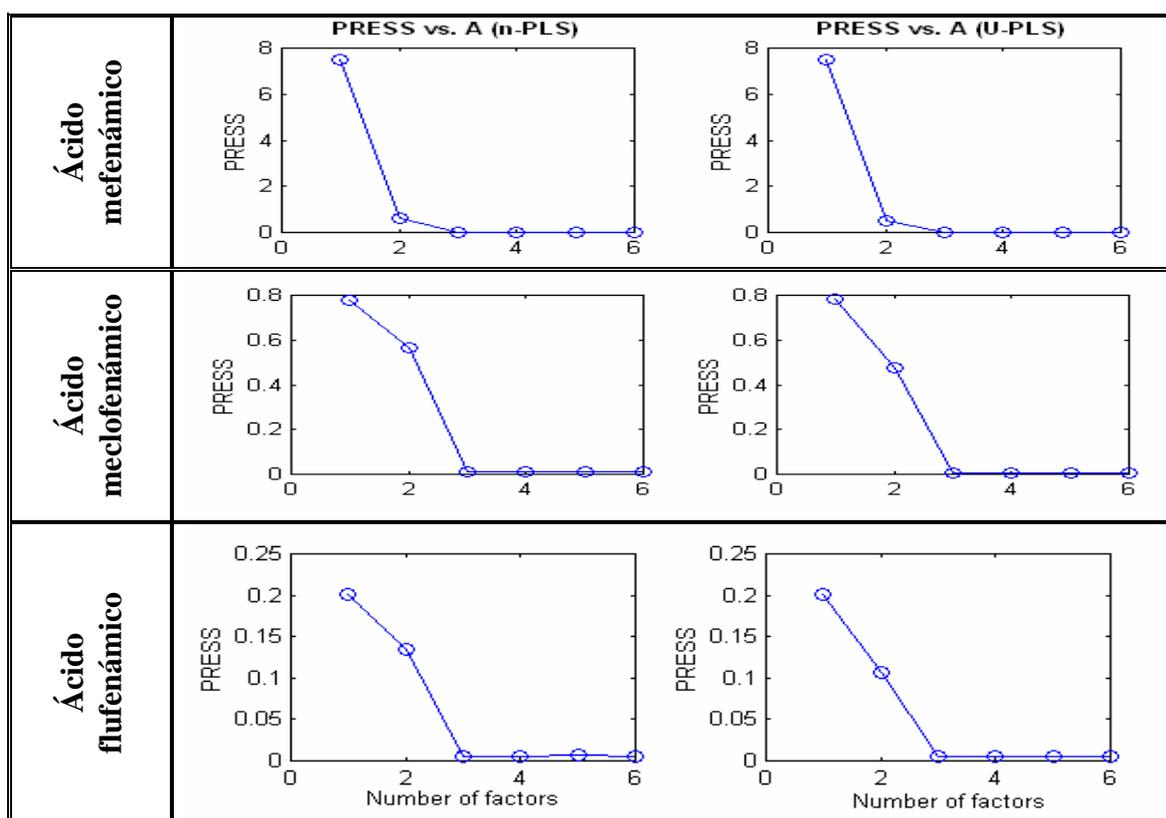


Figura V.5.- Representación del valor del PRESS frente al número de factores

Tabla V.3.- *Parámetros de la calibración con unfolded-PLS y con N-PLS*

Analito	Factores^a	PRESS	(R²)
<i>Mefenámico</i>	3/3	0.018/0.017	0.9999/0.9999
<i>Meclofenámico</i>	3/3	0.011/0.010	0.9995/0.9993
<i>Flufenámico</i>	3/3	0.005/0.005	0.9998/0.9998

^a UPLS /NPLS

CALIBRACIÓN MULTIVARIANTE EMPLEANDO PARAFAC, SWATLD y BLLS

Para su aplicación se utilizó la interface gráfica ya mencionada [72,73]. El empleo de la metodología PARAFAC y SWATLD supone una calibración para cada problema que se pretende analizar. Es decir, en esta metodología no existe la etapa previa de calibrado con patrones, sino que todo ello se realiza cada vez que se pretende aplicar el método. De este modo, el conjunto de calibrado no sólo está formado por un conjunto de patrones, 15 en nuestro caso, sino que, además, se suma cada una de las muestras problemas. De este modo tendremos un total de 16 matrices EEM para aplicar esta metodología.

La inclusión de la muestra problema en el calibrado es una de las ventajas que presentan este tipo de calibrados ya que, de este modo, podremos tener en cuenta la presencia de interferentes que supone la matriz en la que se encuentra el analito de interés en la etapa de calibración, lo cual, en principio, mejora las predicciones.

VALIDACIÓN DE MÉTODOS

Para la validación de los métodos quimiométricos empleados, se preparó un conjunto de muestras de predicción, un total de 10 muestras, por duplicado, formadas por mezclas ternarias y binarias (V1-V10), construidas con concentraciones de los

analitos, diferentes de las empleadas para las muestras del conjunto de calibración, pero dentro de los mismos intervalos de concentraciones. En estas muestras que constituyen el conjunto de validación, no se añade ningún tipo de interferentes, y se preparan de forma tal que estén en las condiciones menos favorables, es decir, que sus concentraciones estén tanto en los extremos de más bajas como de más altas concentraciones.

Tabla V.4.- Composición del conjunto de validación

Muestra	Mefenámico	Meclofenámico	Flufenámico
	Concentración ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
V1	1.95	0.60	0.60
V2	1.95	0.52	0.72
V3	0.00	0.36	0.52
V4	1.05	0.60	0.36
V5	1.05	0.20	0.52
V6	1.05	0.00	0.20
V7	0.45	0.72	0.36
V8	0.45	0.36	0.00
V9	2.55	0.20	0.36
V10	2.85	0.72	0.20

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza en función del método denominado Core Consistency Diagnostic [75] (Corcondia). Cuando el valor del Core Consistency (Consistencia de núcleo) baja desde un valor alto, aproximadamente el 100%, hasta un valor por debajo del 50% , esto indica que se ha llegado al número apropiado de componentes.

Es de esperar, en nuestro caso, en el que tenemos un total de tres componentes, en muestras preparadas en ausencia de interferentes, que el número óptimo de factores sea igual o superior a tres. Se analizaron, una a una, todas las muestras del conjunto de validación, encontrando un número óptimo de factores de 3, como puede observarse en la Figura V.6.

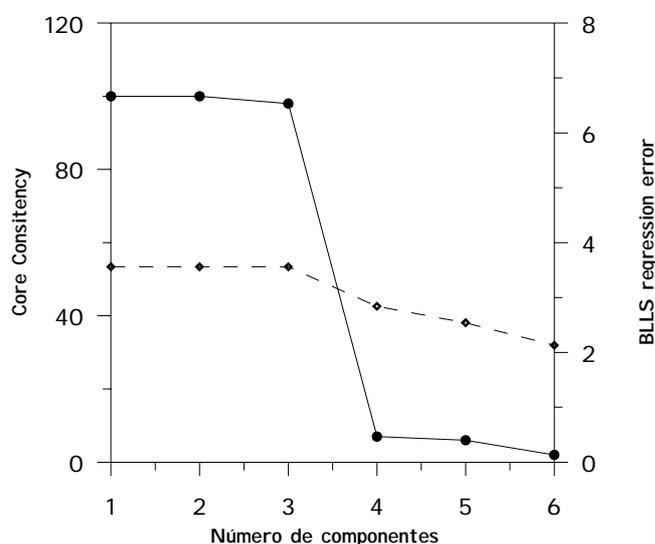


Figura V.6.- Representación del core consistency (—) y del BLLS error (---) en función del número de factores para una muestra de MEF, MEC Y FLU (Muestra V10)

Además de utilizar el criterio descrito anteriormente, también podemos seleccionar el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión de la pseudo-regresión univariante, que se obtiene al representar la concentración de cada analito en las muestras del conjunto de calibración, en función de la concentración predicha por el modelo en función del número de factores [48]. Este método debe aplicarse para cada una de las muestras. Como se puede ver en la Figura

V.7, para el caso de la muestra V10, el error de regresión para los tres analitos permanece constante cuando el número de factores es superior a tres, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

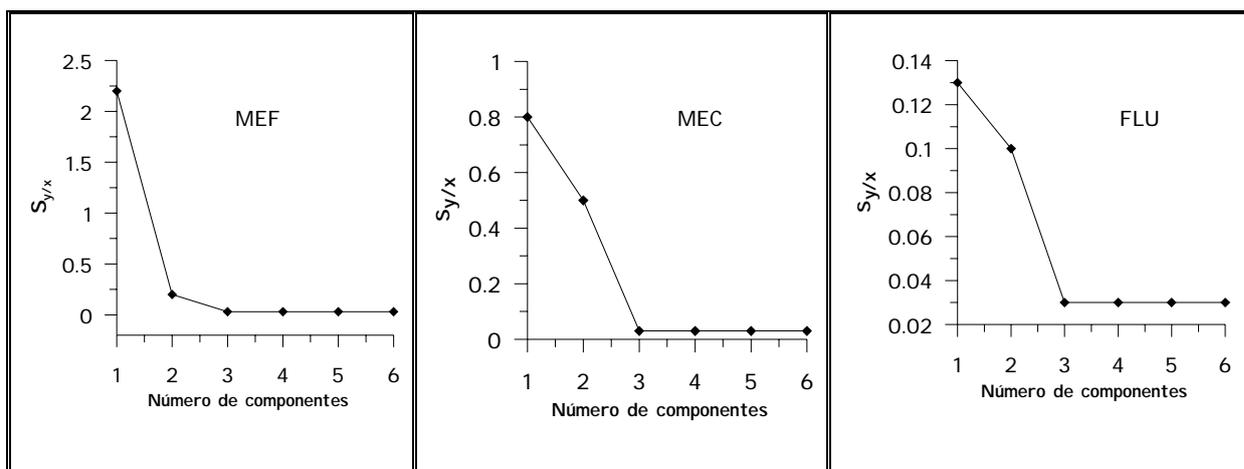


Figura V.7.- Representación del error de regresión de la pseudo regresión univariante para mefenámico, meclofenámico y flufenámico para la muestra de validación V10

En el caso de SWATLD, aunque es insensible al exceso de factores también se estableció como óptimo un total de 3 factores. Se observa como, a diferencia de PARAFAC, la velocidad de cálculo en esta metodología es bastante superior.

El número óptimo de factores en el caso de BLLS se realiza en función del análisis del residuo de predicción obtenido en la regresión por BLLS, es decir, el valor de dicho residuo se compara con el nivel de ruido instrumental, obteniendo el número correcto de factores cuando el valor del residuo sea comparable con el del ruido instrumental. Los valores de dicho parámetro, junto con las concentraciones se muestran en la pantalla de MATLAB. A diferencia de en PARAFAC, la información sobre la concentración se introduce en un paso en el que no se incluyen los datos de la muestra

desconocida, obteniéndose aproximaciones a las matrices de los analitos puros y a concentración unidad.

Después de hacer este análisis, se elige un número de factores óptimo igual 3, ya que al utilizar un componente más de los utilizados en la calibración no se produce un cambio significativo en el valor de dicho error, permaneciendo prácticamente constante a partir de 3 componentes, como se puede comprobar en la Figura V.6.

Los perfiles obtenidos para cada uno de los algoritmos aplicando un número de factores igual a 3, se recogen en la Figura V.8.

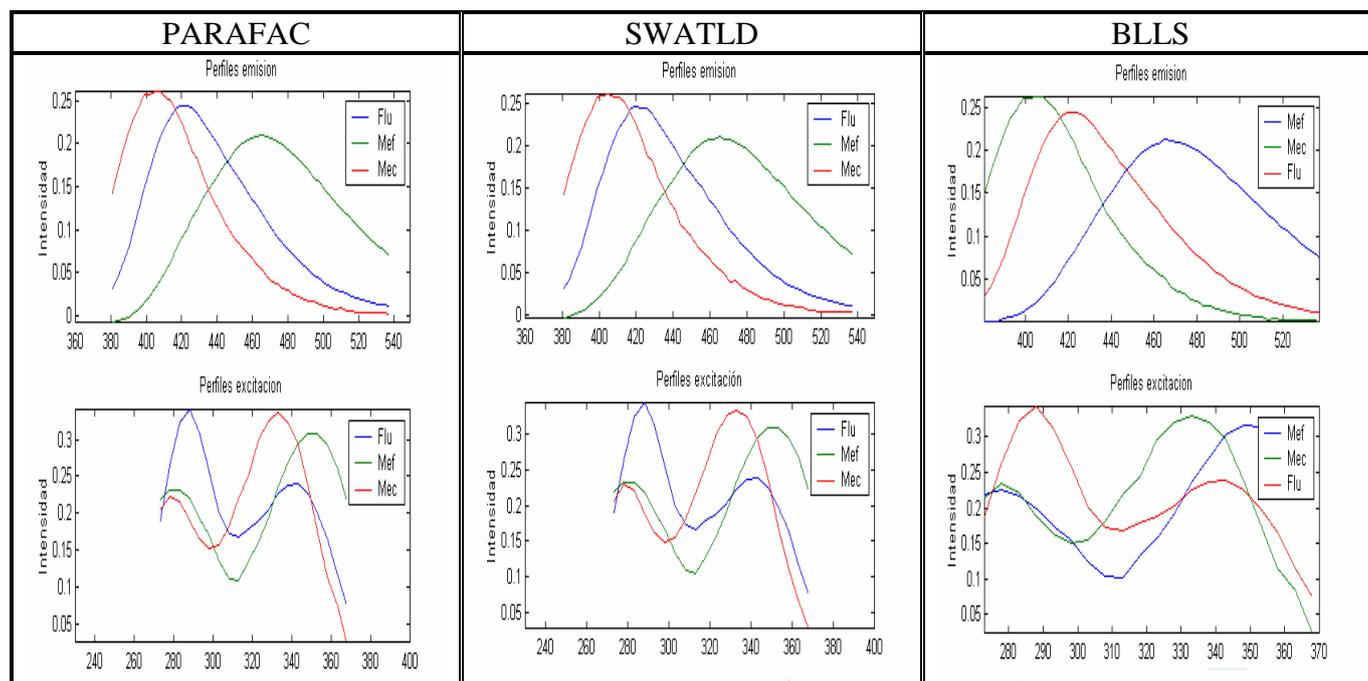


Figura V.8.- Perfiles obtenidos para una de las muestras de validación, al aplicar los diferentes algoritmos para un número óptimo de factores igual a 3

Las predicciones de estas muestras de validación aparecen en la tabla V.5.

Tabla V.5.- *Parámetros estadísticos de la aplicación de diferentes metodologías multivariantes al análisis del conjunto de validación, compuesto por 10 muestras (tabla V.4), analizadas por duplicado (n=20)*

^a %R.- % de Recuperación

	% R ^a media (n=20)			REP			RMSEP		
	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU
<i>UPLS</i>	106	105	96	9.4	8.7	9.7	0.04	0.06	0.04
<i>NPLS</i>	106	106	99	9.7	9.1	8.5	0.04	0.05	0.05
<i>PARAFAC</i>	105	105	102	8.4	8.4	8.7	0.03	0.04	0.04
<i>SWATLD</i>	104	104	102	8.2	8.5	8.2	0.03	0.04	0.04
<i>BLLS</i>	105	105	101	8.1	8.7	8.6	0.04	0.04	0.03

Del análisis de la tabla podemos concluir que, tanto las recuperaciones medias como los valores de REP, son muy similares con todos los métodos, no pudiéndose establecer un comportamiento diferencial apreciable, en estas muestras sintéticas que no contienen orina. Los resultados son satisfactorios, con valores de recuperación media comprendidos entre 96 y 106%.

DETERMINACIÓN SIMULTÁNEA DE MEFENÁMICO, MECLOFENÁMICO Y FLUFENÁMICO EN MUESTRAS DE ORINA

El objetivo final del trabajo será la determinación de estos tres antiinflamatorios en fluidos biológicos, en los que se encontrarán en forma acuosa. Así, nuestro primer paso a seguir será la preparación de muestras acuosas de los analitos en estudio y, a continuación, la extracción de éstas en cloroformo, ya que la matriz está construida con muestras disueltas en cloroformo.

- **Optimización de la extracción de los analitos en cloroformo**

Para preparar las disoluciones acuosas a partir de los ácidos, será preciso trabajar en medio básico, ya que los analitos son menos solubles en medio neutro o ácido. Para ello, usamos NaOH 0.2M consiguiendo así un pH próximo a 10.4. En estas condiciones disolvemos los analitos, obteniendo las correspondientes disoluciones de trabajo.

En primer lugar, comenzamos a optimizar la extracción, en cloroformo, de cada analito por separado. Estudiamos tanto la influencia del tiempo de agitación como el pH de extracción. En matraces de 10 mL se prepararon disoluciones patrones de los tres analitos en cloroformo. Del mismo modo se prepararon disoluciones de los analitos en medio acuoso. El pH final de la disolución debe ser ácido, para obtener la forma ácida y así poder extraerlos en cloroformo, por lo que iremos modificando cuidadosamente el pH adicionando HCl 0.1 M, observando que los analitos no precipiten en la disolución de trabajo. Esta disolución acuosa se trasvasa a un embudo de decantación, al que se añaden 10 mL de cloroformo; la mezcla se agita vigorosamente y después de dejar que las fases se separasen correctamente se pasa a la recogida de la fase orgánica, la cual se filtra a través de un embudo que contiene sulfato sódico sólido. A esta disolución final se le registra el espectro tridimensional y de emisión bidimensional ($\lambda_{ex} = 353 \text{ nm}$). Estos espectros bidimensionales se comparan con los correspondientes espectros, registrados a los diferentes patrones de los analitos, en cloroformo. Después de varias experiencias donde se probaron distintos tiempos de agitación y distintos valores de pH, siempre ácidos, se optimizaron como mejores parámetros: un tiempo óptimo de agitación de 10 minutos y un pH óptimo de 3.5, para los tres analitos por separado. Los espectros de emisión de patrones y muestras en estas condiciones se recogen en la Figura V.9.

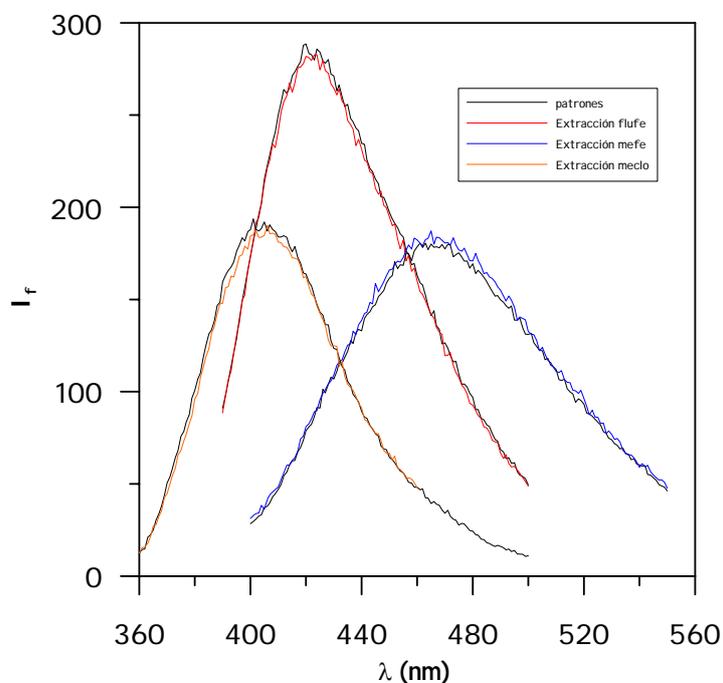


Figura V.9.-Espectros de emisión de las extracciones de muestras acuosas de los analitos y de los correspondientes patrones en cloroformo ($\lambda_{ex} = 353 \text{ nm}$)

De los espectros de emisión registrados, se deduce que, en las condiciones experimentales óptimas seleccionadas, los analitos se extraen cuantitativamente. Una vez optimizadas las variables para cada uno de los analitos por separado, se ensaya con mezclas ternarias. Seleccionamos en principio el mismo valor de pH y el tiempo de agitación de 10 minutos. Preparamos 10 problemas diferentes con distintas concentraciones de los analitos tal y como se recoge en la Tabla V.6.

Tabla V.6.- Composición de las mezclas ternarias problemas

Muestra	Mefenámico	Meclofenámico	Flufenámico
	Concentración ($\mu\text{g. mL}^{-1}$)		
P1	2.80	0.72	0.60
P2	2.00	0.60	0.52
P3	0.48	0.52	0.72
P4	1.50	0.72	0.20
P5	1.04	0.20	0.40
P6	2.52	0.20	0.40
P7	0.78	0.52	0.20
P8	2.00	0.60	0.72
P9	1.04	0.4	0.52
P10	0.48	0.4	0.60

Estas muestras problemas se analizaron de nuevo por cada uno de los métodos aplicados, siguiendo la misma metodología que para las muestras de validación y utilizando el mismo conjunto de calibración empleado anteriormente (Tabla V.2), encontrando en este caso un número de factores igual a 3, coincidiendo con los obtenidos anteriormente.

En todos los casos se encontraron resultados satisfactorios cuando analizamos los resultados con los distintos métodos de segundo orden. Los parámetros estadísticos de la aplicación de diferentes metodologías multivariantes a las muestras binarias y ternarias sintéticas se resumen en la Tabla V.7.

Tabla V.7.-Parámetros estadísticos de la aplicación de PLS, unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC , SWATLD y BLLS, al análisis de las extracciones de muestras binarias y

	% R media (n=10)			REP			RMSEP		
	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU
<i>UPLS</i>	107	98	90	10.6	10.9	10.9	0.07	0.06	0.06
<i>NPLS</i>	107	98	91	10.8	10.7	11.1	0.06	0.05	0.06
<i>PARAFAC</i>	106	99	92	10.7	10.9	10.4	0.07	0.06	0.05
<i>SWATLD</i>	105	98	93	10.1	10.8	10.7	0.06	0.06	0.06
<i>BLLS</i>	106	99	91	10.5	10.9	10.8	0.05	0.05	0.06

ternarias sintéticas

Del análisis de la tabla podemos concluir que, tanto las recuperaciones medias como los valores de REP son muy similares con todos los métodos, no pudiéndose establecer un comportamiento diferencial apreciable. En estas extracciones de muestras sintéticas que no contienen orina, observamos que los valores de los REP son algo mayores que los obtenidos para las muestras de validación, debido a que introducimos una nueva etapa, como es la extracción de las muestras acuosas en cloroformo.

Después de comprobar que la extracción de la mezclas sintéticas es cuantitativa, se pasó a ensayar el método con muestras conteniendo orina.

En primer lugar, se hizo una búsqueda para obtener información acerca de la dosis y excreción de estos analitos en orina, encontrándose que dichos analitos suelen pautarse para administración oral y cuya dosis media es 500 mg tres veces al día para mefenámico, entre 200-400 mg/día para meclonámico y entre 300-600 mg/día para flufenámico.

Sufren una absorción rápida y completa, excretándose sobre todo en la orina (70% para meclofenámico y mefenámico y 40% para flufenámico), con unas concentraciones máximas que se obtienen entre las 2 y 4 horas. Teniendo en cuenta

estos datos, así como los rangos de linealidad encontrados para cada uno de los analitos, seguidamente se pasó a probar distintas diluciones de la orina.

En primer lugar, se estudió que dilución máxima podemos aplicar a las muestras de orina fortificadas con los analitos, para que las concentraciones de la matriz de calibrado estuviesen dentro de los intervalos en los límites biológicos.

Para ello, se prepara una disolución de orina, que se contamina con los analitos de interés en la cantidad adecuada. A partir de esta disolución, se preparan por dilución diferentes muestras, siempre manteniendo los criterios establecidos anteriormente.

Se comenzó probando cada analito por separado para comprobar cual era el grado de extracción. Después de probar distintas diluciones se encontró que la mejor metodología a seguir es la siguiente:

Se contamina 0.5 mL de orina con nuestros analitos, dentro de los límites biológicos, se deja transcurrir 10 minutos para favorecer las interacciones y, a continuación, se diluye a 25 mL. De este matraz se toman 2.5 mL y se llevan a un matraz de 10 mL, al cual también se le adicionan 2.5 mL de tampón cloroacético/cloroacetato sódico de pH 3.5, y se enrasa con agua miliQ. Esta disolución se vierte a un embudo de decantación al que se añaden 10 mL de cloroformo. Se agita durante 10 minutos y se deja reposar para que las fases se separen y, finalmente, se recoge la fase orgánica, la cual se filtra a través de un embudo que contiene sulfato sódico sólido. A esta disolución es a la que se registra tanto el espectro de emisión como el espectro tridimensional, utilizando las condiciones operatorias fijadas.

Los espectros de muestras y patrones en estas condiciones se recogen en la Figura V.10. En dicha figura se puede observar, asimismo, la cuantitividad de la extracción efectuada, para los 3 componentes de interés. Se observa, asimismo, que en las condiciones experimentales expuestas no parecen extraerse otros posibles

Capítulo V.- Determinación espectrofluorimétrica de los ácidos mefenámico, flufenámico y meclofenámico en orina usando métodos de calibración multivariante de segundo orden

componentes de la orina, o éstos no aportan una contribución apreciable a la emisión de fluorescencia, en los rangos ensayados.

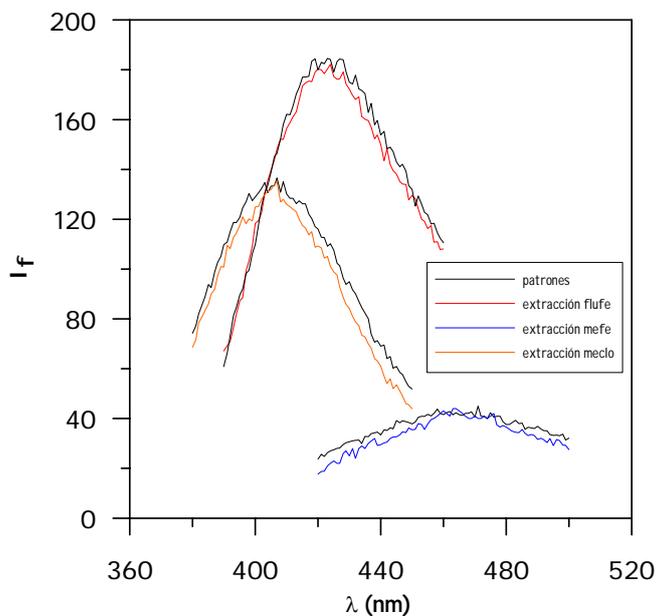


Figura V.10.- Espectros de emisión de las extracciones de muestras de orina fortificadas con los analitos y de los correspondientes patrones en cloroformo

En estas condiciones experimentales, se registraron las EEMs, para aplicar, unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS.

En la Figura V.11, se comparan los espectros tridimensionales de la muestra de calibración, M15, en ausencia de orina (A) y en presencia de ésta (B), en los rangos espectrales previamente seleccionados.

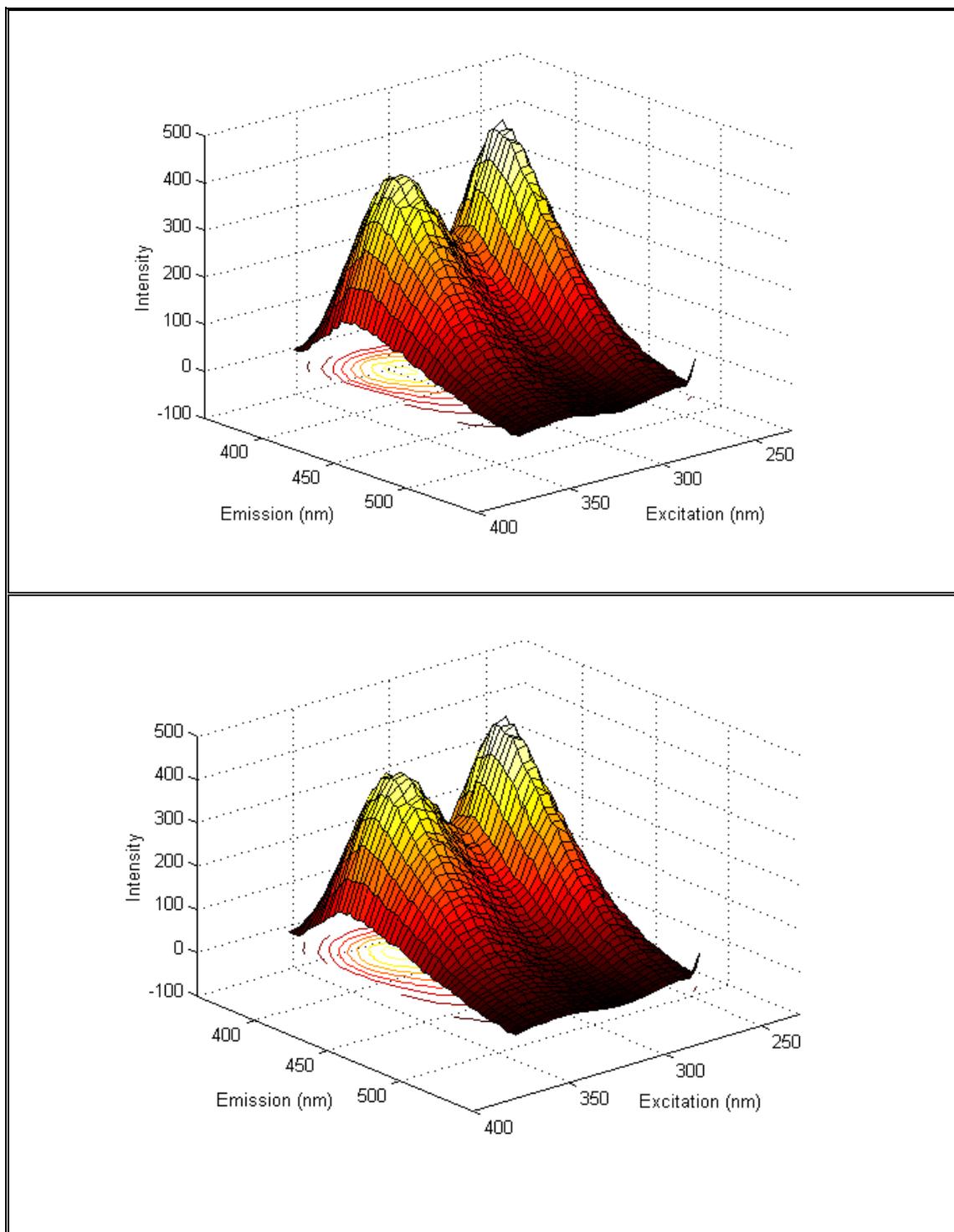


Figura V.11.- Espectros tridimensionales de la muestra de calibración, M15, en ausencia de orina (A) y en presencia de ésta (B).

En la muestra (B) se observa que tanto la intensidad como las formas de los espectros tridimensionales son prácticamente idénticas. Se puede comprobar como la señal producida por la orina es casi inexistente, debido seguramente a que, en el paso de extracción de la orina, los componentes fluorescentes de la orina no han sido extraídos.

- **Selección del número de factores**

En los métodos UPLS y NPLS, para la determinación del número óptimo de factores se realizó el método de validación cruzada para el conjunto de muestras de orina que se recogen en la Tabla V.8, y se siguió el criterio de Haaland y Thomas [74]. El conjunto de calibración utilizado fue el que se recoge en la Tabla V.2 (M1-M15). Los resultados mostraron que el número óptimo de factores sigue siendo tres.

Tabla V.8.- Composición de las muestras de orina

Orina	Ácido mefenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido meclofenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido flufenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
1	0.40	0.40	0.30
2	1.00	0.40	0.60
3	0.40	0.60	0.60
4	0.80	0.36	0.80
5	0.80	0.32	0.44
6	1.00	0.60	0.60
7	0.44	0.72	0.36
8	0.60	0.50	0.40
9	0.60	0.50	0.40
10	0.60	0.00	0.00
11	0.00	0.00	0.00
12	0.40	0.00	0.00
13	0.00	0.00	0.40
14	0.00	0.00	0.60
15	0.00	0.72	0.00
16	0.00	0.30	0.00
17	0.00	0.40	0.48
18	0.60	0.00	0.72
19	0.80	0.50	0.00
20	0.40	0.00	0.60
21	0.00	0.52	0.60
22	0.60	0.40	0.00
23	0.80	0.40	0.00
24	0.60	0.00	0.60

Para llevar a cabo la elección del número óptimo de factores en el caso de PARAFAC, que luego utilizaremos para aplicar SWATLD, se ha analizado el valor del denominado core consistency. Como podemos comprobar, Figura V.12, el valor del core consistency cae a un valor inferior al 50%, cuando se utilizan cinco factores

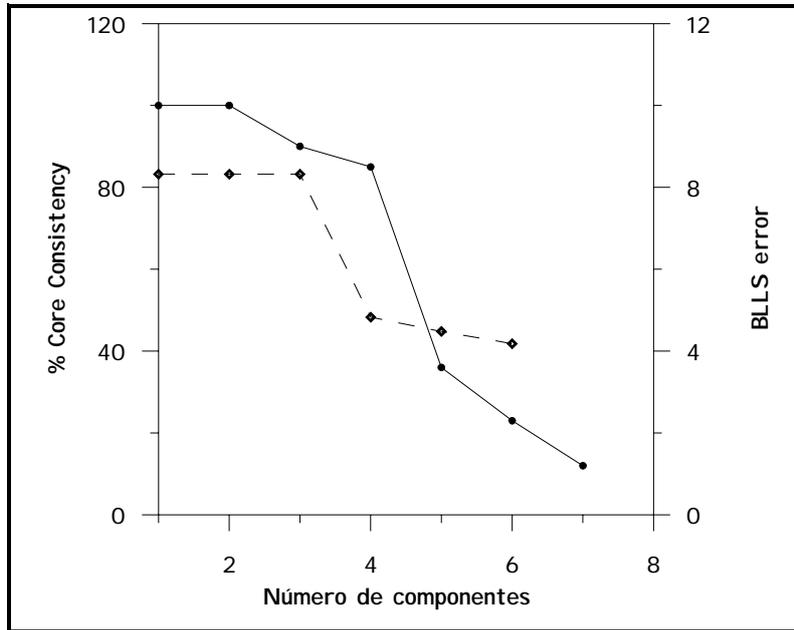
Capítulo V.- Determinación espectrofluorimétrica de los ácidos mefenámico, flufenámico y meclofenámico en orina usando métodos de calibración multivariante de segundo orden

espectrales para modelar la calibración, de manera que el número de factores óptimos a utilizar es 4.

Además de utilizar el criterio descrito anteriormente, también podemos seleccionar el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión de la pseudo regresión univariante, en función del número de factores. Este método debe aplicarse para cada una de las muestras. Como se puede ver en la Figura V.13, para el caso de una muestra de orina, el error de regresión para los tres analitos permanece constante cuando el número de factores es superior a cuatro, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

Se analizaron, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores de 4.

Para determinar el número óptimo de factores en el caso de BLLS se realiza un análisis del residuo de regresión. Como se observa en la Figura V.12, se produce un salto brusco en el valor del residuo al introducir un componente más que los utilizados para la calibración, esto es lógico porque además de los tres analitos, tenemos la orina. Al ir aumentando el número de componentes este valor del residuo permanece prácticamente constante, con lo cual elegiremos 4 como número de factores óptimo. Este mismo comportamiento se obtiene para las demás muestras de orina, y está en concordancia con los resultados encontrados en PARAFAC.



Figura

V.12.-

Representación del core consistency (—) y del BLS error (----) en función del número de factores para una muestra de orina fortificada con MEF, MEC y FLU

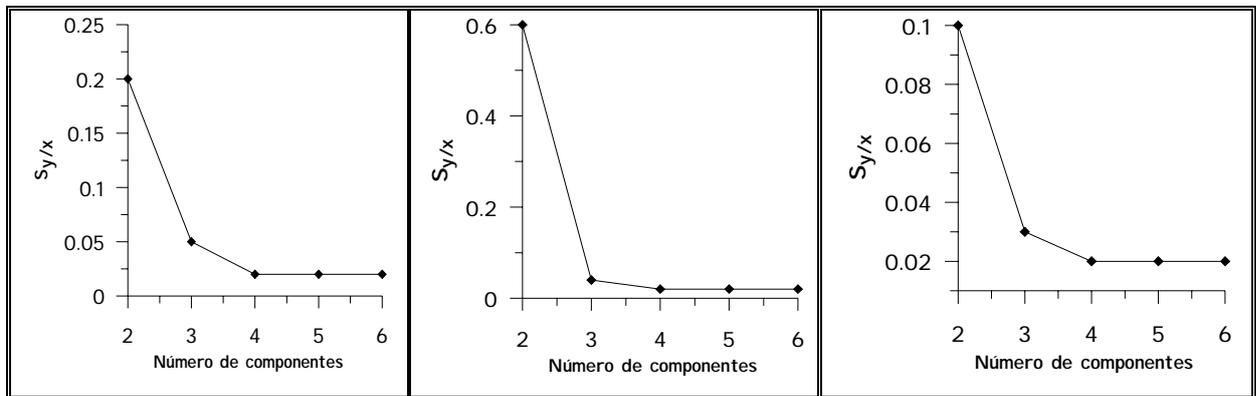


Figura V.13.- Representación del error de regresión de la pseudo regresión univariante para mefenámico, meclufenámico y flufenámico para una muestra de orina contaminada con ellos

En la Figura V.14, podemos ver los perfiles de las matrices **B** y **C**, que se obtienen al procesar una muestra problema junto con el conjunto de calibración, y tras aplicar PARAFAC. En esta figura, se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo, en este caso concreto. Los componentes aparecen en orden, en función a su contribución al total de la varianza. En nuestro caso, la interferencia de la orina aparece en último lugar. Esto es debido a que, en el proceso de extracción, la mayor parte de los componentes fluorescentes de la orina no han sido extraídos en la fase orgánica, con lo que la señal producida por la orina es mínima y ésta es la causa de su poca contribución total a la varianza.

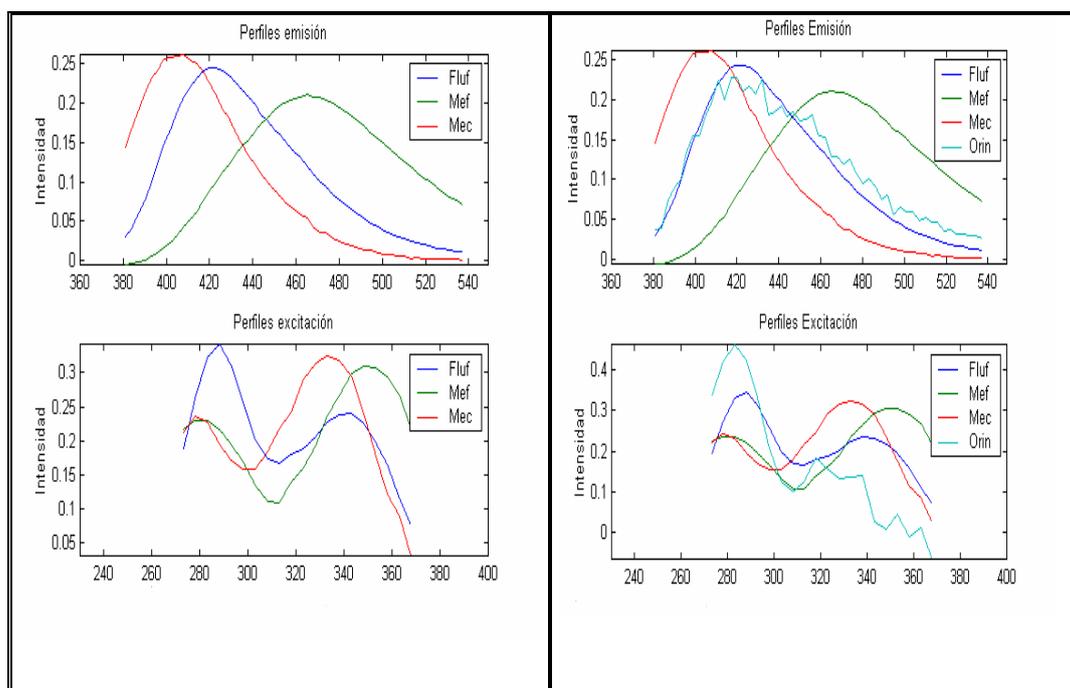


Figura V.14.- Perfiles de emisión de los factores optimizados mediante PARAFAC:(a) espectros de los patrones puros de MEF, MEC y FLU; (b) muestra de orina en presencia de MEF, MEC y FLU. Perfiles de excitación de los factores optimizados: (c) espectros de los patrones puros de MEF, MEC y FLU; (d) muestra de orina en presencia de MEF, MEC y FLU.

Si comparamos los perfiles dados por PARAFAC, con los espectros de los componentes puros, podemos asignar que el número uno corresponde al flufenámico, el dos corresponde al mefenámico, el número tres al meclofenámico y, finalmente, el número cuatro corresponde a la orina. Los resultados obtenidos con SWATLD fueron similares.

Esta forma de mostrar los espectros y de su asignación es la misma que se aplica al utilizar SWATLD, pero en el caso de BLLS es algo diferente. Para hacer cálculos con BLLS también se utiliza la misma interfase utilizada para SWATLD y PARAFAC, pero la introducción de datos varía. En este caso necesitamos un fichero de calibración en el que aparezcan todos los analitos. Al predecir, los perfiles obtenidos son similares a los obtenidos por PARAFAC, con la salvedad de que los analitos aparecen en el orden en el que se hayan introducido en el fichero, es decir, no se requiere la identificación de los componentes de calibración como en el caso de PARAFAC y SWATLD, sino que el algoritmo la realiza automáticamente. Los resultados obtenidos se representan en la Figura V.15. Al mismo tiempo, obtenemos gráficos de calibración pseudovariante, mostrando en el espacio de MATLAB el residuo de regresión espectral y las concentraciones de cada analito.

Capítulo V.- Determinación espectrofluorimétrica de los ácidos mefenámico, flufenámico y meclofenámico en orina usando métodos de calibración multivariante de segundo orden

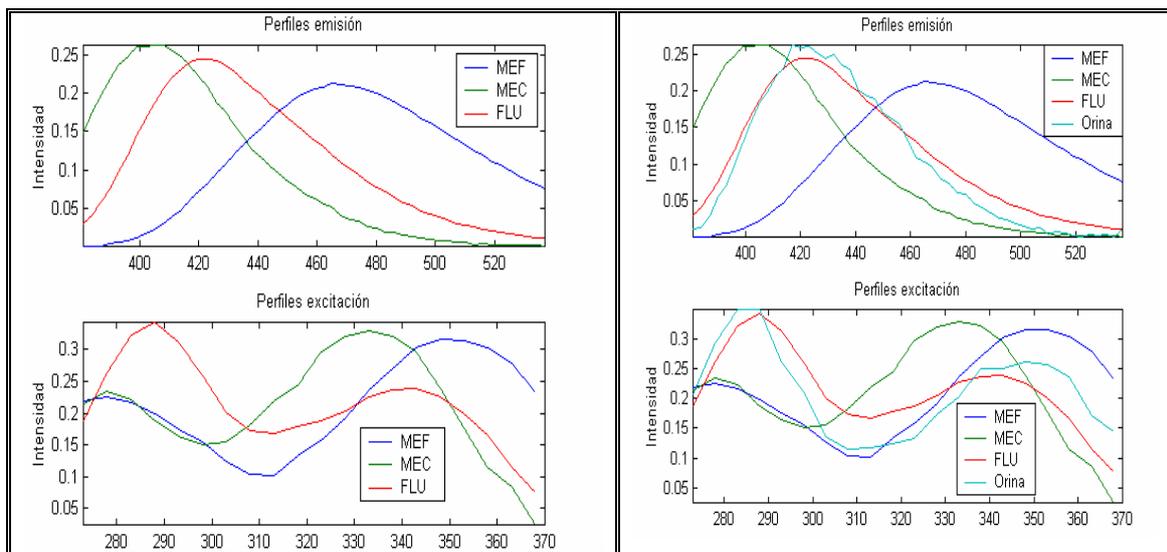


Figura V.15 .- Perfiles de emisión de los factores optimizados mediante BLS: (a) espectros de los patrones puros de MEF, MEC y FLU; (b) muestra de orina en presencia de MEF, MEC y FLU. Perfiles de excitación de los factores optimizados: (c) espectros de los patrones puros de MEF, MEC y FLU; (d) muestra de orina en presencia de MEF, MEC y FLU.

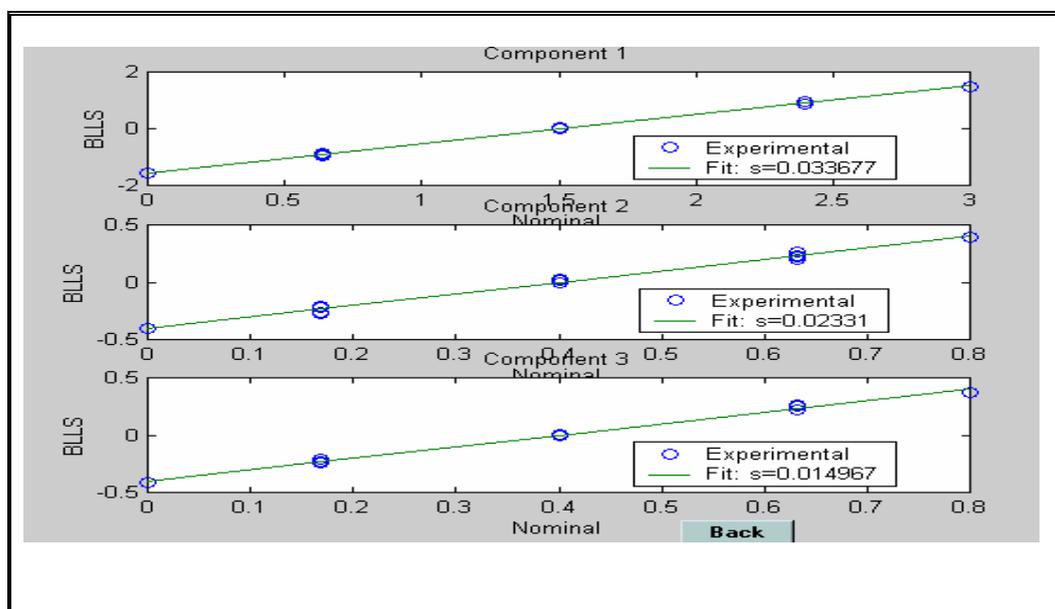


Figura V.16.- Gráfico de la calibración univariante obtenido al aplicar BLS a la primera muestra de orina.

En las Tablas V.9 y V.10, se resumen los valores de concentración encontrados para los tres componentes en el conjunto de muestras de orina analizadas, utilizando U-PLS, N-PLS y PARAFAC, SWATLD, BLLS, respectivamente. Mientras que en la Tabla V.11 se resumen los parámetros estadísticos encontrados en el análisis de orina para cada uno de los métodos utilizados.

Tabla V.9.- Valores de concentración encontrada (U-PLS /N-PLS) para cada uno de los analitos, en muestras de orina contaminadas con dichos analitos.

Orina	Ácido mefenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido meclofenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido flufenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Añadido (Predicho)	Añadido (Predicho)	Añadido (Predicho)
1	0.40 (0.43) (0.42)	0.40 (0.38) (0.38)	0.30 (0.26) (0.26)
2	1.00 (1.02) (1.02)	0.40 (0.44) (0.45)	0.60 (0.58) (0.58)
3	0.40 (0.45) (0.45)	0.60 (0.63) (0.64)	0.60 (0.54) (0.51)
4	0.80 (0.85) (0.85)	0.36 (0.33) (0.33)	0.80 (0.78) (0.78)
5	0.80 (0.83) (0.82)	0.32 (0.40) (0.40)	0.44 (0.43) (0.43)
6	1.00 (1.07) (1.07)	0.60 (0.63) (0.63)	0.60 (0.52) (0.52)
7	0.44 (0.47) (0.47)	0.72 (0.66) (0.66)	0.36 (0.40) (0.43)
8	0.60 (0.66) (0.66)	0.50 (0.54) (0.55)	0.40 (0.34) (0.34)
9	0.60 (0.65) (0.65)	0.50 (0.55) (0.55)	0.40 (0.35) (0.35)
10	0.60 (0.65) (0.66)	0.00 (0.00) (0.01)	0.00 (0.00) (0.00)
11	0.00 (0.005) (0.005)	0.00 (0.01) (0.01)	0.00 (0.01) (0.01)
12	0.40 (0.46) (0.46)	0.00 (-0.02) (-0.02)	0.00 (0.005) (-0.005)
13	0.00 (0.01) (0.01)	0.00 (0.01) (0.004)	0.40 (0.38) (0.38)
14	0.00 (0.02) (0.01)	0.00 (0.02) (0.01)	0.60 (0.56) (0.56)
15	0.00 (0.00) (0.02)	0.72 (0.75) (0.76)	0.00 (-0.001) (0.001)
16	0.00 (-0.01) (-0.003)	0.30 (0.27) (0.26)	0.00 (0.01) (0.02)
17	0.00 (0.01) (0.01)	0.40 (0.44) (0.45)	0.48 (0.45) (0.45)
18	0.60 (0.67) (0.69)	0.00 (0.002) (0.01)	0.72 (0.65) (0.63)
19	0.80 (0.78) (0.79)	0.50 (0.55) (0.55)	0.00 (0.003) (0.003)
20	0.40 (0.41) (0.45)	0.00 (0.01) (0.002)	0.60 (0.62) (0.62)
21	0.00 (0.02) (0.01)	0.52 (0.58) (0.58)	0.60 (0.60) (0.60)
22	0.60 (0.69) (0.88)	0.40 (0.45) (0.45)	0.00 (0.02) (0.01)
23	0.80 (0.86) (0.88)	0.40 (0.43) (0.46)	0.00 (-0.004) (-0.04)
24	0.60 (0.65) (0.65)	0.00 (-0.01) (-0.01)	0.60 (0.57) (0.57)

Tabla V.10.- *Valores de concentración encontrada (PARAFAC /SWATLD/BLLS) para cada uno de los analitos, en muestras de orina contaminadas con dichos analitos.*

Orina	Ácido mefenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido meclofenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Ácido flufenámico ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	Añadido (Predicho)	Añadido (Predicho)	Añadido (Predicho)
1	0.40 (0.42) (0.42) (0.40)	0.40 (0.38) (0.38) (0.38)	0.30 (0.29) (0.29) (0.26)
2	1.00 (1.02) (1.02) (1.02)	0.40 (0.38) (0.37) (0.43)	0.60 (0.58) (0.58) (0.58)
3	0.40 (0.45) (0.46) (0.45)	0.60 (0.61) (0.62) (0.63)	0.60 (0.51) (0.51) (0.51)
4	0.80 (0.85) (0.85) (0.85)	0.36 (0.34) (0.34) (0.33)	0.80 (0.78) (0.78) (0.78)
5	0.80 (0.82) (0.82) (0.82)	0.32 (0.38) (0.38) (0.40)	0.44 (0.43) (0.43) (0.43)
6	1.00 (1.07) (1.07) (1.07)	0.60 (0.63) (0.63) (0.63)	0.60 (0.52) (0.52) (0.52)
7	0.44 (0.47) (0.46) (0.45)	0.72 (0.66) (0.66) (0.66)	0.36 (0.40) (0.40) (0.40)
8	0.60 (0.56) (0.56) (0.62)	0.50 (0.55) (0.55) (0.51)	0.40 (0.34) (0.35) (0.36)
9	0.60 (0.65) (0.65) (0.65)	0.50 (0.55) (0.55) (0.55)	0.40 (0.35) (0.33) (0.35)
10	0.60 (0.66) (0.67) (0.66)	0.00 (0.02) (0.01) (0.01)	0.00 (0.00) (0.00) (0.00)
11	0.00 (0.01) (0.005) (0.005)	0.00 (0.01) (0.01) (-0.02)	0.00 (0.01) (0.01) (0.02)
12	0.40 (0.43) (0.45) (0.46)	0.00 (-0.03) (-0.04) (-0.02)	0.00 (-0.007) (-0.02) (0.00)
13	0.00 (0.02) (0.01) (0.02)	0.00 (0.005) (0.005) (0.002)	0.40 (0.38) (0.37) (0.38)
14	0.00 (0.001) (0.005) (0.005)	0.00 (0.01) (0.01) (0.01)	0.60 (0.56) (0.57) (0.56)
15	0.00 (-0.02) (-0.02) (-0.01)	0.72 (0.75) (0.75) (0.73)	0.00 (-0.001) (0.00) (-0.01)
16	0.00 (-0.003) (-0.01) (-0.01)	0.30 (0.27) (0.27) (0.27)	0.00 (0.02) (0.01) (0.002)
17	0.00 (0.01) (0.01) (0.01)	0.40 (0.45) (0.45) (0.40)	0.48 (0.45) (0.45) (0.45)
18	0.60 (0.67) (0.65) (0.66)	0.00 (0.002) (0.002) (0.002)	0.72 (0.63) (0.63) (0.63)
19	0.80 (0.77) (0.77) (0.78)	0.50 (0.55) (0.55) (0.52)	0.00 (0.003) (0.002) (0.00)
20	0.40 (0.41) (0.43) (0.41)	0.00 (0.01) (0.01) (0.01)	0.60 (0.62) (0.62) (0.62)
21	0.00 (0.01) (0.01) (0.01)	0.52 (0.58) (0.58) (0.58)	0.60 (0.60) (0.62) (0.60)
22	0.60 (0.61) (0.62) (0.61)	0.40 (0.45) (0.45) (0.46)	0.00 (0.01) (0.01) (0.01)
23	0.80 (0.87) (0.87) (0.85)	0.40 (0.43) (0.43) (0.43)	0.00 (-0.04) (-0.04) (-0.02)
24	0.60 (0.65) (0.65) (0.64)	0.00 (-0.01) (-0.01) (-0.01)	0.60 (0.57) (0.58) (0.57)

Tabla V.11.- *Resultados estadísticos de la determinación simultánea de MEF, MECLO y FLUFE en orina, mediante calibración de segundo orden*

	% R media (n=24)			REP			RMSEP		
	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU
UPLS	108	105	104	11.9	9.8	8.2	0.09	0.05	0.05
NPLS	108	106	103	11.8	10.0	8.1	0.08	0.05	0.04
PARAFAC	106	102	102	10.8	9.0	7.9	0.07	0.04	0.04
SWATLD	107	103	103	11.0	9.4	8.0	0.07	0.05	0.04
BLLS	106	102	102	10.4	9.0	7.9	0.07	0.04	0.04

Los resultados estadísticos mostrados en la Tabla V.11, presentan valores de REP para los tres analitos comparables con los encontrados para las extracciones de las mezclas ternarias sintéticas, e incluso para el caso del ácido flufenámico, algo mejores.

Los valores de REP para el caso de PARAFAC, SWATLD y BLLS son algo mejores que para los métodos unfolded-PLS y N-PLS, debido a que estos últimos algoritmos no aprovechan la ventaja de segundo orden, no modelando por tanto, las interferencias de la orina, no contenidas en las muestras de calibración. Sin embargo, en el presente caso, en el cual se ha llevado a cabo un etapa previa de extracción, las interferencias de la orina son prácticamente eliminadas, con lo que los resultados de predicción obtenidos con unfolded-PLS y N-PLS, son también aceptables.

- **Reproducibilidad**

Para llevar a cabo un estudio de la reproducibilidad del método se prepararon 10 muestras de orina contaminadas con los analitos, siendo las concentraciones de éstos en el matraz de 10 mL las siguientes: mefenámico $0.6 \mu\text{g mL}^{-1}$, meclofenámico $0.5 \mu\text{g mL}^{-1}$ y flufenámico $0.4 \mu\text{g mL}^{-1}$. A éstas muestras se les aplicó el método operatorio descrito. Los parámetros estadísticos obtenidos se resumen en la Tabla V.12, donde se observan unos resultados satisfactorios.

Tabla V.12.- Resultados estadísticos obtenidos para las 10 muestras estudiadas

	UPLS			NPLS			PARAFAC			SWATLD			BLLS		
	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU	MEF	MEC	FLU
\bar{x}	0.66	0.52	0.41	0.64	0.53	0.42	0.63	0.53	0.41	0.64	0.53	0.41	0.65	0.53	0.42
S_d	0.03	0.03	0.02	0.03	0.03	0.018	0.03	0.04	0.02	0.05	0.03	0.017	0.05	0.03	0.015
RSD	3.9	5.7	5	3.8	5.5	4.5	3.8	7.5	4.7	6.4	5.6	4.1	6.6	5.6	3.7

\bar{x} .- Valor medio

S_d .- Desviación estándar

RSD.- Desviación estándar relativa [RSD = $(\bar{x} / S_d) \cdot 100$]

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva de los métodos empleados, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y predicha por los diferentes métodos. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para cada método se han comparado con los valores (0,1) teóricos mediante el denominado test de la elipse (EJCR, *Elliptical Joint Confidence Region*) [76].

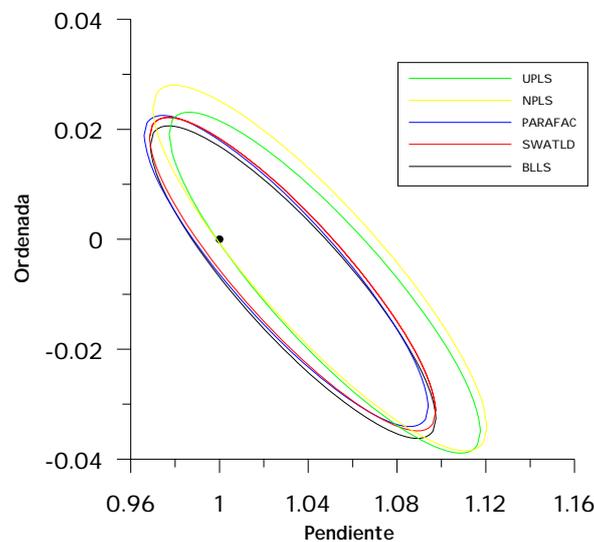


Figura V.17.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual. El punto negro marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$).

Como se puede observar en la Figura V.17, aunque todas las elipses contienen el punto teórico (0,1), en las correspondientes al unfolded-PLS y N-PLS, el punto está prácticamente fuera de la elipse y dichas elipses muestran un tamaño mayor, con lo que los resultados son menos precisos. Sin embargo, las correspondientes a PARAFAC, SWATLD y BLLS presentan un menor tamaño y el punto teórico está totalmente

incluido, con lo que podemos concluir que estos algoritmos, debido a la “ventaja de segundo orden”, producen resultados de mayor calidad y más precisos.

3.- CONCLUSIONES

Se propone un método de determinación fluorimétrica de los ácidos flufenámico, mefenámico y meclofenámico en una matriz compleja, como son muestras de orina, utilizando técnicas de calibración multivariante de segundo orden. Una selección adecuada de los rangos de excitación y emisión, que permite evitar las señales de dispersión del efecto Rayleigh, mejora la capacidad predictiva del modelo. Todos los modelos ensayados, unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS, son capaces de modelar el sistema en esta situación, en la que la etapa previa de extracción en cloroformo, elimina prácticamente las posibles interferencias de la orina. Sin embargo, la aplicación de los métodos que presentan la ventaja de segundo orden (PARAFAC, SWATLD y BLLS) permite la determinación simultánea de los tres ácidos, incluso en presencia de otros posibles compuestos interferentes, que pudieran ser extraídos junto con los analitos, de la orina, en la etapa de extracción en cloroformo. Se obtuvieron valores de recuperación satisfactorios en todos los casos en las muestras de orina analizadas, aunque los algoritmos que presentan la ventaja de de segundo orden, produjeron resultados más precisos.

- 1.- <http://med.unne.edu.ar/catedras/farmacología /temas farma /volumen 4/cap7-aines.pdf>.
- 2.- Niopas. I, Manzoridi. K, *J. Chromatogr. B*, 1994, 656, 447
- 3.- P.A. Insel, in: Goodman, Gilman, A. (Eds), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, chap. 27, McGraw-Hill, New York, 1996
- 4.- McGurk . K.A, Remmel R.P, Hosagrahara V.P., Tosh D., Burchell B., *Drug Metab. Dispo.*, 1996, 24, 842
- 5.- Agrawal, Y.K., *Sci. Cult.* 1980, 46, 309; *Anal. Abstr.* 1986, 41, 4E9
- 6.- Hassib, S.T., Safwat R.I., *Analyst* 1986, 45, 111
- 7.- Pryakhim, O.R., Vdoviko V.A, Pokhmelkina S.A, Petrenko V.V, Golowkin V.A, *Khim. Farm. Zh*, 1981, 15, 93; *Anal. Abstr.* 1982, 43, 6E46
- 8.- El-Sadek, M., Baraka, M., Aboul Khmer A., *Indian J. Pharm. Sci.* 1987, 49, 97
- 9.- Issa A.S, Beltagy Y.A, Gabr Kassem M., Daabees H.G., *Talanta*, 1985, 32, 209
- 10.- Sabry S.M., Mahgoub H., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, 21, 993
- 11.- Dusci L.J, Hackett L.P, *J. Chromatogr.* 1978, 161,340
- 12.- Cotellesa L., Riva R., Salva P., Marcucci F., Mussini F., Mussini E., *J. Chromatogr.* 1980, 192, 441
- 13.-Albero M.I, Sánchez-Pedreño C., García M.S.,*J.Pharm. Biomed. Anal.* 1995, 13,113
- 14.- Fatma A. Aly, Salma A. Al-Tamimi, Abdulrahman A. Alwarthan, *Analyt. Chim. Acta*, 2000, 416, 87
- 15.- Bettaieb L., Aaron J.J, Prognon P., *Luminiscence*, 2002, 17, 257
- 16.- Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Sanz A., Bravo E., *J. Chromat. B.*, 1998, 708, 249
- 17.- Bettaieb L., Aaron J.J, Prognon P., *Luminiscence*, 2002, 17, 252
- 18.- Arnaud N., Georges J., *Anal-Chim-Acta*, 2003, 476, 149
- 19.- Ioannou P.C., Rusakova N.V., Andrikopoulou D.A., Glynou K.M, Tzompanaki G.M., *Analyst*, 1998, 123, 2839
- 20.- Sabry S.M., *Anal. Chim. Acta.* 1998, 367, 41
- 21.- Mehta A.C, Schulman S.G.,*Talanta*, 1973, 20, 702
- 22.-Hattori Y., Arai T.,Mori T.,Fujihira E., *Chem. Pharm. Bull.* 1970, 18, 1063

- 23.-Dell H.D., Kamp R., Arch. Pharm. 1970, 303,785
- 24.-Schmollack W., Wenzel U., Pharmazie 1974, 29, 702
- 25.-Goodman, Gilman A., The Pharmacological Basis of Therapeutical, 9 th ed., McGraw-Hill, New York, 1996
- 26.-Lloyd J.B.E, Nature 1971, 231, 64
- 27.-Vo-Dihn T.,*Anal. Chem.* 1978, 50, 396
- 28.-Green G.L, O'Haver T.C., *Anal. Chem.* 1974, 46, 2191
- 29.- Pérez-Ruiz T., Martínez-Lozano C., Tomás V., Carpena J., *Talanta*, 1998, 47, 537
- 30.-Vo-Dinh T.,*Appl. Spectrosc.* 1982, 36, 576
- 31.- Xu, L., Schechtter I., *Anal. Chem.* 1996, 68, 2392
- 32.- Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D., Salinas F., *Talanta*, 2004, 62, 853
- 33.- Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., González Gómez D., Salinas F., *Anal. Chim. Acta*, 2005, 531, 257
- 34.- Spiegelman C.H, Mcshane M.J, Goetz M.J, Motamedi M, Yue Q.L, *Anal. Chem.* 1998, 70, 35
- 35.- Todeschini R., *Anal. Chim. Acta* 1997, 348, 419
- 36.- Todeschini R., Consonni V., Maiocchi A., *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 1998, 46, 13
- 37.- Capitán Valley L.F., Navas N., Del Olmo M., Consonni V., Todeschini R., *Talanta*. 2000, 52, 1069
- 38.- Faber N.M, Bro R, Hopke P.K, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2003, 65, 119
- 39.- Bro, R., Workman, J.J., Mobley, P.R., Kowalski, B.R. *Appl. Spectrosc. Rev.* 1997, 32, 237
- 40.- Jiji R.D, Booksh K.S, *Anal. Chem.* 2000, 72, 718
- 41.- Cao Y.Z., Chen Z.P, Mo C.Y., H.L Wu, Yu R.Q, *Analyst* 2000, 125, 2303
- 42.- Saurina J., Tauler R., *Analyst* 2000, 125, 2038
- 43.- Saurina J., Leal C., Compañó R., Granados M., Tauler R., Prat M.D, *Anal. Chim. Acta* , 2000, 409, 237
- 44.- Moberg L., Robertson G., Karlberg B., *Talanta* 2001, 54, 161

- 45.- Esteves da Silva J.C.G. , Litao J.M.M, Costa F.S, Ribeiro J.L, *Anal. Chim. Acta* , 2002, 453, 105
- 46.-. Cao Y.Z, Mo C.Y., Long J.G, Chen H., H.L Wu, Yu R. Q., *Anal. Sci.* 2002, 333
- 47.- Arancibia J.A, Olivieri A.C, Escandar G.M, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 374, 451
- 48.- Muñoz de la Peña A., Espinosa-Mansilla A., González-Gómez D., Olivieri A.C, Goicochea H.C, *Anal. Chem*, 2003, 75, 2640
- 49.- Trevisan M.G, Poppi R.J, *Anal. Chim. Acta* 2003, 493, 69
- 50.- Arancibia J.A., Escandar, G.M., *Talanta*, 2003, 60,1113
- 51.- M.J Rodríguez-Cuesta, R. Boque, F.X Rius, D. Picón-Zamora, M. Martínez-Galera, A. Garrido-Frenich, *Anal. Chim. Acta* 2003, 491, 47
- 52.- L.A Hergert, G.M Escandar, *Talanta* 2003, 60, 235
- 53.- P.C Damiani, A.J Nepote, M. Berzotti, A.C Olivieri, *Anal. Chem*, 2004, 76, 2798
- 54.- G.M. Escandar, D. González Gómez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña and H.C Goicochea, *Anal. Chim. Acta*, 2004, 506, 161
- 55.- M.C Mahedero, N. Mora Díez, A . Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil, *Talanta*, 2004, 65, 806
- 56.- Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Goicochea H.C., Olivieri A.C., *Appl. Spectrosc.* 2004, 58, 83
- 57.- Levi, M.A.B., Scarminio I.S., Poppi R.J., Trevisan M.G. *Talanta* 2004, 62,299
- 58.- Wilson I.D., Brinkman U.A., *J. Chromatogr* 2003, 1000, 325
- 59.- Sánchez, E., Kowalski, B.R, *Anal. Chem.* 1986, 58, 496
- 60.- Sánchez, E., Kowalski, B.R, *J.Chemom.* 1988, 2, 265
- 61.- Bro, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1997, 38, 149
- 62.- Chem, Z. P.; Wu, H.L.; Li, Y.;Yu,R. Q. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2000, 52, 75
- 63.- Esteban, M., Ariño, C., Díaz-Cruz, M.S., Tauler, R., *Trends Anal. Chem*, 2000, 19, 49
- 64.- Bro, R., *J. Chemom.*, 1996, 10, 47
- 65.- Linder, M., Sundberg, R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998, 42, 159
- 66.- Linder, M., Sundberg, R., *J. Chemom.*, 2002, 16, 12
- 67.- Booksh, K.S, Kowalski, B.R, *Anal. Chem.* 1994, 66, 782A

- 68-** Linder, M. Bilinear Regresión and Second-Order Calibration. Doctoral Thesis, Stockholm University, Sweden, 1998.
- 69.-** Damiani, P.C., Nepote, A.J., Bearzotti, M.; Olivieri, A.C., *Anal. Chem.* 2004, 76, 2798
- 70.-** Melita A.C. y Schulman S.G., *Talanta*, 1973, 20, 702
- 71.-** Capitán Valley L.F., Navas N., Del Olmo M., Consonni V., Todeschini R., *Talanta*. 2000, 52, 1069
- 72.-** Goicochea, H.C, Iñon, F.A, Olivieri, A.C, *Chemometrics and Intelligent laboratory System*, 73, 189, 2004
- 73.-** Alejandro Olivieri. Universidad Nacional de Rosario. Argentina 2003
- 74.-** Haaland D.M., Thomas E.V., *Anal. Chem.* 1998, 60, 1193
- 75.-** Bro, R; Kiers, H.A.L; *Journal of Chemometrics*, 2003, 17, 274
- 76.-** González , A.G., Herrador, M.A., Asuero, A.G., *Talanta* 1999, 48, 729

1.-INTRODUCCIÓN. MEDIOS MICELARES

En este capítulo se pretende aprovechar la “ventaja de segundo orden”, que nos ofrecen los métodos PARAFAC y SWATLD, para determinar dos antiinflamatorios, los ácidos meclofenámico (MEF) y flufenámico (FLU) en fluidos biológicos, evitando la etapa de extracción de la que hacíamos uso en el capítulo anterior. Para ello, se hará uso de surfactantes, con el objetivo de aumentar la señal de fluorescencia de estos analitos en disolución acuosa.

La utilización de los llamados “medios organizados” o “medios ordenados”, ofrece un indudable interés en la metodología analítica, debido a la capacidad que presentan de organizar los analitos a nivel molecular. Los agregados moleculares son estructuras químicas microscópicas que, en ciertas condiciones, se aproximan a las características de disoluciones fluidas homogéneas.

En una estructura organizada, generalmente se encuentran dos regiones de distinta polaridad y, como resultado, pueden unirse a determinados analitos o compartimentarlos, dependiendo de la polaridad. En disolución acuosa, la unión se traduce en que el analito está “protegido” de aquellos componentes que se encuentran en el disolvente acuoso.

Sería muy extenso exponer todas las aplicaciones de estas especies en las distintas técnicas empleadas en Química Analítica, por ello, vamos a comentar de forma resumida sus propiedades, características y aplicaciones, para centrarnos en el uso de estos medios en el desarrollo de métodos luminiscentes.

CARACTERÍSTICAS Y PROPIEDADES

Los agentes de superficie activa, también llamados tensoactivos, son sustancias cuyas moléculas poseen una región hidrofílica y otra hidrofóbica, lo que les confiere propiedades específicas en disolución. La unión cabeza-cola hace que la micela posea tantos grupos polares como apolares y forme agregados que están en equilibrio dinámico con los monómeros que conforman la micela.

Estas moléculas están formadas generalmente por una cadena hidrocarbonada de entre 8 y 18 átomos de carbono, que forma la región hidrófoba o “cola” y un grupo polar o iónico que constituye la región hidrófila o “cabeza”.

Cuando la concentración de estas moléculas en disolución es superior a un valor característico, conocido como **concentración micelar crítica** (c.m.c), se asocian para formar agregados bien definidos que son las micelas. A menudo, la c.m.c. es considerada como una única concentración, sin embargo, se trata de una estrecha zona de concentraciones en la que se alteran las propiedades físicas de la disolución. De hecho, el cálculo de la c.m.c. se obtiene estudiando cómo varía la tensión superficial, la conductancia, etc, de la disolución del tensoactivo, en función de la concentración del mismo.

La estructura de una micela es aproximadamente esférica a baja concentración de tensoactivo y cilíndrica o elipsoidal a altas concentraciones o en presencia de electrolitos [1]. Los grupos polares de cada molécula se disponen hacia fuera, en el seno de la disolución acuosa, mientras que las cadenas hidrocarbonadas están dirigidas hacia el interior de la micela formando un núcleo no polar o hidrófobo.

Cuando la concentración de tensoactivo es inferior a la c.m.c., éste se encuentra en forma de monómero, pero a medida que se aumenta la concentración del mismo y se alcanza la c.m.c se forman las micelas, que están constituidas por un número más o

menos fijo de monómeros llamado **número de agregación**, entre 60 y 100, dependiendo del tensoactivo. La concentración de monómeros del tensoactivo en

equilibrio con las micelas es aproximadamente constante e igual a la c.m.c. [2]. Así, un incremento en la concentración de tensoactivo por encima de la c.m.c. conduce a un incremento del número de micelas en disolución, sin modificarse significativamente la concentración de monómeros libres.

La concentración de micelas en disolución se puede calcular mediante la siguiente expresión:

$$\text{Micelas} = \frac{C_T - \text{c.m.c.}}{N}$$

donde C_T es la concentración total del agente micelar, c.m.c. es la concentración micelar crítica y N es el número de agregación.

En una micela iónica, el núcleo es líquido y está formado por la asociación de las N cadenas hidrocarbonadas, en cuyos extremos se encuentran los grupos totalmente ionizados, dirigidos hacia la disolución acuosa. Rodeando a este núcleo está la capa de Stern, que contiene a los grupos ionizados y a los correspondientes $N(1 - \alpha)$ contraiones que forman la doble capa eléctrica que rodea a la micela.

El centro y la capa de Stern constituyen la micela cinética con una carga total αNe^- , siendo e^- la carga elemental, cuyo potencial es el potencial electroforético zeta. El límite más superficial de la capa de Stern constituye la superficie hidrodinámica externa de la micela.

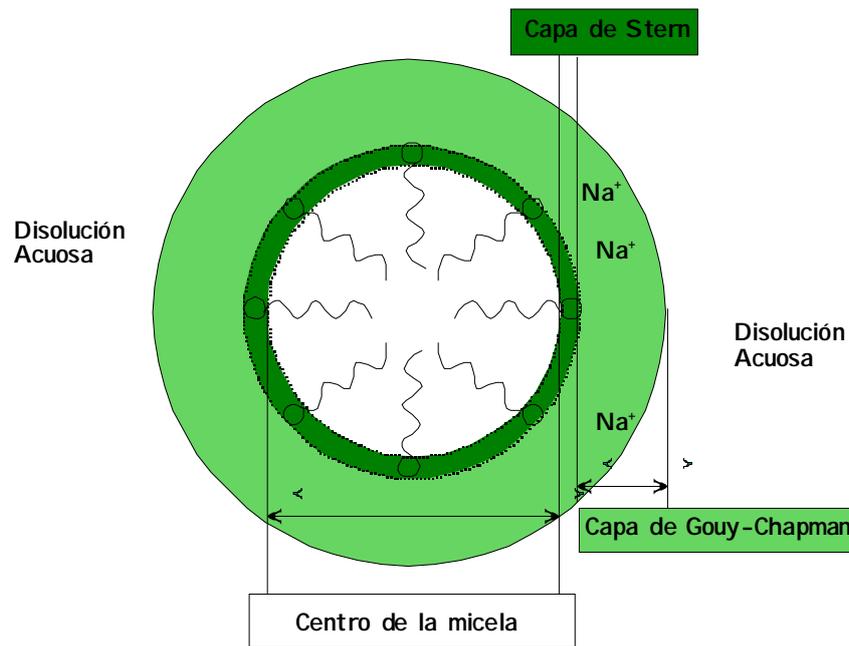


Figura VI.1.- Esquema general de una micela iónica

El campo eléctrico creado por la micela produce una atracción efectiva sobre los iones de la disolución, en un radio que delimita la capa de Gouy-Chapman, que es mucho más difusa que la de Stern y contiene los restantes Na^+ contraiones. Actualmente, se está investigando la naturaleza de las regiones micelares, para conocer el comportamiento de las micelas como agentes solubilizantes y predecir la localización de las moléculas solubilizadas en el interior micelar. En la Figura VI.1 se representa un esquema de una micela iónica [3].

Los factores que determinan el valor de la c.m.c. de un tensoactivo, su número de agregación, el tamaño de las micelas, etc., son: la longitud de la cadena hidrocarbonada, el tamaño y estructura del grupo de cabeza, la naturaleza del contraión, la presencia de electrolitos, así como la temperatura.

Para los tensoactivos iónicos, existe una temperatura denominada **punto de Kraft** que depende de la naturaleza del tensoactivo, por debajo de la cual, la solubilidad del monómero es inferior a la c.m.c., por lo que no existirán micelas por debajo de dicha temperatura. Para surfactantes no iónicos, a esta temperatura se le denomina **punto de nube**. Si una disolución micelar se enfría por debajo de su correspondiente punto de nube, el tensoactivo precipita hasta que su concentración se iguale a su solubilidad a esa temperatura.

Si la micela posee dos colas, no se forman micelas sino bicapas o vesículas [4] tal y como se observa en la Figura VI.2. La estructura de una vesícula en disolución acuosa se asemeja a dos esferas circunscritas con los grupos no polares formando una especie de doble capa que es no polar en su interior y polar en las dos caras externas, denominándose vesículas normales.

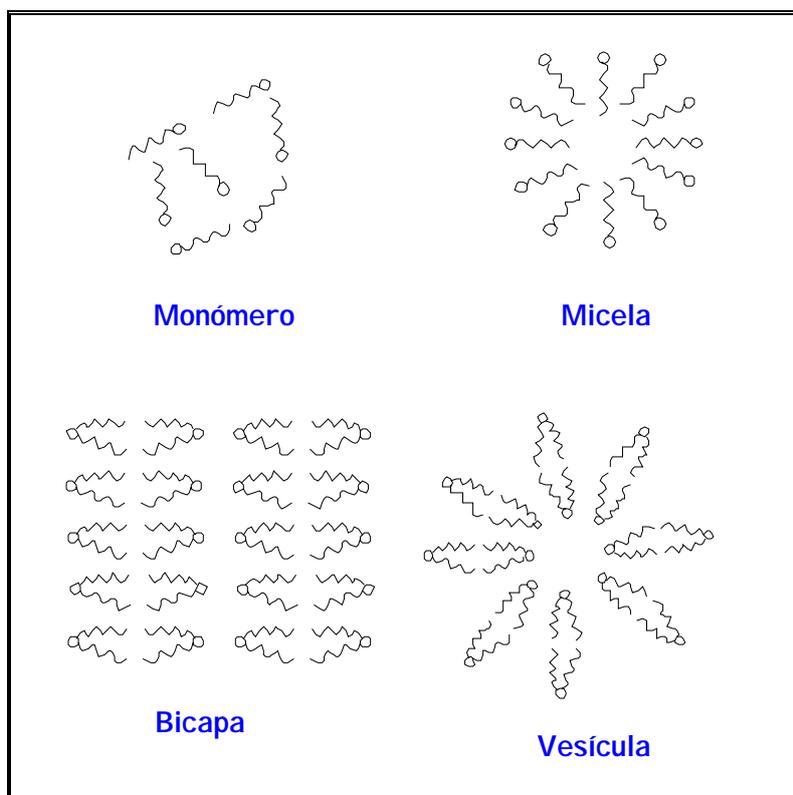


Figura VI.2.- Tipos de agregados que forman los agentes micelares en disolución acuosa.

En el caso de que se utilice un disolvente apolar orgánico o un disolvente acuo-orgánico, las moléculas de tensoactivos pueden formar dos tipos de estructuras: las micelas inversas y las microemulsiones, ambas estructuras se representan en la Figura 3.

Las micelas inversas, como su nombre indica, están constituidas de forma inversa a las micelas, es decir, la dirección de los grupos hidrófilos e hidrófobos de las distintas moléculas que forman el agregado micelar es justamente la contraria, los grupos polares forman el núcleo hidrófilo mientras que las cadenas hidrocarbonadas se disponen hacia el exterior.

Las microemulsiones son mezclas homogéneas de agua y un compuesto orgánico apolar que se forman en presencia de grandes cantidades de un surfactante y un co-surfactante, por lo general, un alcohol de tamaño mediano que posee un grupo

alquilo de 4 a 8 carbonos. Pueden ser de dos tipos: si son dispersiones homogéneas de gotas muy pequeñas de agua en un compuesto apolar (W/O), su interior será acuoso y son similares a las micelas inversas. Pero si la dispersión es de un compuesto apolar en agua (O/W), poseen un interior muy apolar y son similares a las micelas normales.

La ventaja de las microemulsiones frente a las micelas normales es que el carácter altamente hidrofóbico de su interior es bastante adecuado para disolver moléculas hidrofóbicas a altas concentraciones e, incluso, moléculas orgánicas de gran tamaño con dimensiones que se aproximen a las de las micelas.

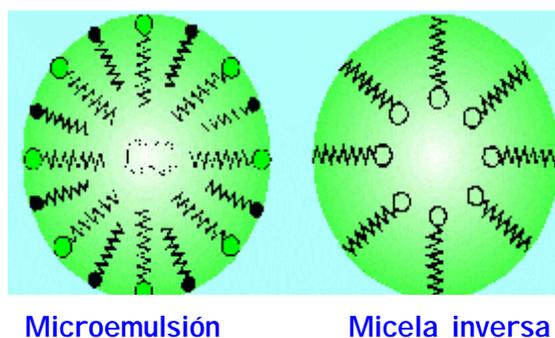


Figura VI.3.- Esquema de una micela inversa y una microemulsión.

En función de la naturaleza del grupo polar, las micelas se clasifican en aniónicas, catiónicas, no-iónicas y anfóteras. Las **aniónicas** están constituidas normalmente por sales de iones alcalinos y alcalinotérreos, de ácidos carboxílicos, sulfúrico y fosfórico, mientras que en las **catiónicas** el grupo polar es generalmente un amonio cuaternario neutralizado por un ión cloruro o bromuro. En cambio, en las **no-iónicas** los grupos polares de “cabeza” están formados usualmente por cadenas de polioxietileno o polioxopropileno.

Las micelas aniónicas son las más ampliamente utilizadas teniendo en cuenta su costo y aplicación. Las catiónicas son caras, pero su acción germicida las hace especialmente útiles para algunas aplicaciones. Por último, la ventaja que presentan las no-iónicas es que la longitud de los grupos hidrofílicos e hidrofóbicos puede variar.

En la Tabla VI.1 se resumen algunas características de los tensoactivos más comúnmente utilizados, pertenecientes a cada uno de los grupos citados.

Tabla VI.1.- Características de los surfactantes más empleados

Nombre	Abreviatura	c.m.c (M)	N ^a	r ^b (Å)	IK ^c (°C)
<i>Dodecil sulfato sódico</i>	SDS	8.1. 10 ⁻³	62	25	16
<i>Bromuro de cetiltrimetilamonio</i>	CTAB	9.2. 10 ⁻⁴	61	48	22
<i>Eter polioxietilenaúricico</i>	Brij-35	≈ 7.10 ⁻⁵	40	> 50	100

a) N° de agregación

b) Radio

c) Índice de Kraft

Actualmente, la geometría de la micela continúa siendo objeto de debate. Aunque en un principio se consideraba a la micela como una gota de fase hidrofóbica en el seno de la disolución acuosa [5], actualmente, existe discrepancia acerca del nivel de penetración del agua en la micela [6]. Así, G. L. McIntire [7] recoge las distintas teorías que se tienen al respecto, Thomas [4] propone una penetración entre dos y cuatro

átomos de carbono y Menger [8] sugiere una penetración más profunda del agua en el núcleo no polar.

Mediante medidas de fluorescencia polarizada se ha observado que el núcleo micelar se asemeja a un hidrocarburo líquido, con microviscosidades elevadas (entre 10 y 30 cP)¹ [9] y que las cadenas hidrocarbonadas presentan un orden de mayor grado que el alcano del mismo número de átomos de carbono [10].

Con distintos experimentos llevados a cabo en medios micelares, Dill y col. [11] han comparado los diversos modelos teóricos de estructura micelar, demostrando que el núcleo micelar se compone exclusivamente de segmentos de cadena hidrocarbonada distribuidos al azar, con las únicas condiciones limitantes de la continuidad de la cadena y los impedimentos estéricos. No obstante, otros modelos propuestos para la distribución radial no se ajustan a los resultados experimentales referidos [11].

Como conclusión de todas las investigaciones llevadas a cabo, el modelo actual sobre la estructura y características de las micelas se fundamenta en las predicciones de la teoría de las interfases estableciendo tres puntos básicos: existe un núcleo micelar hidrófobo prácticamente seco, rodeado de grupos polares. Las cadenas hidrocarbonadas en la micela muestran una distribución aleatoria y desordenada, siendo los condicionamientos estéricos y la simple continuidad de la cadena, los factores que determinarán la estructura micelar. Por último, debido al elevado desorden de las cadenas hidrocarbonadas, se produce una exposición o contacto importante entre las partes hidrófobas de la micela y el agua de la disolución en la interfase núcleo/superficie de la micela.

Resumiendo, se puede considerar, por tanto, a la micela como densa, desordenada y dinámica, con un núcleo seco y un considerable contacto con el agua de las cadenas hidrocarbonadas móviles en la zona superficial [11].

¹ cP: centipoises, que en el sistema internacional equivale a miliPascales por segundo (mPa s)

Los medios micelares presentan propiedades de gran interés para la Química Analítica. La más importante es su poder solubilizante sobre hidrocarburos, reactivos neutros, es decir, especies poco solubles o insolubles en fase acuosa.

La solubilización micelar es un proceso dinámico donde el soluto está en equilibrio entre la micela y la fase acuosa [1]. Una solubilización adecuada implica que el soluto se localice, estadísticamente, la mayor parte del tiempo en el interior o en la superficie micelar [4]. Surge así el concepto de “tiempos medios de residencia” del soluto en la micela. En función de la naturaleza del soluto y la micela, existirán interacciones de tipo electrostático y/o hidrofóbicas entre ambos, por lo que pueden existir distintos lugares preferentes de solubilización [12].

Un soluto poco polar se situará preferentemente en las proximidades del medio micelar, mientras que, un soluto iónico, cuya carga sea contraria a la de la micela, se fijará en la superficie de la misma. En el caso de un soluto anfifílico, se alinearán con los monómeros que forman la micela, dirigiendo su grupo más polar hacia la superficie micelar y, la parte no polar o hidrófoba, hacia el núcleo de la micela.

Como consecuencia de la existencia de estos lugares de preferente solubilización, surge la segunda propiedad importante de los medios micelares, la capacidad de la micela para concentrar o separar reactivos. También puede aislar a uno de los reactivos del otro, separándolo e impidiendo que se dé la reacción correspondiente. La solubilización selectiva de reactivos en la micela los acerca respecto a su situación en la disolución acuosa, favoreciéndose reacciones que en fase acuosa eran lentas.

Otra propiedad muy importante de las micelas es su capacidad de alterar el microentorno del soluto solubilizado, modificando parámetros tales como la constante dieléctrica, viscosidad, acidez, polaridad, etc., que cambian sustancialmente de la micela a la fase acuosa, traduciéndose en cambios de equilibrio, propiedades espectrales y reactividad del soluto solubilizado [13].

El estudio de las propiedades espectrales, absorción, fluorescencia y fosforescencia, de distintas moléculas orgánicas en medios micelares, permite obtener información muy valiosa sobre las propiedades de estos sistemas.

En general, el microentorno micelar ofrece una protección especial a los estados excitados singlete y triplete de una molécula, frente a procesos de atenuación o desactivación no radiante, observándose grandes aumentos en los rendimientos cuánticos de luminiscencia en el seno de un medio micelar [2,7]. La aplicación práctica de este fenómeno es enorme para la puesta a punto de nuevos métodos analíticos más sensibles. Resulta evidente, en este sentido, la necesidad de investigar y comprender la naturaleza de estos cambios espectrales, equilibrios y reacciones que se producen en el medio micelar, si estos conocimientos se quieren aplicar al desarrollo de nuevos métodos analíticos luminiscentes.

Otro efecto importante que influye sobre la luminiscencia es la capacidad del disolvente para formar puentes de hidrógeno solvatando, de alguna manera, a la molécula luminiscente. Dicho efecto ha de considerarse combinado con el cambio de la polaridad ya que están íntimamente relacionados.

Wolf [14] comprobó que cuando la concentración de agente micelar se incrementa por encima de la c.m.c. del mismo, se reduce drásticamente el rendimiento cuántico de fluorescencia de la acridina. Tal disminución de la intensidad de fluorescencia se puede aplicar a la determinación de las c.m.c. de los distintos agentes micelares [15]. Este autor, atribuyó la disminución de la fluorescencia y el desplazamiento hipsocrómico en el máximo de la acridina, a la solubilización de ésta en la parte polar de la micela, donde se ve dificultada la formación de enlaces de hidrógeno. Debido a la mayor hidratación de las micelas aniónicas, el analito experimenta una mayor disminución en la intensidad de fluorescencia que en agentes micelares catiónicos o no iónicos [14].

En términos generales, cuando la concentración de agente micelar es ligeramente superior a la c.m.c. (baja concentración de micelas) y la concentración de luminóforo relativamente elevada, se favorece la formación de agregados, principalmente dímeros, que pueden ser luminiscentes o no. Si la concentración de agente micelar es muy superior a la c.m.c., el reactivo se diluye en las micelas de modo que, el número de micelas doblemente ocupadas por el analito, es despreciable. Por el contrario, cuando al concentración de agente micelar se encuentra por debajo de la c.m.c. se forman pares iónicos.

Aplicaciones analíticas

Los medios micelares han sido empleados ampliamente para la obtención tanto de fluorescencia como de fosforescencia, al proporcionar a la especie fluorescente la protección necesaria de los estados excitados (singlete y triplete) de una molécula frente a procesos de desactivación no radiante o atenuación.

Al respecto, citamos dos trabajos bibliográficos de revisión, que reúnen las aplicaciones analíticas de medios micelares en luminiscencia molecular [16,17].

2.-PARTE EXPERIMENTAL

CARACTERISTICAS FLUORESCENTES DE LOS ÁCIDOS MEFENÁMICO, FLUFENÁMICO Y MECLOFENÁMICO EN DISOLUCIÓN ACUOSA

Las disoluciones de trabajo de los ácidos mefenámico, flufenámico y meclofenámico se prepararon por dilución de dichos analitos en un volumen mínimo de hidróxido sódico concentrado, diluyendo posteriormente con agua, consiguiendo un pH final de aproximadamente 10. Se prepararon muestras de 500 y 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y, a partir de éstas, otras disoluciones de trabajo más diluidas. Tanto a las disoluciones madres como a las diluidas se les hizo un estudio de estabilidad, encontrando que eran estables al menos durante un mes. Para medir la estabilidad se utilizó como señal analítica la intensidad de fluorescencia.

En primer lugar, se registraron los espectros de excitación y emisión de estos analitos en disolución acuosa de 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ a diferentes pH. De dicha experiencia se concluyó que el ácido mefenámico (MEF) no presenta señal alguna en disolución acuosa a ningún valor de pH, mientras que para el caso de los otros dos ácidos se encontró que la mayor señal se obtenía en medio ácido, siendo esta señal mucho mayor para el caso del ácido meclofenámico (MEC) que para el ácido flufenámico (FLU).

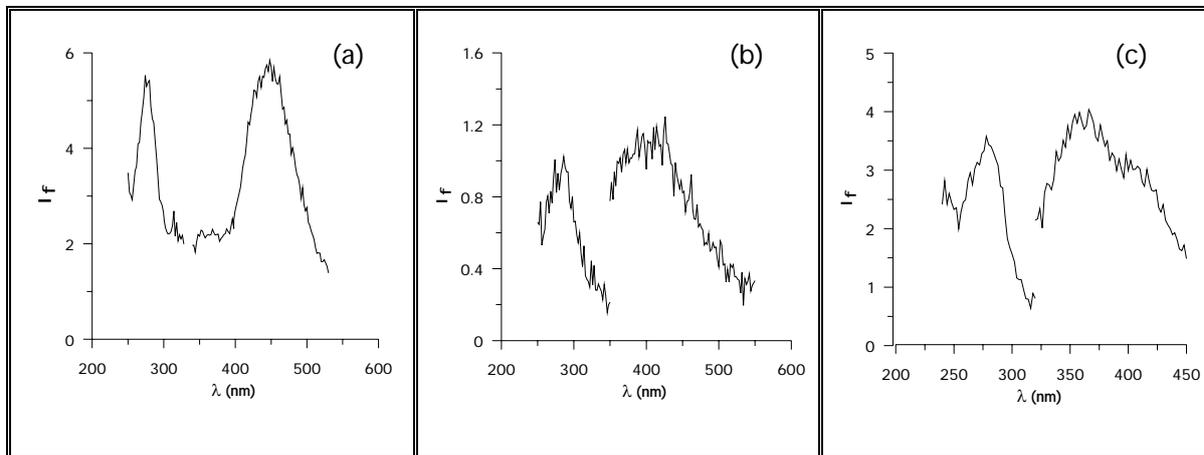


Figura VI.4.- Espectros de excitación y emisión para una disolución de 2 mg L⁻¹ de ácido flufenámico, a diferentes valores de pH, (a) 2.5, (b) 6.5 y (c) 10.0

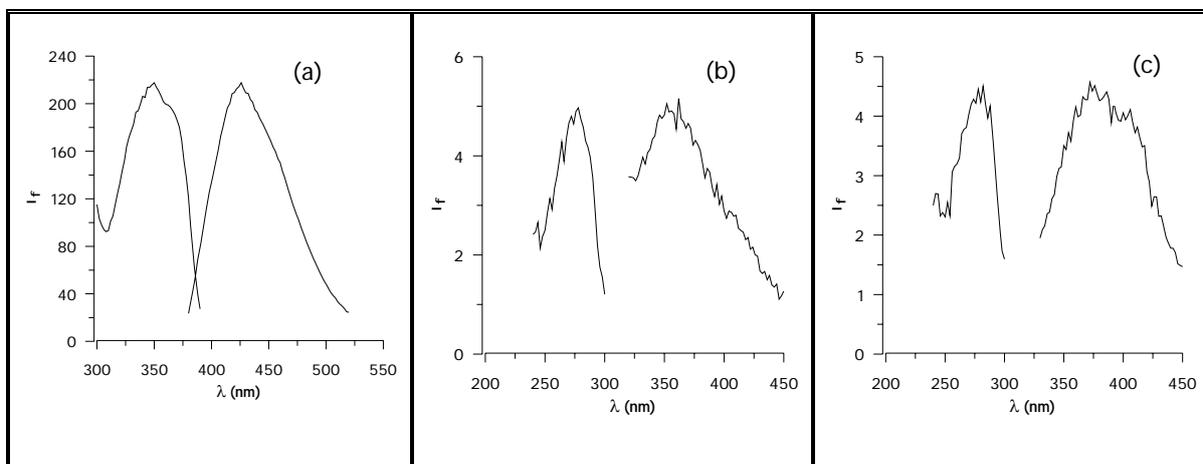


Figura VI.5.- Espectros de excitación y emisión para una disolución de 2 mg.L⁻¹ de ácido meclofenámico, a diferentes valores de pH, (a) 2.5, (b) 6.5 y (c) 10.0.

En las Figuras VI.4 como la Figura VI.5, se observa que es en medio ácido donde los analitos presentan mayor señal, siendo ésta mucho mayor para el caso del ácido meclofenámico. Para éste, al pasar de medio ácido a neutro y básico desaparece casi completamente la señal de fluorescencia. Este cambio es menos pronunciado para el caso del ácido flufenámico, que presenta menor fluorescencia. Se puede comprobar también que la variación del pH conlleva cambios espectrales, produciéndose cambios en los máximos de excitación y emisión.

CARACTERÍSTICAS FLUORESCENTES EN MEDIOS MICELARES

Con el objetivo de obtener mejores características analíticas para la determinación de FLU, MEF y MEC, se realizó un estudio del efecto de diferentes surfactantes, tanto catiónicos (HTAB), aniónicos (SDS) y no-iónicos (Triton X-100), en las características fluorescentes de las soluciones acuosas de dichos analitos. La fluorescencia relativa de cada analito, en presencia del surfactante ensayado, se corrigió teniendo en cuenta la señal producida por el propio surfactante.

En primer lugar se probó el Tritón X-100, ya que es uno de los surfactantes utilizados para el estudio de dichos analitos en diferentes trabajos encontrados en la bibliografía [18]. Los resultados obtenidos mostraron que al ácido mefenámico no le afecta la adición de dicho surfactante, mientras que para el caso de los otros dos, se produce un ligero aumento de la señal de fluorescencia en medio ácido, sin producirse cambio espectral. A la vista de los resultados, se estudió la señal producida en medio ácido por el surfactante sólo. Se observó la presencia de una señal que aumentaba al aumentar la concentración, y que solapaba con la encontrada cuando el analito está en su presencia. Por lo que se descartó el seguir haciendo estudios con dicho surfactante.

El siguiente probado fue el dodecil-sulfato-sódico (SDS). En este caso no se encontró ningún resultado favorable, para ninguno de los tres analitos probados en los medios estudiados. Se hizo un estudio de la influencia de la concentración de surfactante, no encontrando resultados satisfactorios en ninguno de los casos.

Otro estudiado fue el bromuro de hexadeciltrimetil amonio (HTAB). Los primeros resultados obtenidos mostraron como, este surfactante catiónico, no afectaba la fluorescencia del ácido mefenámico en todo el intervalo de pH evaluado. Sin embargo, en el caso de los otros dos analitos se observó la aparición de una señal en medio básico, aproximadamente a 500 nm, desplazada hacia longitudes de onda mayor que las correspondientes a estos analitos en ausencia de surfactante. Debido a estos resultados, se decidió continuar el estudio con este surfactante y con los dos analitos en los que inducía esa nueva señal.

Se preparó un blanco de reactivos, corroborándose que HTAB no produce señal de fondo.

A continuación, y antes de realizar el estudio de la determinación de los ácidos flufenámico y meclofenámico, se procede a la determinación de las constantes de acidez, tanto en ausencia como en presencia de HTAB.

DETERMINACIÓN DE LAS CONSTANTES DE ACIDEZ DE LOS ÁCIDOS MECLOFENÁMICO (MEC) Y FLUFENÁMICO (FLU)

Las constantes de acidez de los ácidos meclofenámico (MEC) y flufenámico (FLU) se determinaron utilizando dos técnicas espectroscópicas: fotometría y fluorimetría.

Calibración del electrodo de membrana de vidrio

Con el propósito de obtener relaciones directas con la concentración molar del ion hidrógeno (y no con su actividad), la calibración del electrodo se realizó a fuerza iónica constante, utilizando un electrolito soporte de concentración 0.1 M. Las disoluciones de calibración fueron HNO₃ diluido y disolución reguladora acetato-ácido acético, a las que se les agregó NaCl 1.0 M para fijar la fuerza iónica en 0.1M. En estas condiciones, el potencial del electrodo responde linealmente al logaritmo negativo de la concentración molar del ion hidrógeno. Se trabajó a 20 °C.

Valoraciones espectrofotométricas

Se estudió la modificación de la absorbancia de cada compuesto con la variación del pH. Para lograr una disolución rápida de cada compuesto se utilizó un procedimiento de retrovaloración, comenzando el experimento a pH alcalino (aproximadamente 12) y acidificando la solución de trabajo hasta pH ~ 1.8. A continuación se describe con detalle el procedimiento utilizado: se transfirió una alícuota de solución madre del correspondiente compuesto evaluado a un matraz de 25.00 ml, con objeto de lograr una concentración final de 2.00 µg ml⁻¹. Se agregaron 1 ml de NaOH 0.1 M y 2.5 ml de NaCl 1M (para ajustar la fuerza iónica a 0.1 M), y se completó con agua hasta el enrase. El contenido se transfirió cuantitativamente a un vaso de reacción, provisto de agitador magnético y termómetro. A esta solución de trabajo se le agregaron en forma sucesiva pequeñas alícuotas de HCl 0.1 N ó 0.01 N, de volúmenes entre 5.0 y 100.0 µl. Después de cada agregado se tomó una pequeña muestra del sistema (300 µl), se la transfirió a una microcubeta espectrofotométrica de cuarzo, se obtuvo el espectro de absorción y el volumen se devolvió completamente al sistema. Antes de realizar la siguiente adición de titulante se verificó la constancia en la lectura de pH. Esta operación se repitió hasta obtener aproximadamente 30 valores de pH con sus respectivos espectros, abarcando el intervalo de pH entre 1.8 y 12 unidades.

Los datos obtenidos se utilizaron para estimar los valores de constantes de desprotonación utilizando una rutina apropiada de MATLAB, basada en un procedimiento de mínimos cuadrados que usa el espectro completo [19]. Esta rutina proporciona los espectros de absorción a concentración unitaria para cada forma prototrópica del analito, los residuos del espectro completo entre los datos calculados y experimentales, así como la distribución de especies con el pH. La rutina lleva por nombre *pkfit* y las intrucciones generales para utilizar el programa se describen a continuación:

Para ejecutar la rutina *pkfit.m* se necesitan los siguientes ficheros en el directorio de trabajo:

1) Un fichero llamado "datos.txt" que contiene la información básica

```
1 50 0 0 0 0 0
1 0 0 0 0 0 1
1 0 0 -1 2 1 1
1 0 0 -2 4 1 1
0 1 0 0 0 0 1
0 0 1 0 0 0 0
1 1 0 0 5 1 1
0 0 0 0 0 0 0
```

La primera fila contiene la primera y última longitudes de onda (los números de las posiciones de la primera y de la última longitud de onda en el fichero de datos), seleccionadas del rango espectral total, el resto de número son ceros.

Si se quiere trabajar con una sola longitud de onda, la primera fila sería de la siguiente manera:

```
25 0 0 0 0 0 0
```

que significa que estaríamos trabajando solo con el dato correspondiente a la longitud de onda que ocupa el lugar número 25 de los datos adquiridos.

La rutina está pensada para calcular constantes de formación de complejos, siendo el cálculo del pK un caso particular de la rutina más general. Así, las otras filas contienen la siguiente información (por cada una de las especies):

1ª columna.- Coeficiente estequiométrico del ligando (L)

2ª columna.- Coeficiente del metal M (si forma complejo)

3ª columna.- Coeficiente de X (componente extra, si es que existe y forma complejo con M)

4ª columna.- Coeficiente H (el valor negativo del coeficiente indica un protón menos que la especie de referencia)

5ª columna.- Valores iniciales de los pk's (valores acumulativos)

6ª columna.- Indica si el valor de pk es refinado (1) o no (0)

7ª columna.- Indica si el espectro es refinado (1) o no (0), o si la especie es no-absorbente (2)

La última fila contiene ceros si hay especies no absorbentes. De otra manera, esta fila no aparecería.

Cada fila indica la presencia de las especies presentes en la mezcla. En el ejemplo anterior:

La segunda fila es la especie de referencia del ligando L. Inicialmente L tiene un valor de $pK=0$ y este valor no está refinado.

La tercera y cuarta filas corresponden a la desprotonación de L y a la doble desprotonación de L, respectivamente. Los valores iniciales de pk's de L(-H) y L (-2H) son 2 y 4 respectivamente y estos valores están refinados. Los valores de pk son acumulativos.

La quinta fila indica el metal (M), de nuevo con $pK=0$ y valor no refinado

La sexta fila indica la presencia de X, de $pK=0$ y no refinado

La séptima fila indica el complejo ML, con un $pK = 5$ y refinado

La última fila indica la presencia de especies no-absorbentes

Esto sería para el caso más completo, pero puede simplificarse bastante. Por ejemplo, para nuestro caso, en el que sólo tenemos una especie que pierde un solo protón, por lo cual el fichero "datos.txt" quedaría reducido de la siguiente manera:

```
1 50 0 0 0
1 0 0 0 1
1 -1 2 1 1
```

2) Un fichero llamado "espectros.txt" conteniendo los espectros de las I experiencias a las J longitudes de onda (matrix JxI).

3) Un fichero llamado "pHs.txt" conteniendo las siguientes columnas:

1^a.- Valores de pH de la experiencia

2^a.- Volúmenes de la experiencia

3^a.- Micromoles de L

4) Un fichero llamado "qm.txt", conteniendo el número de muestras excluidas para el refinado, estos números aparecen separados por espacios en blanco. Si se utilizan todas las muestras este fichero no contendrá ningún número.

El refinado de pKs y espectros se hace de dos formas diferentes:

Los pKs se van refinando por una regresión no lineal de mínimos cuadrados por el método de Gauss-Newton. En este método, se parte de una aproximación inicial a las constantes (que se incluyen entre los datos suministrados al programa), y se van refinando todas de forma simultánea, siguiendo una ley que depende de las derivadas parciales de la función objetivo, respecto de las constantes a ajustar. La función objetivo en este caso es la suma de los cuadrados de las diferencias entre todas las absorbancias (o fluorescencias) experimentales y calculadas por el programa.

Hay una expresión que relaciona los valores de constantes a refinar en un cierto ciclo de cálculo, los valores en el ciclo anterior y las derivadas de la función objetivo. La expresión modifica los valores en la dirección del mínimo en la función objetivo. Cuando se llega muy cerca del mínimo, las derivadas se hacen muy pequeñas, y los valores de constantes a refinar dejan de cambiar, dentro de una tolerancia especificada. En cuanto a los espectros, no se refinan mediante este método, que sería muy complicado por la enorme cantidad de valores a refinar. Los espectros de las distintas especies se estiman inicialmente a partir de las absorbancias experimentales y las concentraciones de todas las especies, estimadas a su vez a partir de las constantes iniciales suministradas al programa. En cada ciclo, el programa modifica las constantes y, por lo tanto, las concentraciones de todas las especies. Con esta información, cambia en cada ciclo los espectros. Tanto al principio como en los restantes ciclos, los espectros se calculan mediante la ecuación:

$$S = A C (C^T C)^{-1}$$

donde A tiene las absorbancias experimentales y C las concentraciones. En realidad, la ecuación anterior es una solución de mínimos cuadrados, pero 'interna', es decir, en el contexto de las concentraciones calculadas en ese ciclo y con esas constantes.

2) Funcionamiento general del programa:

Tomamos como ejemplo el caso de un único componente del sistema, y la determinación de los pKa de equilibrio entre sus distintas formas.

Lo primero que hace el programa es tomar los valores estimados iniciales de las constantes a ajustar, que están en el archivo 'datos.txt'. Estos valores forman un vector que, dentro de la rutina, se llama x0. Por ejemplo, si se quieren ajustar dos constantes de acidez, cuyos valores estimados iniciales son 4 y 13; el vector x0 tendrá dos únicos elementos 4 y 13.

Con estos valores iniciales, los datos de los espectros, pHs, volúmenes y micromoles de componente (estos dos últimos valores se usan para calcular la concentración molar analítica total en cada punto de la titulación), el programa llama a una rutina auxiliar que se llama 'minimpkter.m'. La línea clave del programa pKfit es una que tiene esta orden:

```
[x,res,Ja]=nlinfit(pH1(:),a(:),'minimpkter',x0);
```

Con esta orden, Matlab llama a la sub-rutina (ya existente en el entorno de Matlab) 'nlinfit', cuyo nombre deriva de *non-linear fitting*, y sirve para ajustar funciones no-lineales con número variable de parámetros. La sub-rutina nlinfit necesita varios datos para funcionar, que están entre paréntesis:

- 1) pH1(:), que contiene los valores de pH, repetidos tantas veces como sensores (longitudes de onda) se han utilizado para recoger los espectros. Este vector pH1 contiene entonces J×I números (J = número de sensores, I = número de pHs), ordenados en un único vector.
- 2) a(:), que contiene los valores de experimentales de absorbancia para todos los sensores y todos los experimentos, pero desdoblados en un único vector, es decir contiene también J×I números.
- 3) 'minimpkter', que es una sub-rutina que calcula, con los valores de pH, y los valores estimados de constantes que están en x0, los nuevos valores de absorbancia, que luego se compararán con los experimentales para realizar el ajuste.
- 4) x0, que tiene los valores estimados iniciales de las constantes, como ya vimos.

La rutina `nlinfit` va cambiando los valores de x , hasta que se minimiza la suma de los cuadrados de las diferencias entre valores calculados y experimentales de absorbancias, a todas las longitudes de onda y para todos los valores de pH. Es decir, que trabaja por minimización de mínimos cuadrados, y según informa el propio Matlab, ajusta los valores de x con un método de Gauss-Newton.

Las variables que están entre corchetes en la orden citada son las que devuelve la sub-rutina `nlinfit`:

- 1) x , que contiene los valores ajustados finales de las constantes.
- 2) res , que contiene los residuos del ajuste
- 3) Ja , que contiene el Jacobiano del ajuste, y que sirve después para estimar los errores estándar en las constantes.

Un detalle importante es cómo funciona la sub-rutina '`minimpkter`', que es la que devuelve las absorbancias calculadas a partir de los valores de x y los pHs. Para hacer este cálculo la sub-rutina necesita dos elementos:

- 1) La distribución de especies a cada pH, o sea, las concentraciones de cada especie protonada o desprotonada a cada pH. Esto lo hace a partir de los valores de pH que recibe, y de los valores de constantes (contenidos en el vector x) en cada ciclo de ajuste. En el caso de un solo componente esto es relativamente sencillo (a menos que haya procesos de dimerización o polimerización del analito); en casos más complejos (por ejemplo interacciones binarias entre un ligando y un metal, o para complejos ternarios), se requiere una rutina especial basada en el método de Newton-Raphson. Esta sub-rutina es la '`cocenpkter.m`' que acompaña la rutina principal, y que se encarga de calcular las concentraciones. En la práctica, aunque no sea lo más sencillo, calcula las concentraciones por Newton-Raphson, aún en los casos de un solo componente.

- 2) Las absorptividades de cada especie a concentración unitaria en cada ciclo. Estos valores, que no se requieren inicialmente por la rutina, se calculan a cada paso a partir de la ecuación:

$$\mathbf{A} = \mathbf{S} \mathbf{C}^T + \mathbf{E}$$

donde \mathbf{A} es la matriz experimental de absorbancias (de $J \times I$), \mathbf{S} la matriz de las absorptividades (de $J \times N$, donde N es el número total de componentes, esto incluye las distintas especies del analito), \mathbf{C} es la matriz de concentraciones de las especies (de $I \times N$) y \mathbf{E} una matriz de error. Como la matriz \mathbf{C} se calcula (ver punto anterior) en cada ciclo, se puede estimar \mathbf{S} así:

$$\mathbf{S} = \mathbf{A} \mathbf{C} (\mathbf{C}^T \mathbf{C})^{-1}$$

donde \mathbf{S} es la matriz que se requiere para estimar las absorbancias.

Un resumen de pkfit sería como sigue:

- 1) Toma pHs y constantes iniciales (de x_0).
- 2) Llama a nlinfit para que ajuste x a los valores de absorbancia
- 3) Nlinfit llama a minimpkter para que estime las absorbancias
- 4) Minimpkter llama a concenpkter que calcula las concentraciones de las especies a cada pH
- 5) Minimpkter calcula las absorbancias con las concentraciones y las absorptividades
- 6) Nlinfit recibe las absorbancias, las compara con las experimentales, y cambia x .
- 7) Nlinfit llama nuevamente a minimpkter, volviendo al punto 3)
- 8) El ciclo se repite hasta minimizar la diferencia entre absorbancias calculadas y experimentales.

Una vez completado el ciclo y estimadas las constantes (contenidas en x), se estiman los errores estándar en las constantes, a través de estas dos líneas:

```
sfit=std(res);  
std=sfit*sqrt(diag(inv(Ja'*Ja)));
```

La primera estima la desviación estándar de la regresión (std significa standard deviation). La segunda calcula los valores de error en los parámetros ajustados a partir de sfit y del Jacobiano.

Los resultados obtenidos mediante la rutina `pkfit`, para las valoraciones espectrofotométricas en ausencia de HTAB para los ácidos meclofenámico y flufenámico, se recogen en las Figuras VI.6 y VI.7. El valor de p_k calculado se muestra en la pantalla del entorno de trabajo de MATLAB. Se pueden observar los espectros bidimensionales, tanto de los datos experimentales como refinados, así como los errores. También se observan las superficies absorción-longitud de onda-pH de MEC y FLU, tanto de los datos experimentales como los refinados, así como de los errores encontrados. Por último, se obtiene la distribución de las especies así como el valor de p_k calculado.

Capítulo VI.- Determinación de los ácidos meclofenámico y flufenámico utilizando medios micelares y calibración multivariante de segundo orden

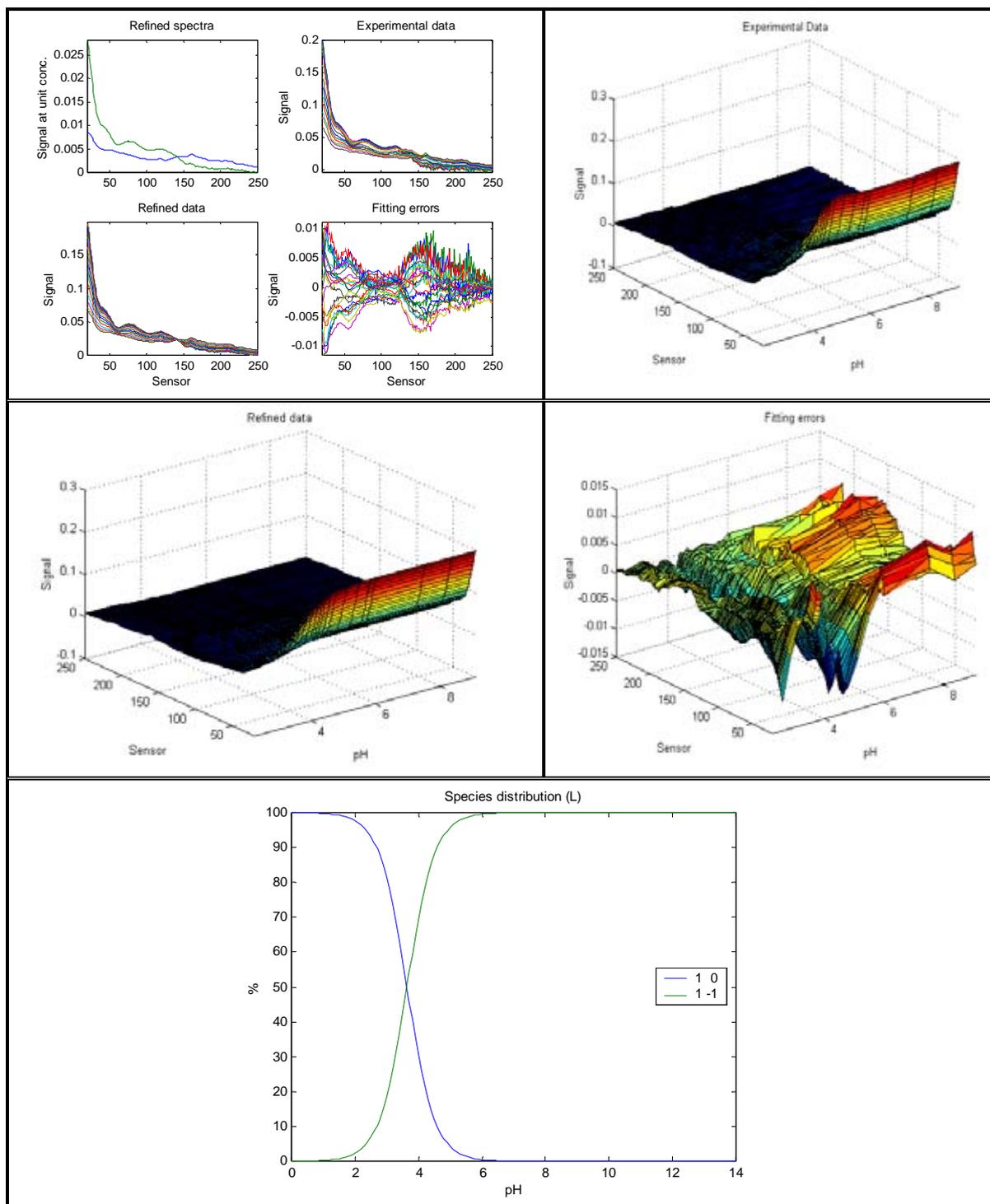


Figura VI.6.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de absorbancias experimentales, refinadas y errores de MEC en ausencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de MEC se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{MEC} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

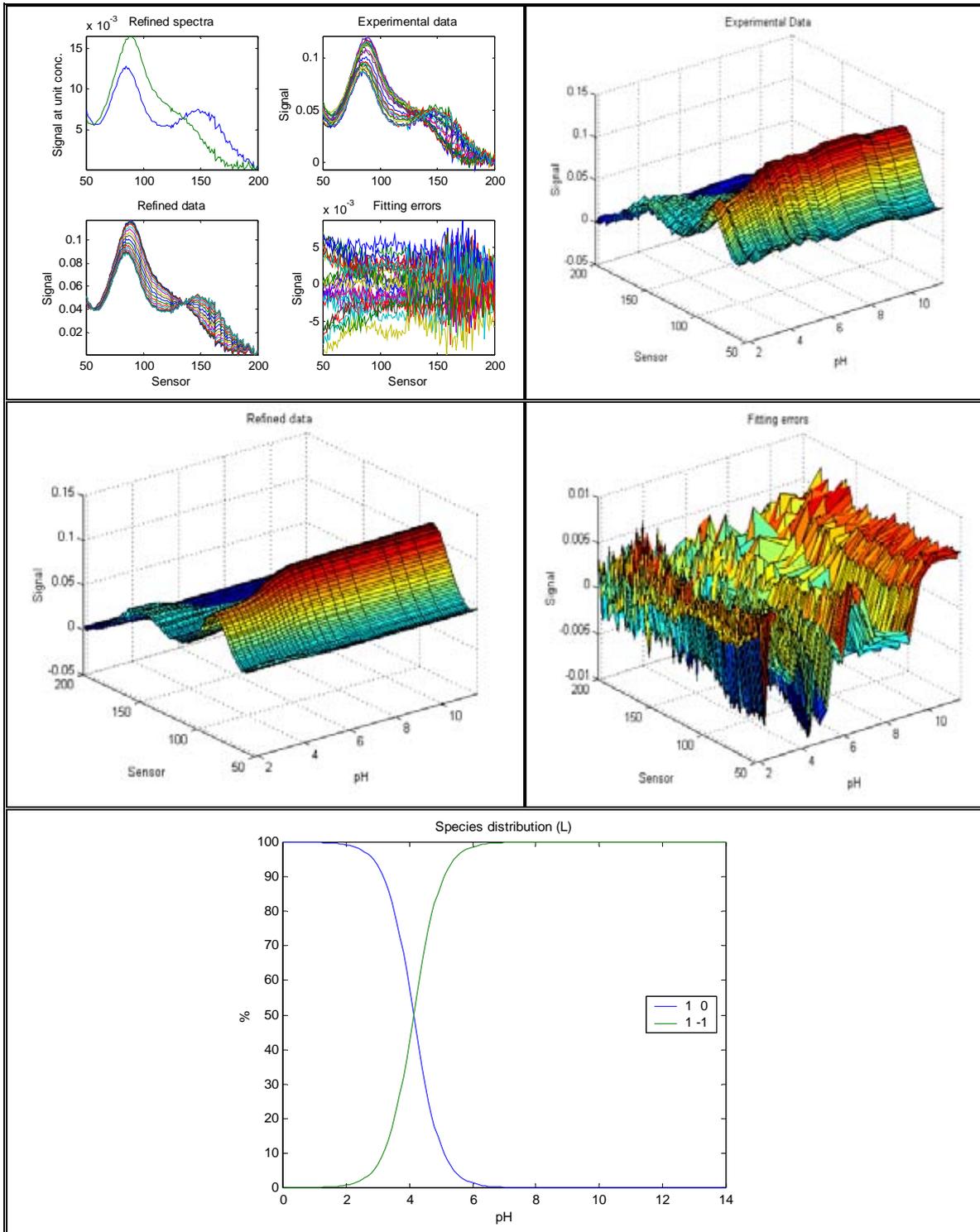


Figura VI.7.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de absorbancias experimentales, refinadas y errores de FLU en ausencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de FLU se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{FLU} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Valoraciones espectrofotométricas en presencia de HTAB

La presencia de micelas puede modificar las propiedades protolíticas de un compuesto. Para evaluar este fenómeno, se diseñó un experimento similar al anterior en las mismas condiciones operatorias pero adicionando a la solución a valorar HTAB hasta alcanzar una concentración 1.8×10^{-4} M.

Las gráficas obtenidas mediante la rutina pkfit, para las valoraciones espectrofotométricas en presencia de HTAB, para el ácido meclofenámico se recogen en las siguientes figuras;

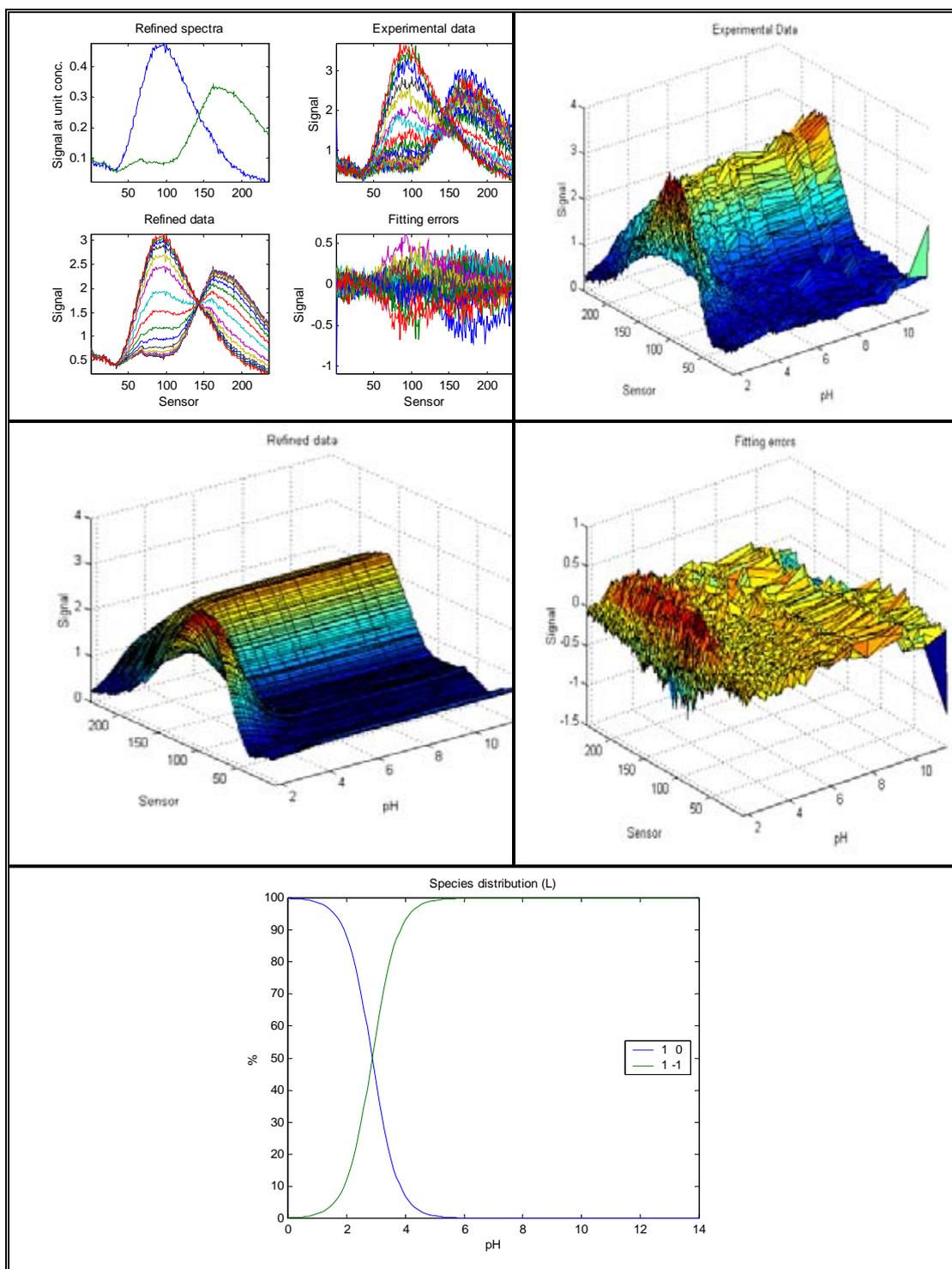


Figura VI.8.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de absorbancias experimentales, refinadas y errores de FLU en presencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de FLU se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{FLU} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Capítulo VI.- *Determinación de los ácidos meclofenámico y flufenámico utilizando medios micelares y calibración multivariante de segundo orden*

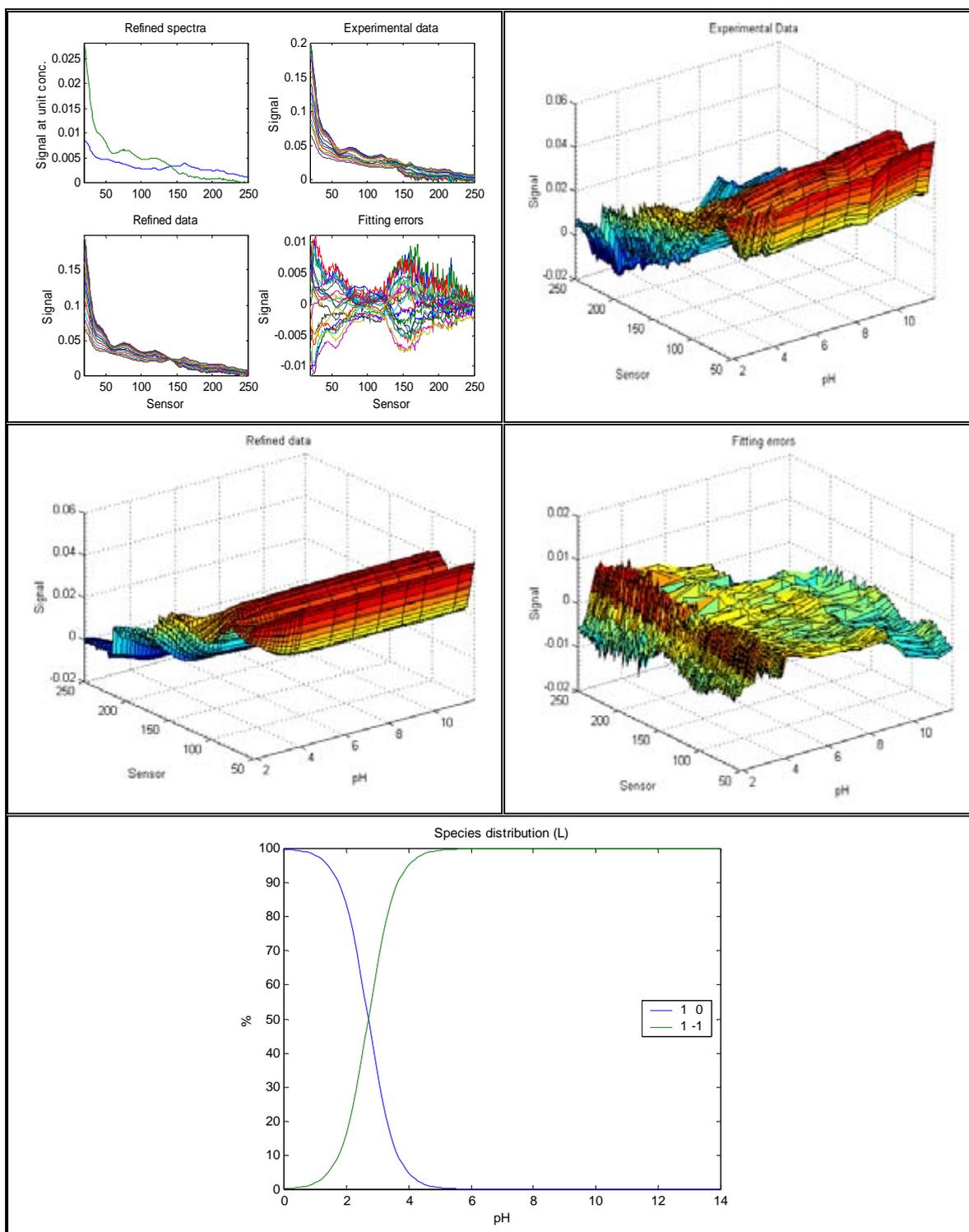


Figura VI.9.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de absorbancias experimentales, refinadas y errores de MEC en presencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de MEC se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{MEC} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Valoraciones espectrofluorimétricas

Siguiendo un procedimiento análogo al descrito anteriormente, se estudió la variación de la intensidad de emisión fluorescente de cada compuesto con el pH. Con este propósito, 25.00 ml de solución de MEC (o FLU) de concentración $2.00 \mu\text{g ml}^{-1}$, fuerza iónica 0.1 M (NaCl) y pH cercano a 12 se trataron con HCl. Después de cada adición de ácido se extrajeron alícuotas de 2 ml de solución, que fueron transferidas a una cubeta de cuarzo para medidas espectrofluorimétricas y, una vez registrado el espectro de emisión, se devolvieron a la solución de trabajo. Esta operación se repitió hasta obtener alrededor de 30 puntos experimentales en el intervalo 1.8 a 12 unidades de pH. Los valores registrados se procesaron con la rutina de MATLAB.

Las gráficas obtenidas mediante la rutina pkfit, para las valoraciones espectrofluorimétricas en ausencia de HTAB, para el MEC y FLU, se recogen en las siguientes figuras:

Capítulo VI.- *Determinación de los ácidos meclofenámico y flufenámico utilizando medios micelares y calibración multivariante de segundo orden*

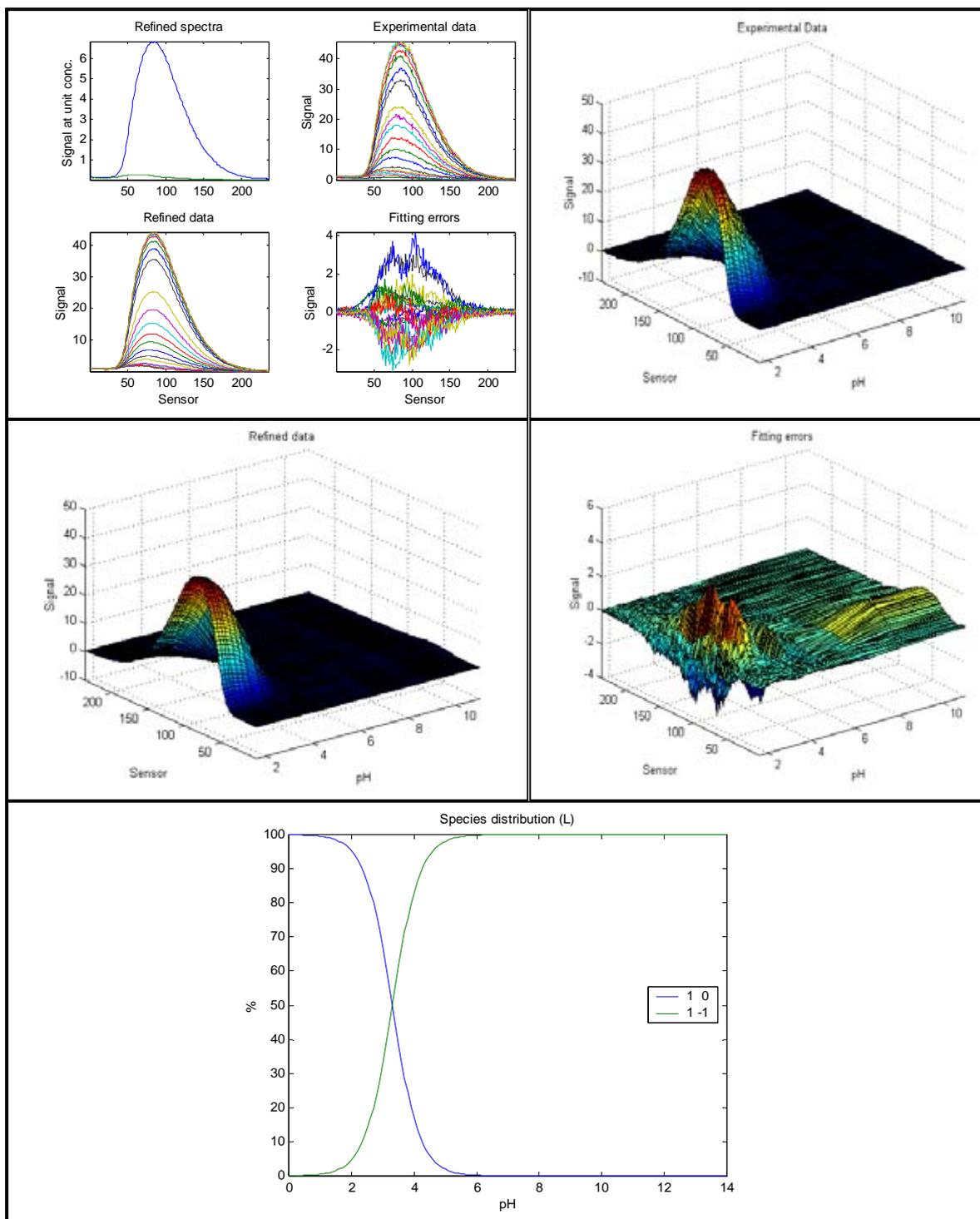


Figura VI.10.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de señal de fluorescencia experimentales, refinadas y errores de MEC en ausencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de MEC se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{MEC} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

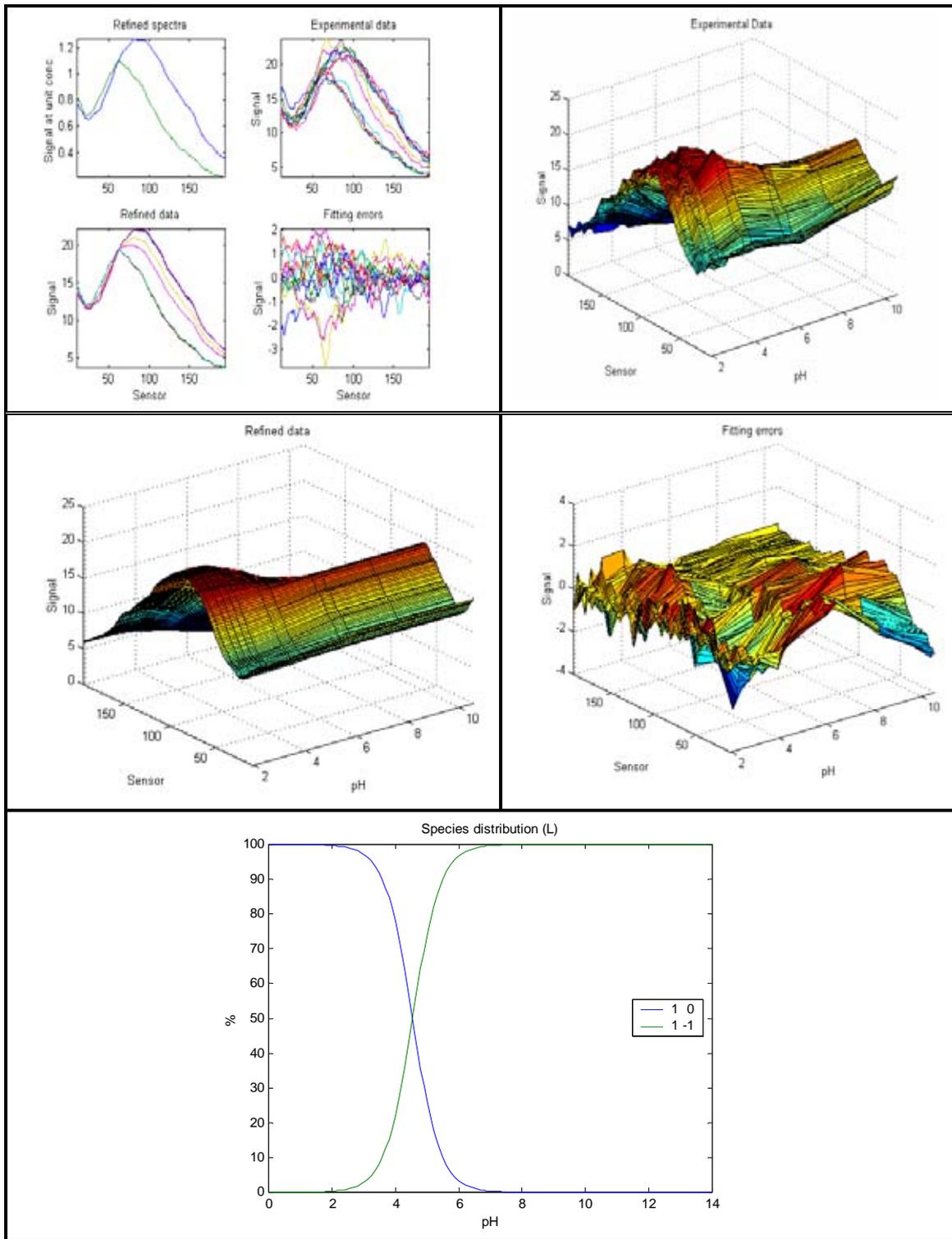


Figura VI.11.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de señales de fluorescencia experimentales, refinadas y errores de FLU en ausencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de FLU se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{FLU} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Valoraciones espectrofluorimétricas en presencia de HTAB

El análisis de la influencia de la presencia de HTAB en los espectros de emisión a diferentes pHs se realizó de manera similar, utilizando una disolución preparada como se indicó anteriormente, a la que se le adicionó la cantidad suficiente de surfactante para alcanzar una concentración 1.8×10^{-4} M.

Las gráficas obtenidas mediante la rutina pkfit, para las valoraciones espectrofluorimétricas en presencia de HTAB, para el MEC y FLU se recogen en las siguientes figuras:

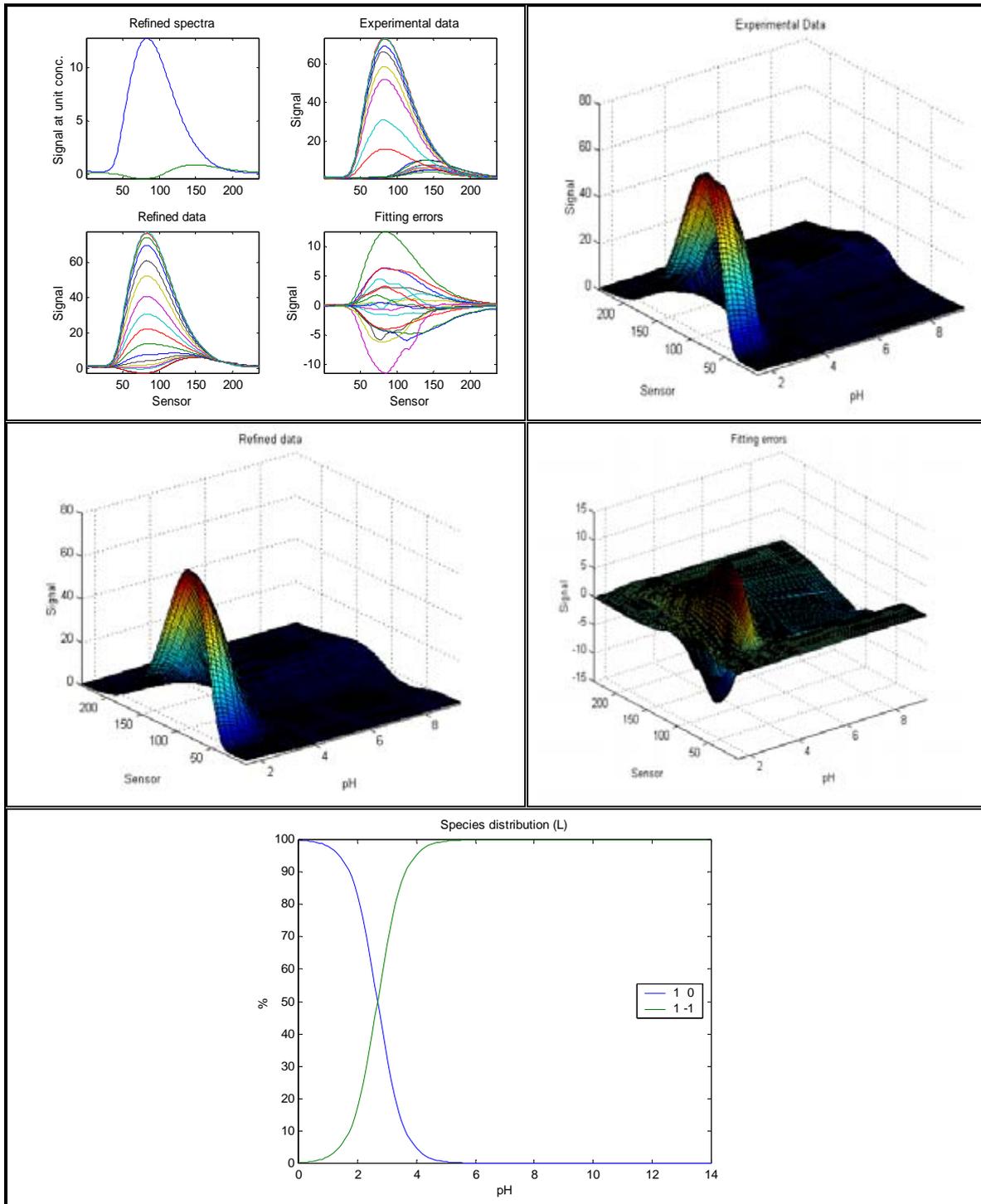


Figura VI.12.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de señales de fluorescencia experimentales, refinadas y errores de MEC en presencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH, Las formas protonada y desprotonada de MEC se han designado como HL y L⁻, respectivamente. $C_{MEC} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Capítulo VI.- *Determinación de los ácidos meclofenámico y flufenámico utilizando medios micelares y calibración multivariante de segundo orden*

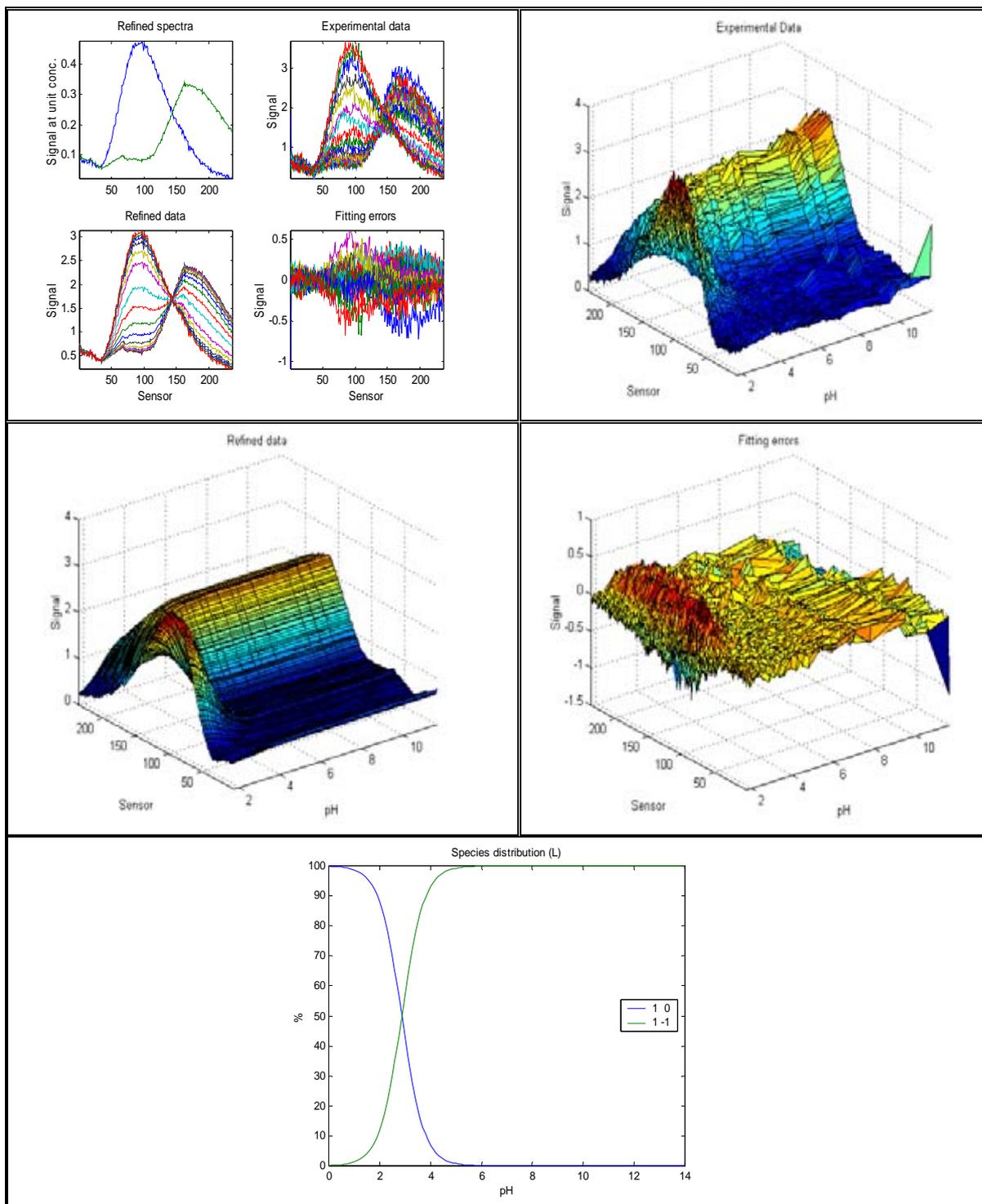


Figura VI.13.- Gráficos bidimensionales y tridimensionales de señal de fluorescencia experimentales, refinadas y errores de FLU en presencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda. Distribución de especies en función del pH. Las formas protonada y desprotonada de FLU se han designado como HL y L respectivamente. $C_{FLU} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los ácidos estudiados poseen en su estructura un grupo ionizable. Mientras que las medidas espectrofotométricas permiten la determinación de la constante de ionización de dicho grupo en estado fundamental, la espectroscopía de fluorescencia permitiría, en principio, el estudio del intercambio protónico en estado excitado o en estado fundamental, dependiendo de las velocidades relativas de fluorescencia y de intercambio protónico en estado excitado. Un análisis completo requiere del conocimiento de los tiempos de vida del ácido y la base conjugada en el estado excitado, de las constantes de velocidad de desprotonación y protonación, y de las concentraciones relativas de ambas especies en solución [20]. Sin embargo, como veremos a continuación, a partir de los valores de constantes de acidez calculados por uno y otro método, se puede concluir acerca de la constante (en estado fundamental o excitado) que se está evaluando.

Determinación de las constantes de ionización de MEC y FLU

➤ *Estudios espectrofotométricos*

La Figura VI.14 A presenta los espectros de absorción de MEC disuelto en agua a distintos valores de pH. La concentración de MEC utilizada en este experimento es relativamente baja, debido a que concentraciones mayores producen la insolubilidad del compuesto a pHs inferiores a 3. En esta Figura se aprecia que a pH ácido y en la zona del ultravioleta aparecen varias bandas superpuestas y poco definidas. A pH alcalino aumenta la absorción por debajo de 350 nm, haciéndose poco significativa la absorción a longitudes de onda más largas. La presencia de un punto isobéptico, aproximadamente a 330 nm, indicaría la presencia de dos especies absorbentes en equilibrio (las formas protonada y desprotonada de MEC).

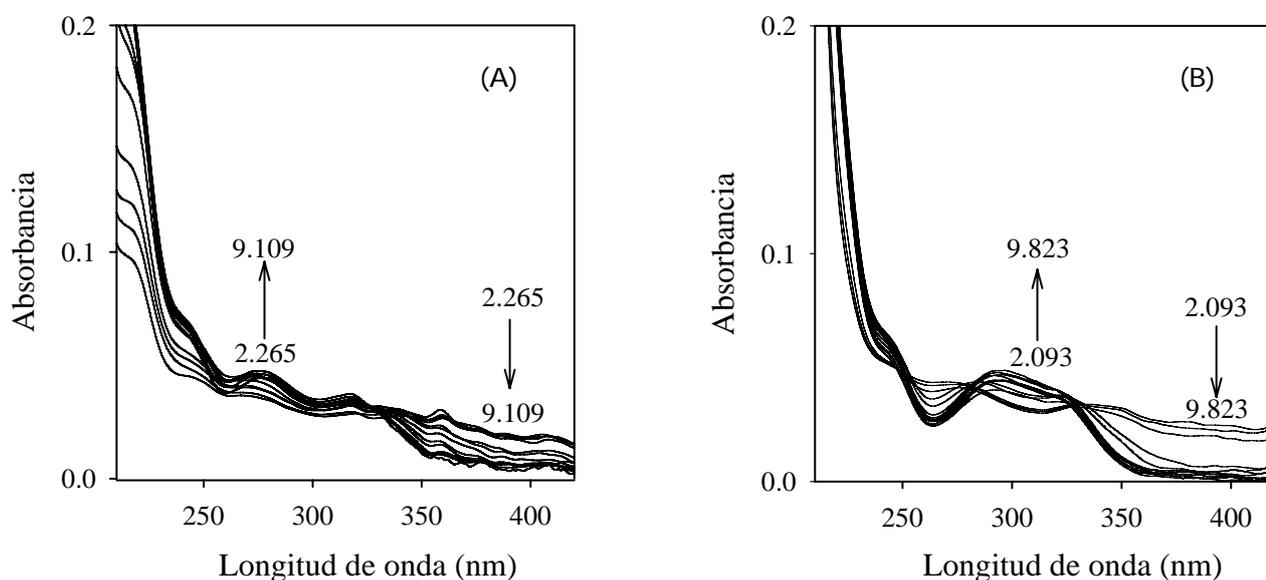


Figura VI.14.- Espectros de absorción en función del pH de MEC en ausencia (pH 2.26-9.10) (A) y en presencia (pH 2.09-9.82) (B) de HTAB. C_{MEC} inicial = $2 \mu\text{g ml}^{-1}$, C_{HTAB} inicial = $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

Como ya vimos, las micelas de naturaleza iónica pueden afectar las propiedades ácido-base de un analito, dado que se produce una estabilización de la especie cargada del compuesto por interacción con la micela de carga opuesta. Esta estabilización dependerá de la carga de la especie que interviene en el equilibrio prototrópico y del tipo de micela (catiónica o aniónica) usada [21].

A partir de las valoraciones espectrofotométricas de MEC en presencia de HTAB se puede calcular la constante de acidez condicional en este medio. Se debe notar que este experimento se desarrolló a una concentración de surfactante que aseguró su micelación en todo el intervalo de pH evaluado.

En la Figura VI.14B se muestran los espectros de absorción de MEC en presencia de HTAB y a diferentes valores de pH. Mientras que en medio ácido los espectros son similares a los del ácido en ausencia de surfactante, se observan diferencias al aumentar el pH. Esta diferenciación del espectro de absorción en medio micelar puede atribuirse a la interacción entre el anión carboxilato formado y el surfactante apareciendo una ancha banda de absorción en la región 260–350 nm.

A partir de las superficies absorción–longitud de onda–pH de MEC, en ausencia y presencia de HTAB, se calcularon las correspondientes constantes de acidez, que se muestran en la Tabla VI.2. El valor de la constante de acidez de MEC ($pK_a = 3.64$) es similar al que se encuentra en la literatura ($pK_a = 3.76$, [19]).

Tabla VI.2: Constantes de acidez condicionales (pK_a 's)

Método	FLU	MEC	FLU + HTAB	MEC + HTAB
Fotometría	4.17	3.64	2.81	2.70
Fluorescencia	4.5	3.31	2.77	2.71

$$C_{\text{HTAB}} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Si se comparan las constantes de desprotonación de MEC en presencia y ausencia de surfactante, se concluye que la constante es significativamente menor en el sistema micelar. La presencia de surfactante catiónico promueve la desprotonación del grupo carboxilo del MEC, con la consiguiente formación de un par iónico entre la estructura aniónica de MEC y la catiónica del surfactante.

La Figura VI.15A muestra los espectros de absorción de FLU. La forma protonada de este ácido muestra dos bandas de absorción centradas a 280 y 350 nm. Al aumentar el pH la banda a 280 nm se desplaza a 300 nm, mientras que la correspondiente a 350 nm disminuye considerablemente. Se observa un punto isobéptico a 340 nm, en coherencia con la existencia de un equilibrio entre las formas protonada y deprotonada del grupo carboxilo de la molécula en estado fundamental.

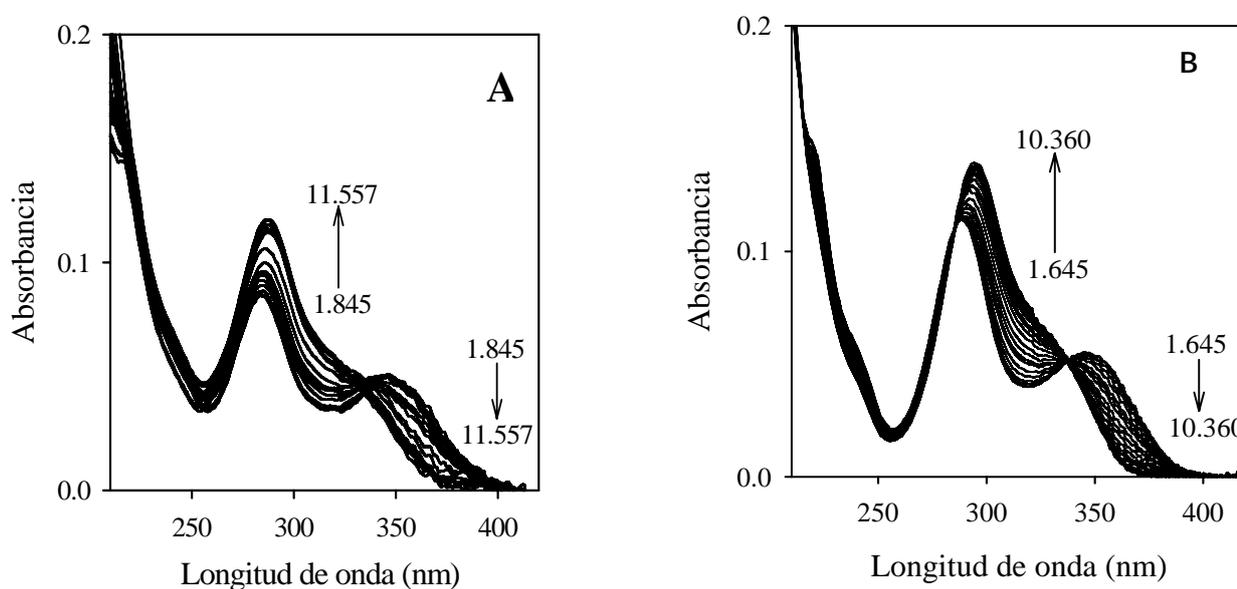


Figura VI.15.- Espectros de absorción en función del pH de FLU en ausencia (pH 1.84-11.55) (A) y en presencia (pH 1.64-10.36) (B) de HTAB. C_{FLU} inicial = $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, C_{HTAB} inicial = $1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

En la Figura VI.15B están representados los espectros de absorción de FLU en presencia de HTAB a diferentes valores de pH. Se observa que, si bien las formas de los espectros de FLU no se modifican significativamente en el medio micelar estudiado, el cambio de los espectros con el pH ocurre a distintos valores, obteniéndose un valor de constante de acidez más bajo (Tabla VI.2), como en el caso ya discutido del ácido

meclofenámico. El valor de $pK_a = 4.17$ hallado para FLU sólo es ligeramente más alto al valor encontrado en la bibliografía ($pK_a = 3.84$, [20]). Como ejemplo, la Figura VI.16 muestra los resultados espectrofotométricos correspondientes al sistema FLU–HTAB.

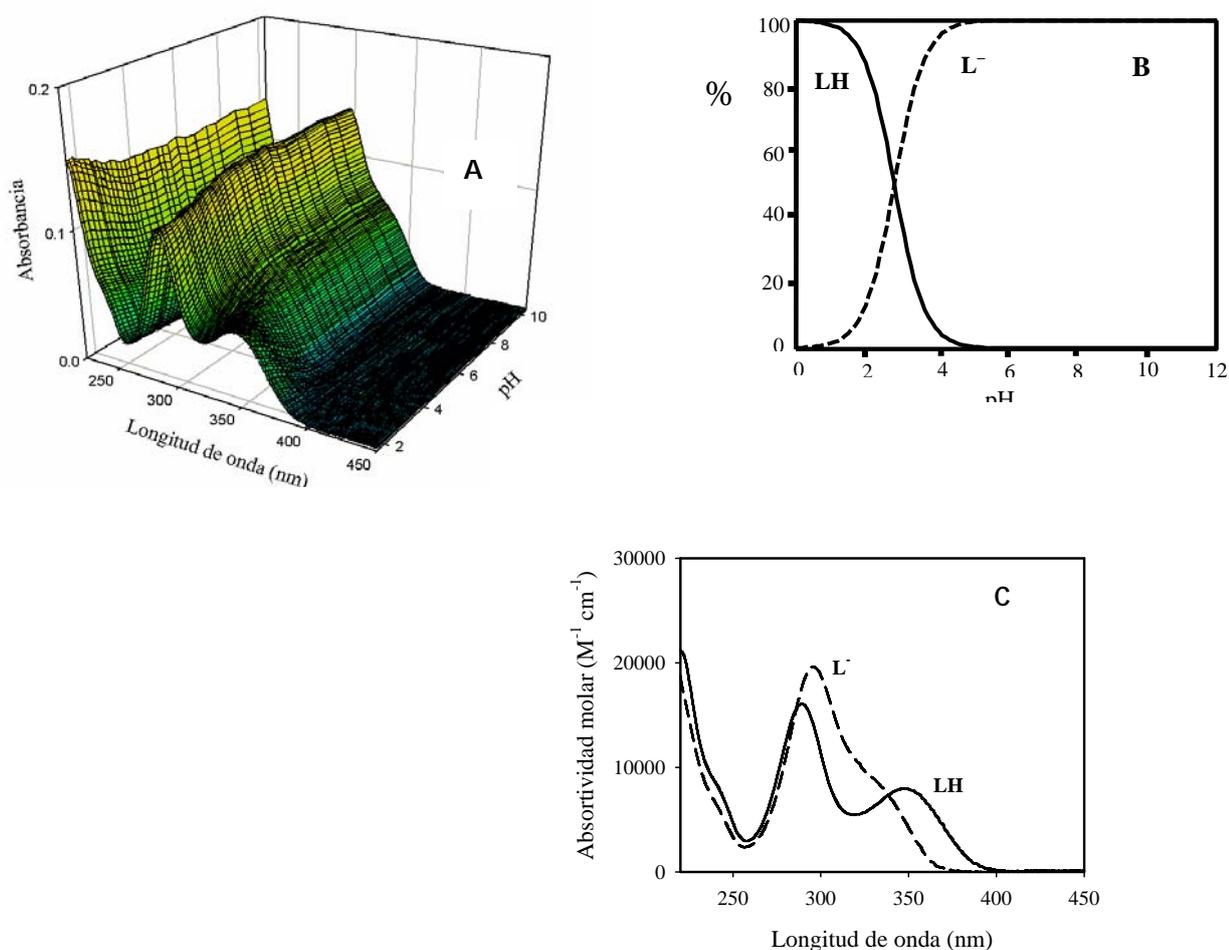


Figura VI.16.- A) Gráfico tridimensional de absorbancias experimentales de FLU en presencia de HTAB, en función del pH y de la longitud de onda, B) Distribución de especies en función del pH, C) Absortividades molares calculadas. Las formas protonada y desprotonada de FLU se han designado como LH y L^- respectivamente. $C_{FLU} = 2 \mu g mL^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} M$.

➤ *Estudios espectrofluorimétricos*

Las propiedades ácido-base de MEC y FLU también se evaluaron a partir de medidas fluorescentes. En la Figura VI.17A se representan los espectros de emisión de fluorescencia de MEC, a diferentes valores de pH. En esta gráfica puede observarse una banda de emisión fluorescente centrada a 430 nm, cuya intensidad disminuye conforme aumenta el pH. Estos espectros se utilizaron para determinar la constante de acidez de MEC (Tabla VI.2), que presenta un valor similar al calculado a partir de datos espectrofotométricos. De acuerdo a este resultado, se puede decir que, para la molécula de MEC, la velocidad de intercambio protónico en el estado excitado es menor que la velocidad de relajación fluorescente. Por lo tanto, a pesar de emplear medidas de fluorescencia, se determina es la constante en el estado fundamental, y no la constante en el estado excitado.

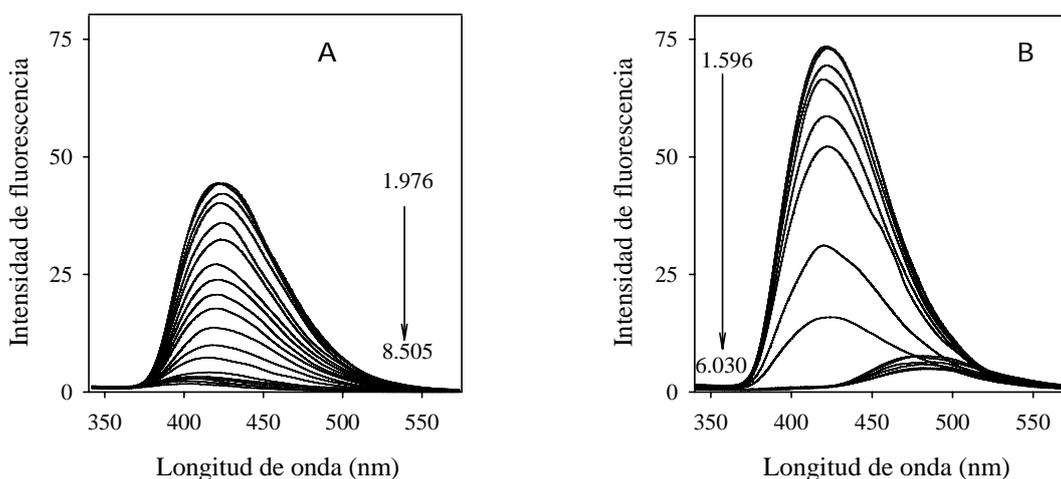


Figura VI.17.- *Espectros de emisión fluorescente en función del pH de MEC en ausencia (pH 1.97-8.50) (A) y en presencia (pH 1.59-6.03) (B) de HTAB.*

$$C_{MEC} \text{ inicial} = 2 \mu\text{g mL}^{-1}, \quad C_{HTAB} \text{ inicial} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M.}$$

Al estudiar el comportamiento ácido-base en presencia de HTAB (Figura VI.17B), se observan bandas de emisión más intensas en medio ácido y la presencia de una nueva a 480 nm, al aumentar el pH. Esta banda, que se desplaza a longitudes de onda mayores que la correspondiente al sistema no-micelar, podría permitir la determinación del compuesto en presencia de interferentes. El valor de la constante de acidez de MEC en medio micelar medido espectrofluorimétricamente es, como era de esperar, menor que el obtenido en su ausencia, pero similar al calculado por medidas fotométricas, lo que indica que la formación del sistema MEC-HTAB no modifica la velocidad intrínseca del intercambio protónico en el estado excitado, ni la velocidad de relajación por fluorescencia.

La Figura VI.18A muestra los espectros de fluorescencia de FLU a distintos valores de pH. En medio ácido se puede observar la presencia de una banda de baja intensidad a 440 nm, cuya intensidad disminuye al aumentar el pH. La intensidad de la banda a pH ácido aumenta significativamente (aproximadamente un 100 %) en presencia de HTAB (Figura VI.18B). En medios menos ácidos esta banda disminuye su intensidad y se observa la aparición de otra a 510 nm, de gran utilidad para la posterior cuantificación de FLU por un método fluorescente. Los valores de constantes de acidez de FLU en ausencia y presencia de HTAB por medidas fluorescentes (Tabla VI.2) indican un comportamiento similar al hallado para MEC, es decir, a través de medidas espectrofluorimétricas se obtienen también las constantes en estado fundamental.

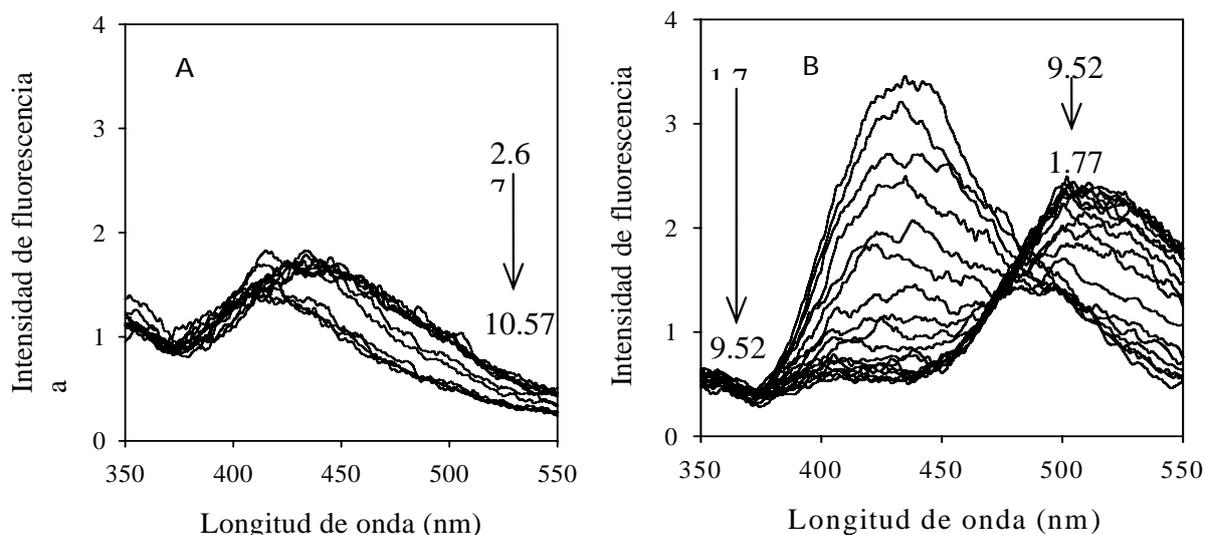


Figura VI.18.- Espectros de emisión fluorescente en función del pH de FLU en ausencia (pH 2,60-10,57) (A) y en presencia (1,77- 9,52) (B) de HTAB. C_{FLU} inicial = $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, C_{HTAB} inicial = $1.8 \times 10^{-4} M$.

ESTUDIO DEL ÁCIDO MECLOFENÁMICO EN PRESENCIA DE HTAB

Este analito presenta en disolución acuosa y medio ácido gran señal de fluorescencia, por lo que el pH de trabajo debe ser bastante ácido. Dado que nuestras disoluciones de trabajo están en medio básico debemos conseguir aumentar la acidez por adición lenta de HCl o de algún tampón ácido. Si el pH ácido lo conseguimos por adición de un volumen de HCl concentrado, provocaría la insolubilización del analito en dicho medio, produciéndose su precipitación con la consecuente turbidez de la muestra, que impediría la medida de la señal. Por lo tanto, el medio ácido se debe conseguir añadiendo gota a gota el HCl, teniendo en cuenta también no provocar una dilución considerable. Con la adición de HTAB, además de un importante desplazamiento del

máximo de emisión, se logra en medio básico, con lo que el problema de la solubilidad desaparece, aunque se pierde algo de sensibilidad en este caso concreto.

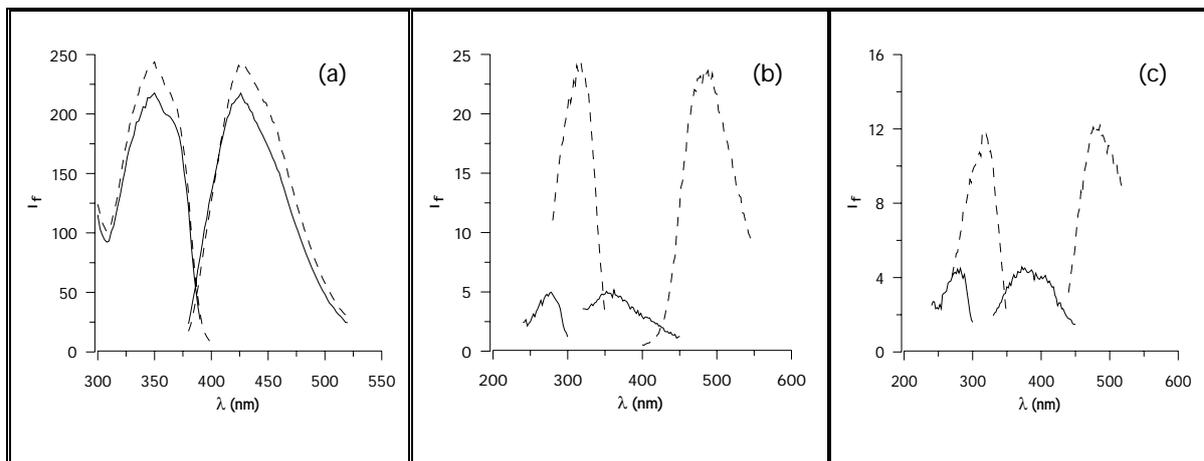


Figura VI.19.- Efecto de la adición de HTAB en una disolución de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido meclofenámico a distintos valores de pH: (a) 2.5, (b) 6.5 y (c) 10 en presencia (---) y ausencia (—) del surfactante.

En la Figura VI.19 se observa como la adición de HTAB produce un ligero aumento de la señal en medio ácido, no provocando cambios espectrales significativos, y que, en medio neutro y básico, la adición del surfactante provoca un gran aumento de sensibilidad y desplazamientos considerables de los máximos de excitación y, sobretodo, de emisión.

Influencia de la concentración del HTAB

Una vez comprobado que el HTAB produce un aumento de sensibilidad y un interesante desplazamiento de la longitud de onda de emisión, a continuación se realizó un estudio de la influencia de la concentración de HTAB, con el objeto de optimizar su concentración. Los resultados se representan en la Figura VI.20. Se elige como óptimo

un valor de concentración de HTAB, de $1.5 \cdot 10^{-4}$ M, que se encuentra en la zona donde la emisión de fluorescencia se mantiene máxima y prácticamente constante, siendo, además, una concentración por encima de la c.m.c del HTAB ($2.6 \cdot 10^{-5}$ M).

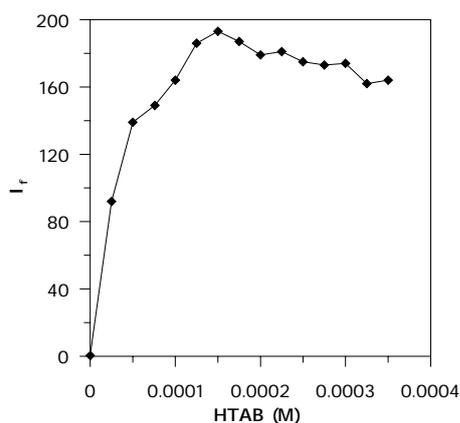


Figura VI.20.- Influencia de la concentración de HTAB

Influencia del pH

El pH final de trabajo lo conseguimos por adición de tampón TRIS/HCl 0.1 M de pH 8.60. Se efectuó un estudio de la influencia de la concentración de tampón sobre la señal de fluorescencia, no encontrando variaciones significativas al aumentar la concentración de éste, por lo que se seleccionó para ella un valor de 0.04 %.

ESTUDIO DEL ÁCIDO FLUFENÁMICO EN PRESENCIA DE HTAB

Este estudio se llevó a cabo siguiendo la metodología ya empleada para el MEC. Los resultados obtenidos se recogen en la Figura VI.21

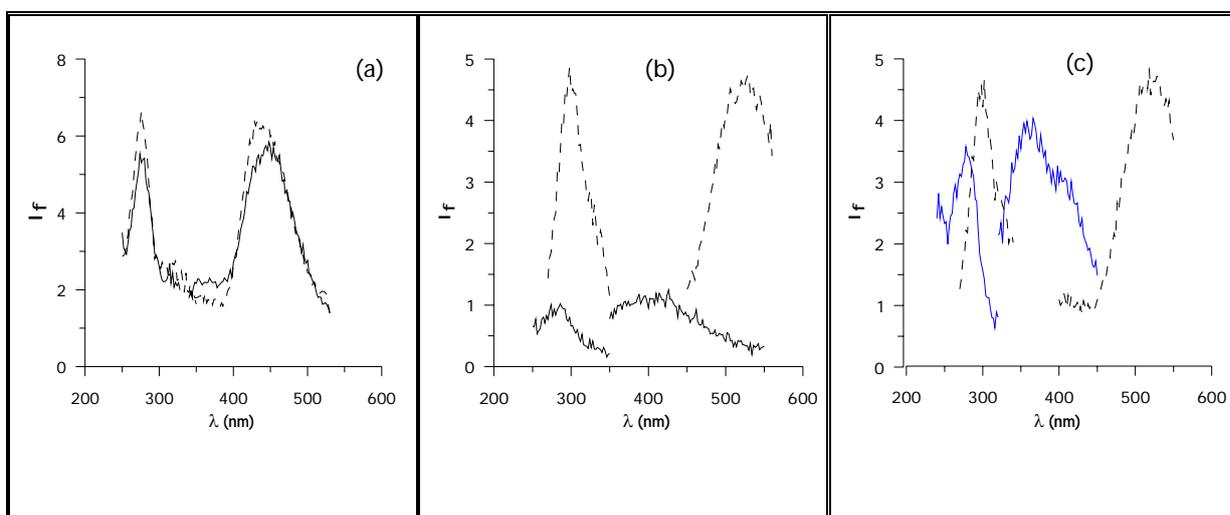


Figura VI.21.- Efecto de la adición de HTAB en una disolución de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido flufenámico a distintos valores de pH: (a) 2.5, (b) 6.5 y (c) 10 en presencia (- - -) y ausencia (____) del surfactante.

La adición de HTAB produce un ligero aumento de la señal en medio ácido, no provocando cambios espectrales significativos. En medio neutro y básico, la adición del surfactante provoca un gran aumento de sensibilidad, así como unos desplazamientos considerables de los máximos de excitación y, sobretodo, de emisión.

Influencia de la concentración del HTAB

Empleando análoga metodología se estudio la influencia de la concentración de HTAB. A la vista de los resultados representados en la Figura VI.22, se elige como óptimo un valor de concentración de HTAB, de $1.5 \cdot 10^{-4}$ M, superior a la c.m.c del HTAB ($2.6 \cdot 10^{-5}$ M).

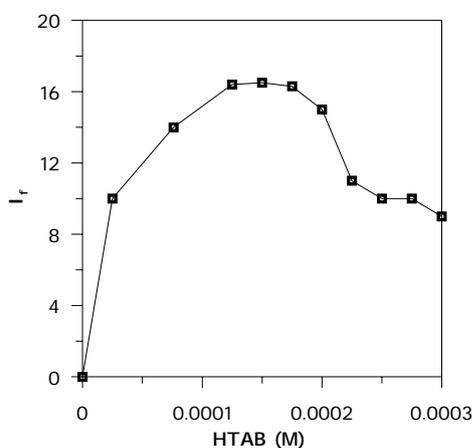


Figura VI.22.- Influencia de la concentración de HTAB

Influencia del pH

El pH final se consigue por adición de tampón TRIS/HCl 0.1 M de pH 8.60. Se estudió de la influencia de la concentración de tampón sobre la señal de fluorescencia, no encontrando variaciones significativas al aumentar la concentración de éste, por lo que se seleccionó un valor de 0.04 %.

ESTUDIO DE LINEALIDAD. RECTAS DE CALIBRADO

Una vez optimizadas la concentración óptima de HTAB y pH, se realizó un estudio de la linealidad señal de fluorescencia-concentración de los analitos. En matraces de 5 mL se añadieron concentraciones crecientes de los analitos, el volumen adecuado de disolución de HTAB para que la concentración final fuese $1.5 \cdot 10^{-4}$ M, 2 mL de tampón TRIS/Cloroacético de pH 8.5, enrasándose con agua desionizada. Registrados los espectros de emisión se tomaron las intensidades de fluorescencia a las

longitudes de onda de emisión de 520 y 490 nm para FLU y MEC respectivamente, utilizando como longitud de onda de excitación de 290 nm para ambos analitos. Se encontró una linealidad adecuada para FLU hasta $4 \mu\text{g mL}^{-1}$ y hasta $6 \mu\text{g mL}^{-1}$ para MEC. En dichos rangos se establecieron las correspondientes rectas de calibrado, Figura VI.23, y se obtuvieron los parámetros de calidad de la Tabla VI.3

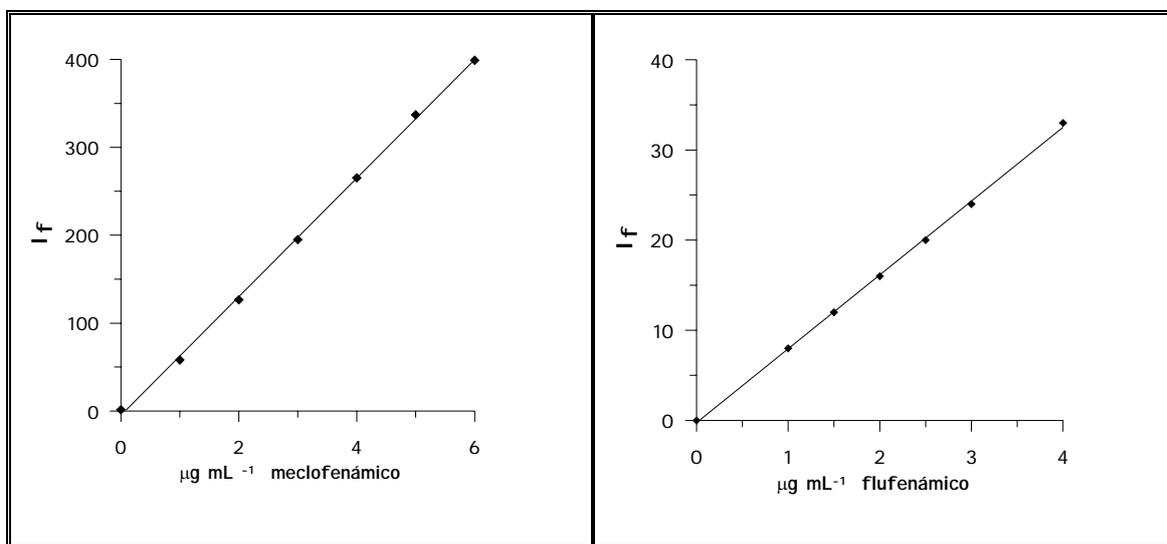


Figura VI.23.- Rectas de calibrado

Tabla VI.3.- *Parámetros analíticos de calidad*

Parámetros	Meclofenámico	Flufenámico
<i>Ordenada Origen</i>	4.96	0.24
<i>Pendiente</i>	67.47	8.19
<i>Desviación Ordenada Origen</i>	3.06	0.22
<i>Desviación Pendiente</i>	0.85	0.09
<i>Coefficiente determinación (r^2)</i>	0.999	0.999
<i>Linearidad (%)</i>	98.7	98.8
<i>Sensibilidad Analítica (γ^{-1})</i>	0.07	0.04
<i>LD_{w&L} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	0.14	0.08
<i>LD_{Clayton} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)</i>	0.23	0.13

ANÁLISIS DE LAS MATRICES DE EXCITACIÓN-EMISIÓN FLUORESCENTE. SELECCIÓN DE LOS RANGOS ESPECTRALES

En la Figura VI.24 se muestra el espectro tridimensional de una muestra patrón de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$, en las condiciones operatorias establecidas. El barrido de emisión se realizó inicialmente de 400 a 570 nm, con un incremento de 2 nm, y el de excitación de 250 a 360 nm, con un incremento de 5 nm.

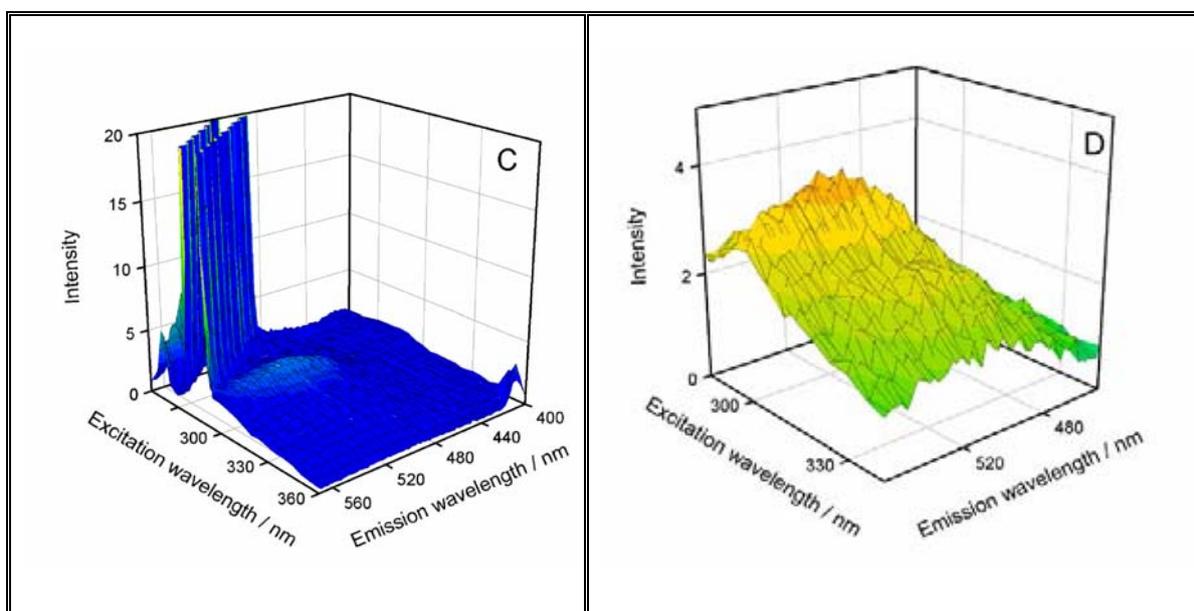


Figura VI.24.- Espectro tridimensional del patrón de ácido FLU en todo el rango de medida (c), así como en la región seleccionada (d).

Como se observa en la Figura VI.24a, la señal producida por el analito es casi inexistente. Además, existen señales procedentes de procesos de dispersión, efecto Rayleigh y dispersión de segundo orden. Para soslayar este hecho, se ha reducido el rango de longitudes de onda de excitación-emisión, para la futura cuantificación de las muestras problema. La región espectral seleccionada para este analito fue de 450 a 558 nm, con un incremento de 2 nm, para el caso de la emisión, y de 285 a 340 nm, con un incremento de 5 nm, para la excitación. Dicho espectro se recoge en la Figura VI.24b, donde puede observarse la baja señal que produce el analito, lo que indica el grado de complejidad de la determinación de dicho analito en muestras biológicas reales.

El mismo estudio se llevó a cabo con el ácido MEC, encontrando como región óptima para este analito la de 410 a 518 nm, con un incremento de 2 nm, para la emisión, y de 265 a 350 nm, con un incremento de 5 nm, para excitación. En los espectros tridimensionales que se recogen en la Figura VI.25, se observa que la

sensibilidad de MEC es algo mayor que para FLU, aunque muy pequeña en ambos casos.

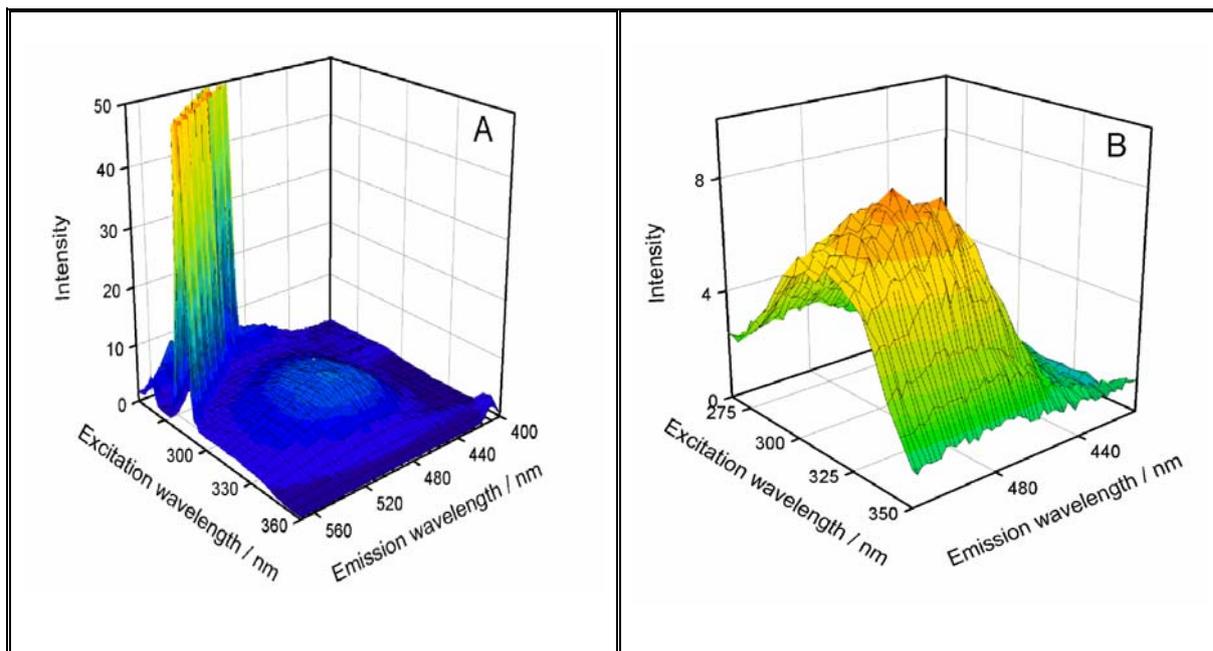


Figura VI.25.- Espectros tridimensionales para un patrón de MEC de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ tanto en la región total (a) como en la seleccionada (b).

Dado que el objetivo de este trabajo es la determinación de estos analitos en fluidos biológicos, tales como orina, se registró también un espectro tridimensional de una muestra de orina. A ésta se le ha aplicado una dilución tal que, una vez sea contaminada con los analitos, dentro de los límites biológicos permitidos, y realizada tal dilución, la concentración de éstos esté dentro de nuestros rangos de linealidad. Como se observa en la Figura VI.26 la señal producida por la orina diluida es muy grande, solapando totalmente las señales de los analitos, lo que complica la determinación de ambos.

Se realizaron unas pruebas previas para intentar determinar dichos analitos aplicando calibración externa con datos de segundo orden (PARAFAC-ES y SWTLAD-ES), pero los resultados obtenidos indicaron la imposibilidad de dicha determinación, ya que la orina producía efecto de filtro interno. De ahí, que utilizaremos la técnica de adición patrón (PARAFAC-IS Y SWTALD-IS), para la determinación en orina.

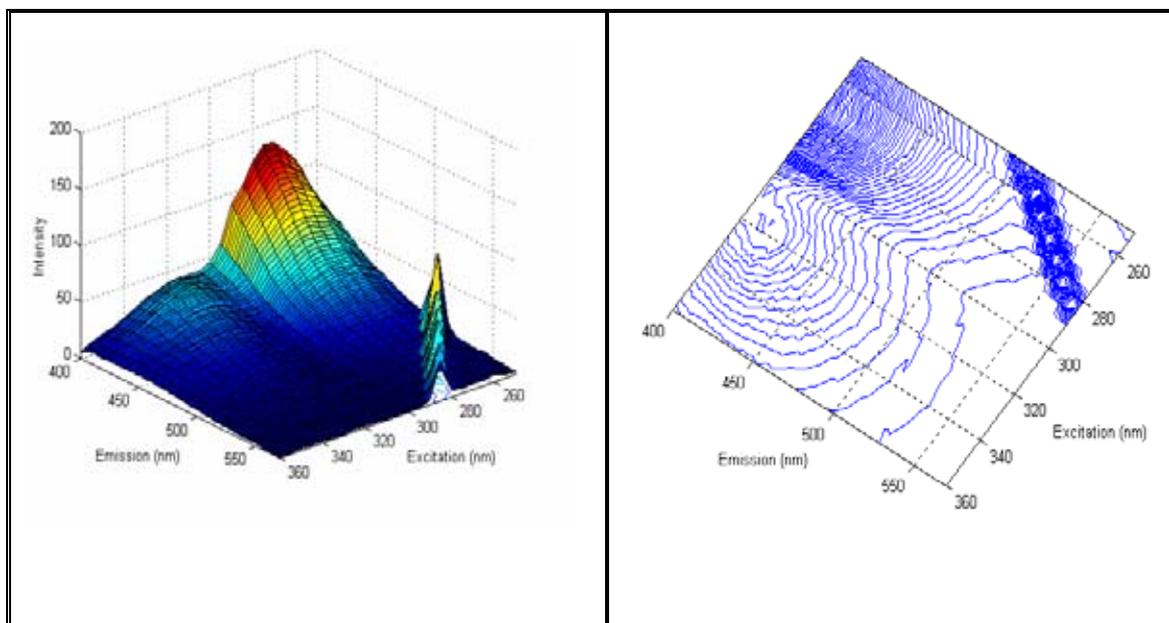


Figura VI.26.- Espectro tridimensional y mapa de contorno de una muestra de orina en las condiciones de trabajo y después de aplicar una dilución 1:100

DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS FLUFENÁMICO Y MECLOFENÁMICO EN MUESTRAS DE ORINA

Una vez optimizados los rangos de trabajo se pasó a la determinación de los analitos en orina, para ello, primero se abordará la determinación de ellos individualmente, y posteriormente la determinación conjunta.

Se hizo una búsqueda para conocer acerca de la dosis y excreción de estos analitos en orina, encontrando que dichos analitos se pautan separadamente por vía oral y con una dosis media entre 200-400 mg /día para MEC y entre 300- 600 mg /día para FLU, sufriendo una absorción rápida y completa, para excretarse sobre todo en orina (70% para meclofenámico y 40% para flufenámico).

➤ **Determinación de ácido flufenámico en orina**

Con estos datos, se estudiaron las posibles diluciones que podríamos aplicar a la orina para que, una vez diluida, la concentración del analito estuviese dentro del rango de linealidad encontrado. Realizadas varios ensayos, se seleccionó como óptima una dilución 1:100, debido a que diluciones menores producían una señal de fondo muy grande lo que unido a las señales de fluorescencia tan pequeñas de los analitos, hacía inviable su determinación, incluso al aplicar el método de adición estándar.

Optimizada la dilución, el método operatorio a seguir fue el siguiente:

1°.- En un matraz de 5 mL se ponen 0.5 mL de la muestra problema de orina contaminada

2°.- Se dejan en contacto durante 5 minutos para favorecer las interacciones

3°.- Se añaden 2 mL de tampón TRIS/HCl 0.1 M de pH 8.6 y se enrasa con agua desionizada

4°.- De esta solución se toman 0.3 mL y se llevan a un matraz de 3 mL, al que se añaden 20 µL de disolución 0,025 M de HTAB, se enrasa con agua desionizada y se agita.

5°.- El contenido del matraz se introduce en una cubeta de cuarzo y se registra el primer espectro tridimensional.

6°.- A esta solución se le adicionan volúmenes de disolución del analito, siempre dentro del rango de linealidad. Tras cada adición y una vez agitada la muestra, se le registra la matriz tridimensional.

Es decir, la forma de trabajar con PARAFAC-IS y SWATLD-IS, es parecida a como lo hacemos con calibración externa, la variación es que no se construye una matriz de calibrado de la manera usual, sino que trabajamos directamente con muestras problemas, a las que se le realizan distintas adiciones patrón del analito a determinar. En esta modalidad de calibración, se sigue aprovechando la “ventaja de segundo orden”. El procedimiento es un poco más tedioso, porque para cada problema que queramos determinar debemos realizar una serie de adiciones patrón, a las cuales se les debe registrar el espectro tridimensional.

En la interfase gráfica (MVC2) los datos se introducen de forma algo diferente a como lo hacíamos al trabajar con PARAFAC-ES y SWATLD-ES, pues debemos introducir un fichero con las distintas adiciones realizadas, así como la concentración añadida en cada caso.

A continuación, como ejemplo, se reúnen en la Tabla VI.4 los volúmenes adicionados de ácido flufenámico de concentración $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ a uno de los problemas, así como las concentraciones finales en la cubeta. Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de orina analizadas.

Tabla VI.4.- Valores de volúmenes de ácido flufenámico adicionados a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS y SWATLD-IS, a una de las muestras de orina.

<i>Muestra</i>	<i>μL añadidos de FLU a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g mL}^{-1}$ FLU</i>
<i>Problema</i>	----	---
<i>Problema + Adición 1</i>	2.00	0,33
<i>Problema + Adición 2</i>	5.00	0,83
<i>Problema + Adición 3</i>	8.00	1,33
<i>Problema + Adición 4</i>	11.00	1,83
<i>Problema + Adición 5</i>	14.00	2,33

Selección del número de factores

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza en función del método denominado Core Consistency Diagnostic [23] (Corcondia). Cuando el valor del Core Consistency (Consistencia de núcleo) baja desde un valor alto, por encima aproximadamente del 60%, a un valor bajo, por debajo del 50%, esto indica que se ha llegado al número apropiado de componentes.

Es de esperar que, en nuestro caso, en el que tenemos un analito y la orina el número óptimo de factores sea igual o superior a dos. Se analizaron, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura VI.27.

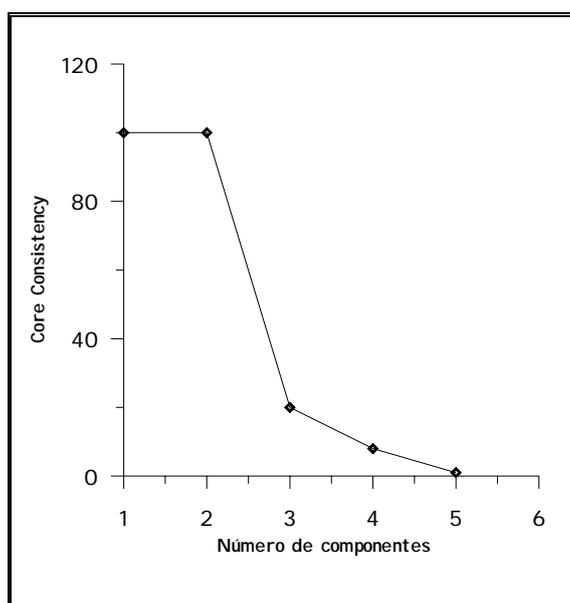


Figura VI.27.- Representación del core consistency en función del número de factores para una muestra de orina contaminada con ácido flufenámico

En el caso de SWATLD, un método que, según sus autores, es menos sensible a la utilización de un número de factores por exceso, también se estableció como óptimo un total de 2 factores. En este caso, la velocidad de cálculo es bastante superior que cuando se utiliza PARAFAC.

Además de utilizar el criterio descrito, también se puede seleccionar el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión de la regresión pseudo univariante, en función del número de factores. Este método debe aplicarse para cada una de las muestras [24]. Como se puede ver en la Figura VI.28, en el caso de una muestra de orina, el error de regresión permanece constante a partir de que el número de factores sea dos, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

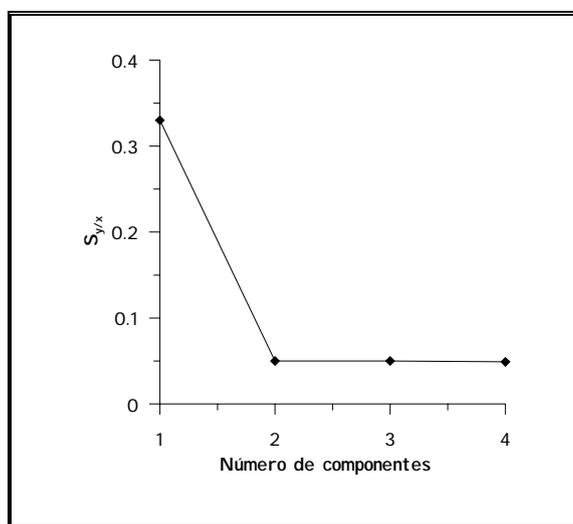


Figura VI.28.- Representación del error de regresión de la regresión pseudo-univariante para una muestra de orina contaminada con ácido flufenámico

En la Figura VI.29, podemos ver los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar una muestra problema tras aplicar PARAFAC. En esta figura se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo. Los componentes aparecen en orden, en función de su contribución al total de la varianza.

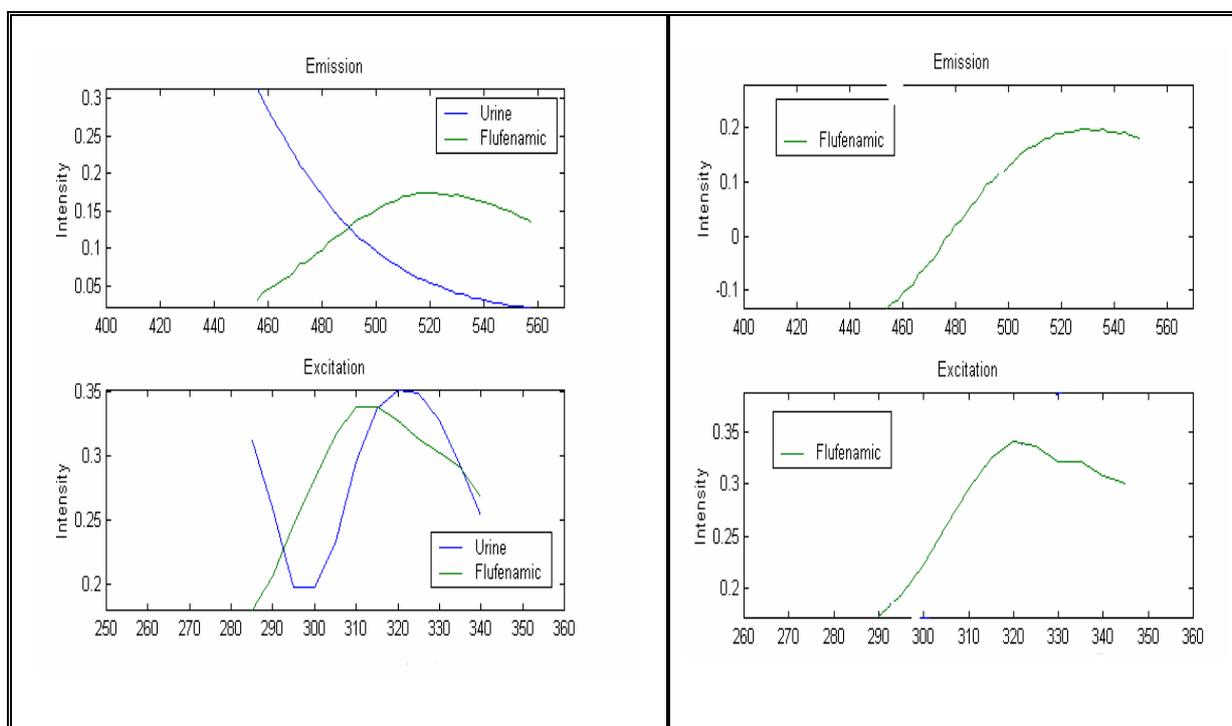


Figura VI.29.- Perfiles de emisión y excitación de los factores optimizados: espectros de una muestra de orina en presencia de ácido flufenámico y espectros de un patrón de ácido flufenámico

En este caso concreto, la interferencia de la orina aparece en primer lugar, lo cual indica que es la principal fuente de fluorescencia. A continuación aparece el analito.

Si comparamos los perfiles dados por PARAFAC, con el espectro del analito puro, se puede asignar que el número uno corresponde a la orina, mientras que el número dos corresponde a FLU. Esta forma de mostrar los espectros y de su asignación es la misma que se aplica al utilizar SWATLD.

Al mismo tiempo, se obtienen gráficos de calibración pseudounivariante, donde se representan las distintas adiciones realizadas, así como la concentración calculada, cuyo valor se muestra en el espacio de MATLAB, junto con los parámetros estadísticos.

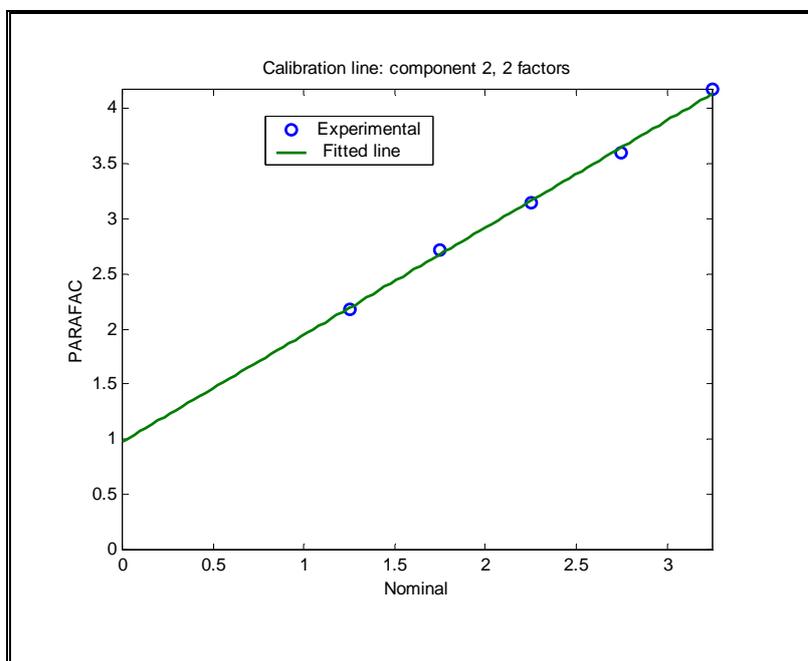


Figura VI.30.- Gráfico de la calibración pseudounivariante obtenida al aplicar PARAFAC-IS a una muestra de orina fortificada con ácido flufenámico

En la Tabla VI.5, se resumen las concentraciones encontradas para las muestras de orina analizadas, así como una serie de blancos de orina para las que se obtienen recuperaciones muy próximas a cero. Cada muestra analizada se realizó por triplicado. Los resultados estadísticos mostrados en la Tabla VI.5, presentan un valor de REP bastante aceptable para las dos metodologías aplicadas. Además, el valor para una y otra son similares. La determinación se realizó en orina de personas de edades comprendidas entre los 20 y 30 años, que no estaban bajo ningún tratamiento médico.

Muestra	Añadido($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C.Final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R	SWATLD-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R
Orina 1	150	1,50	1,45 \pm 0.03	97	1,44 \pm 0.03	96
	124	1,24	1,17 \pm 0.03	94	1,18 \pm 0.04	95
	0.00	0.00	0.002	---	0.002	---
Orina 2	100	1,00	1,09 \pm 0.04	109	1,10 \pm 0.05	110
	90	0,90	0,87 \pm 0.05	97	0.86 \pm 0.05	95
	0.00	0.00	0.001	---	0.001	---
Orina 3	80	0,80	0,79 \pm 0,05	99	0.78 \pm 0.05	98
	50	0,50	0.49 \pm 0.03	98	0.48 \pm 0.03	96
	0.00	0.00	0.001	---	0.001	---
REP			6.0		6.7	
RMSEP			0.06		0.07	

Tabla VI.5.- Resultados de la determinación de ácido flufenámico en orina mediante calibración de segundo orden

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva de los métodos empleados, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y la predicha por los métodos. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para cada método, se han comparado con los valores (0,1) teóricos, mediante el denominado test de la elipse (EJCR, Elliptical Joint Confidence Region)[51].

Como se puede observar en la Figura VI.31, las dos elipses contienen el punto teórico (0,1), aunque la correspondiente a la de PARAFAC-IS presenta menor tamaño, con lo que podríamos concluir que produce resultados ligeramente más precisos que SWATLD-IS.

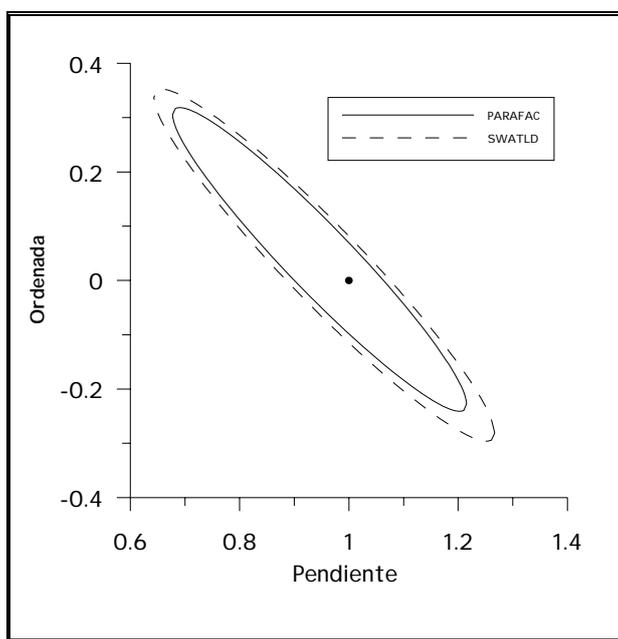


Figura VI.31.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual. El punto marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$)

➤ **Determinación de meclofenámico en orina**

Siguiendo el mismo procedimiento empleado en la determinación de FLU en orina se prepararon las muestras.

A título de ejemplo en la Tabla VI.6 se reúnen los volúmenes adicionados de una disolución $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido meclofenámico al problema 1, así como las concentraciones finales en la cubeta. Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de orina analizadas.

Tabla VI.6.- Valores de volúmenes de ácido meclofenámico adicionados a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS y SWATLD-IS, a una de las muestras de orina.

<i>Muestra</i>	<i>μL de MEC añadidos a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g mL}^{-1}$ MEC</i>
<i>Problema</i>	----	--
<i>Problema + Adición 1</i>	1.20	0,26
<i>Problema + Adición 2</i>	5.20	1,59
<i>Problema + Adición 3</i>	9.20	3,82
<i>Problema + Adición 4</i>	13.20	4,15

Selección del número de factores

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza como se hizo en el estudio anterior. Se analizaron, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura VI.32.

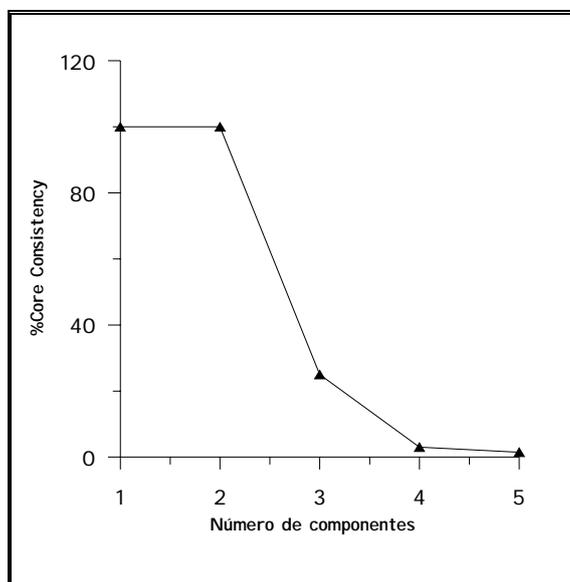


Figura VI.32.- Representación del core consistency en función del número de factores, para una muestra de orina contaminada con ácido meclofenámico

En el caso de SWATLD, un método que es menos sensible a la utilización de un exceso de factores también, se estableció como óptimo un total de 2 factores. Se observándose de nuevo, una velocidad de cálculo bastante superior a cuando se utiliza PARAFAC.

Seleccionando el número óptimo de factores, analizando la variación en el error de regresión de la pseudo regresión univariante, en función del número de factores, Figura VI.33, se observa que, el error de regresión permanece constante para un número de factores superior a uno, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

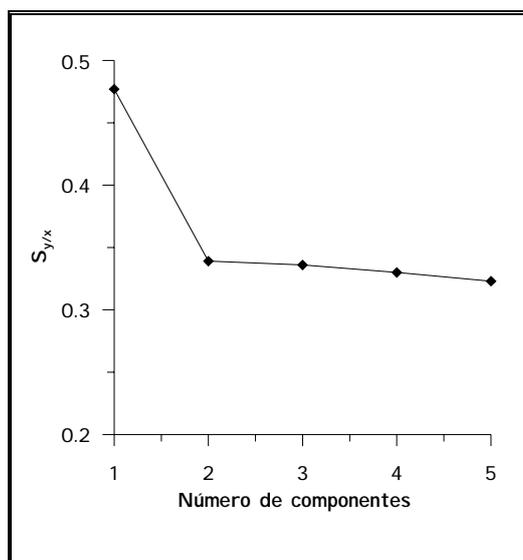


Figura VI.33.- Representación del error de regresión de la pseudo regresión univariante para una muestra de orina contaminada con ácido meclofenámico.

En la Figura VI.34, se muestran los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar una muestra problema tras aplicar PARAFAC. Los componentes se han etiquetado de acuerdo con el orden asignado por el modelo. Los componentes aparecen en orden, en función a su contribución al total de la varianza.

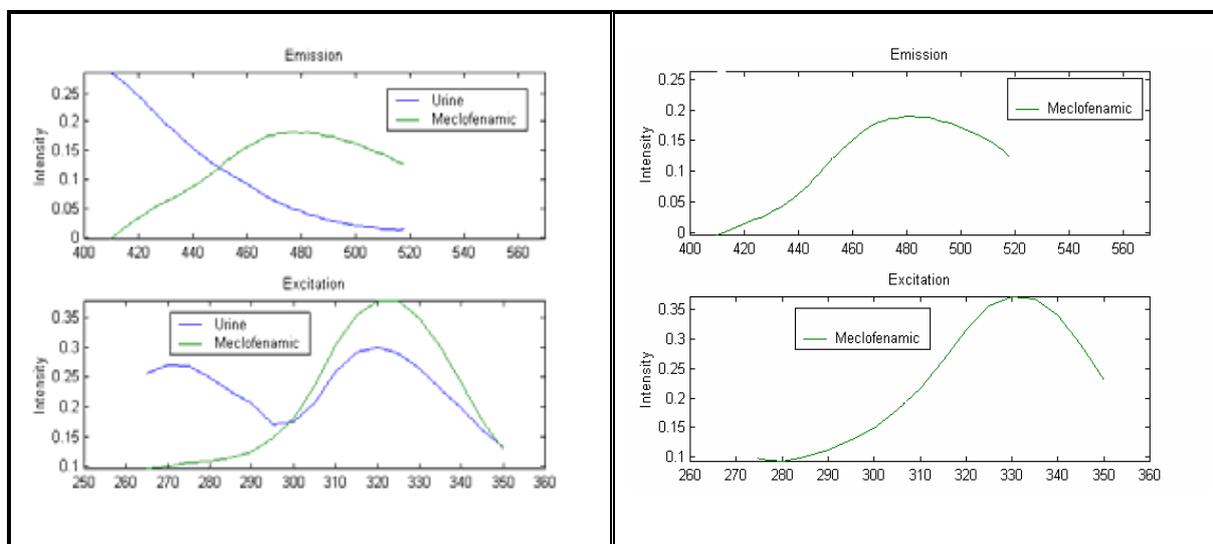


Figura VI.34.- *Perfiles de emisión y excitación de los factores optimizados: espectros de una muestra de orina en presencia de ácido meclofenámico y espectros de un patrón de ácido meclofenámico*

De nuevo, la interferencia de la orina aparece en primer lugar, lo cual indica que es la principal fuente de fluorescencia.

Comparando los perfiles dados por PARAFAC, con el espectro del analito puro, se puede asignar que el número uno corresponde a la orina, mientras que el número dos corresponde al flufenámico.

Al mismo tiempo, se obtienen gráficos de calibración pseudovariante, Figura VI.35, donde se representan las distintas adiciones realizadas, así como la concentración calculada, cuyo valor se muestra en el espacio de MATLAB, junto con los parámetros estadísticos.

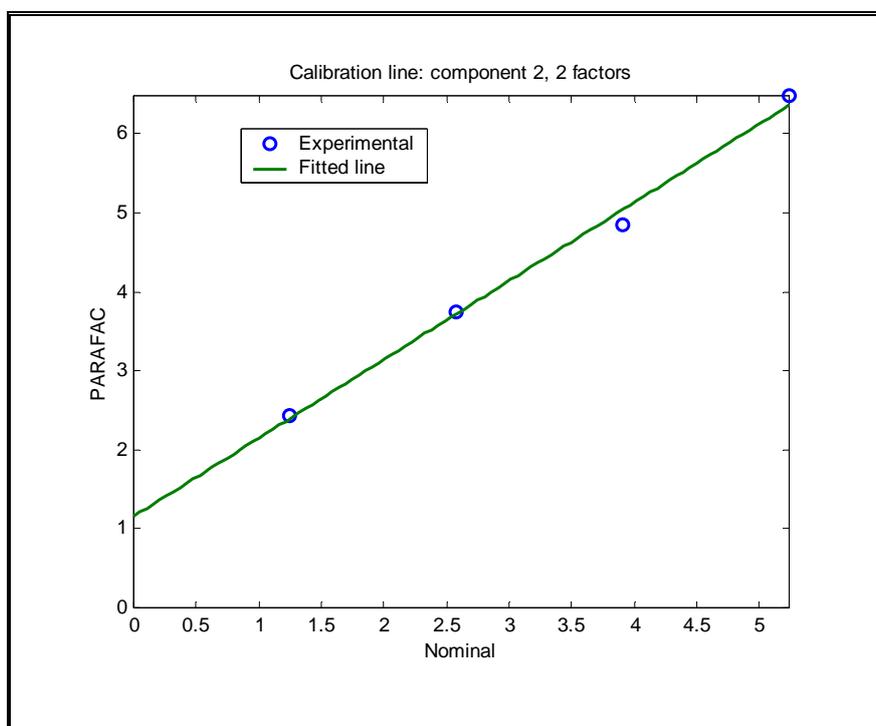


Figura VI.35.- Gráfico de la calibración pseudounivariante obtenido al aplicar PARAFAC-IS, a una muestra de orina contaminada con ácido meclofenámico

En la Tabla VI.7, se resumen los valores de concentración encontrados para las muestras de orina analizadas, junto con una serie de blancos de orina, que presentan recuperaciones muy próximas a cero. Cada muestra analizada se realizó por triplicado. Los resultados estadísticos mostrados en la Tabla VI.7, presentan un valor de REP similar y bastante aceptable para las dos metodologías aplicadas. La determinación se realizó en orina de personas de edades comprendidas entre los 20 y 30 años, no sometidos a tratamiento.

Tabla VI.7.- Resultados de la determinación de ácido meclofenámico en orina mediante calibración de segundo orden

Muestra	Añadido ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C.Final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R	SWATLD-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R
<i>Orina 1</i>	150	1,50	$1,50 \pm 0.06$	100	$1,51 \pm 0.05$	100
	124	1,24	1.16 ± 0.04	93	$1,15 \pm 0.03$	93
	0.00	0.00	0.001	---	0.001	---
<i>Orina 2</i>	100	1,00	$0,95 \pm 0.06$	95	$0,94 \pm 0.06$	94
	90	0,90	$0,85 \pm 0.05$	94	$0,85 \pm 0.05$	94
	0.00	0.00	0.002	---	0.002	---
<i>Orina 3</i>	50	0,50	$0,47 \pm 0.04$	94	0.47 ± 0.05	94
	36	0,36	$0,39 \pm 0.05$	108	0.38 ± 0.05	105
	0.00	0.00	0.001	---	0.001	---
REP			6.6		6.7	
RMSEP			0.06		0.06	

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva de ambos métodos empleados, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y predicha por los diferentes métodos. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para cada método se han comparado con los valores (0,1) teóricos mediante el denominado test de la elipse (EJCR, Elliptical Joint Confidence Region).

Como se puede observar en la Figura VI.36, las dos elipses contienen el punto teórico (0,1), aunque la correspondiente a la de PARAFAC-IS presenta menor tamaño con lo que podríamos concluir que produce resultados ligeramente más precisos.

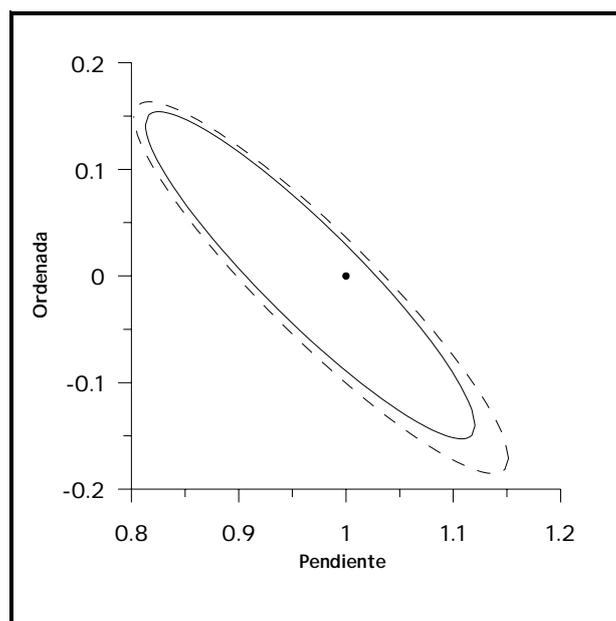


Figura VI.36.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual.
El punto marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$)

➤ **Determinación de la mezcla FLU y MEC en orina**

Una vez optimizada la dilución, el método operatorio a seguir fue el siguiente:

1°.- En un matraz de 10 mL se ponen 1.0 mL de la muestra de orina problema, previamente contaminada

2°.- Se deja en contacto durante 5 minutos para favorecer las interacciones

3°.- Se añaden 4 mL de tampón TRIS/HCl 0.1 M de pH 8.6 y se enrasa con agua desionizada

4°.- De esta solución se toman 0.5 mL y se llevan a un matraz de 5 mL, donde se añaden 32 μL de una disolución 0,025 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de HTAB, se enrasa con agua desionizada y se agita.

5°.- De esta disolución se toman 2.5 mL y se llevan a la cubeta de cuarzo. A esta disolución se le registra el primer espectro tridimensional.

6°.- A esta solución se le adicionan distintos volúmenes de ácido flufenámico, siempre dentro del rango de linealidad. Tras cada adición y una vez agitada la muestra se registra el espectro tridimensional. Estas disoluciones se corresponden con la matriz de calibración del ácido flufenámico.

7°.- A continuación se toman los 2.5 mL restantes y se adicionan a la cubeta de fluorescencia. Se registra el primer espectro tridimensional.

8°.- A esta solución se le adicionan distintos volúmenes de ácido flufenámico, siempre dentro del rango de linealidad. Tras cada adición y una vez agitada la muestra se registra el espectro tridimensional. Estas disoluciones se corresponden con la matriz de calibración del ácido meclofenámico.

En este procedimiento el calibrado se realiza respecto de un analito considerando el otro como interferencia, y viceversa.

A continuación, como ejemplo, se reúnen en la Tabla VI.8 los volúmenes de ácido flufenámico de concentración $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados a un problema concreto, que contiene $1,10 \mu\text{g mL}^{-1}$ de flufenámico y $0,7 \mu\text{g mL}^{-1}$ de meclofenámico; así como las concentraciones finales en la cubeta. Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de orina analizadas.

Tabla VI.8.- Valores de volúmenes de ácido flufenámico $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS y SWATLD-IS, a una de las muestras de orina.

<i>Muestra</i>	<i>μL de FLU añadidos a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g mL}^{-1}$ FLU /MEC</i>
<i>Problema</i>	----	----
<i>Problema + Adición 1</i>	1.50	0.25 / 0.7
<i>Problema + Adición 2</i>	5.50	1.00 / 0.7
<i>Problema + Adición 3</i>	9.50	1.66 / 0.7
<i>Problema + Adición 4</i>	17.50	2.50 / 0.7

En la Tabla VI.9 se reúnen los volúmenes de ácido meclofenámico de concentración $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ adicionados a un problema concreto, que contiene $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ de meclofenámico y $0,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ de flufenámico; así como las concentraciones finales en la cubeta. Este procedimiento, por triplicado, fue el seguido para cada una de las muestras de orina analizadas.

Tabla VI.9.- Valores de volúmenes adicionados de ácido meclofenámico $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a la cubeta y concentración final en ésta, para aplicar PARAFAC-IS y SWATLD-IS, a una de las muestras de orina.

<i>Muestra</i>	<i>μL de MEC añadidos a la cubeta</i>	<i>$\mu\text{g mL}^{-1}$ MEC /FLU</i>
<i>Problema</i>	----	----
<i>Problema + Adición 1</i>	2.00	0.33 / 0.9
<i>Problema + Adición 2</i>	7.00	1.70 / 0.9
<i>Problema + Adición 3</i>	11.00	3.23 / 0.9
<i>Problema + Adición 4</i>	15.00	4,53 / 0.9

Selección del número de factores

La determinación del número óptimo de factores en PARAFAC se realiza de la misma manera que lo hemos hecho para los analitos por separado. Si se trabaja en el modo de calibración externa, sería de esperar, en este caso, en el que tenemos dos analitos y la orina, que el número óptimo de factores fuese igual o superior a tres. Pero

çen este procedimiento, en el que se trabaja en el modo de calibración interna, el calibrado se realiza respecto de un analito considerando el otro como interferencia, y viceversa, por tanto es de esperar un número óptimo de factores igual o superior a dos. Se analizan, una a una, todas las muestras problemas, encontrando un número óptimo de factores igual a 2, como puede observarse en la Figura VI.37.

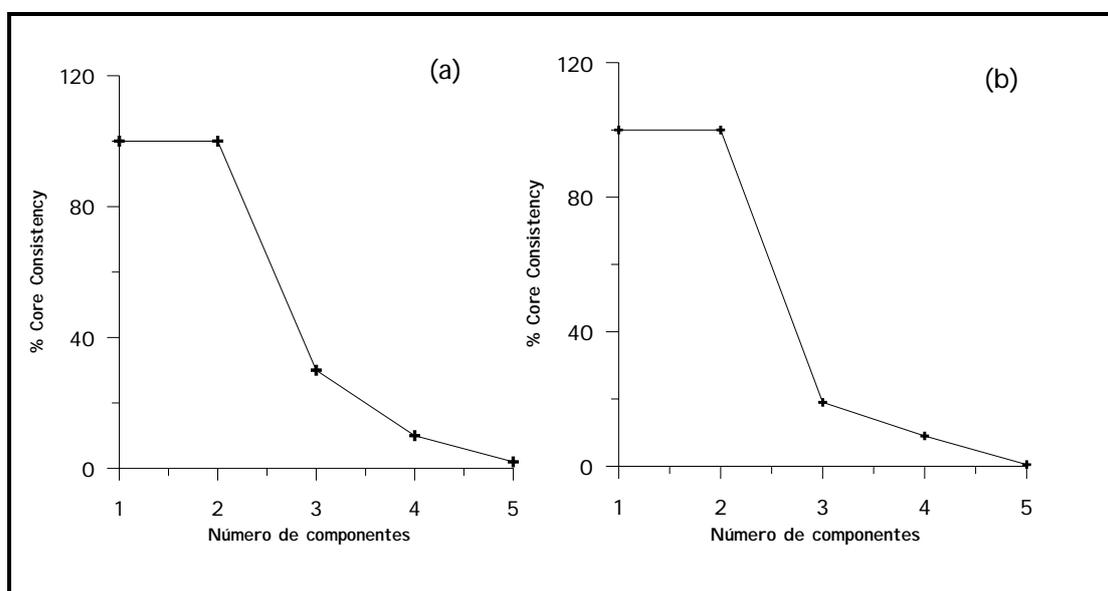


Figura VI.37.- Representación del core consistency en función del número de factores para el ácido flufenámico (a) y ácido meclofenámico (b) para una muestra de orina fortificada con ambos ácidos

En el caso de SWATLD, aunque es menos sensible a un exceso de factores, también se estableció como óptimo un total de 2 factores.

Determinado el número de factores por análisis de la variación en el error de regresión de la pseudo regresión univariante, en función del número de factores, Figura VI. 38, se observa que el error de regresión para los dos analitos permanece constante cuando el número de factores es superior a uno, es decir, el número óptimo de factores es 2, lo cual está de acuerdo con el análisis del *core consistency*.

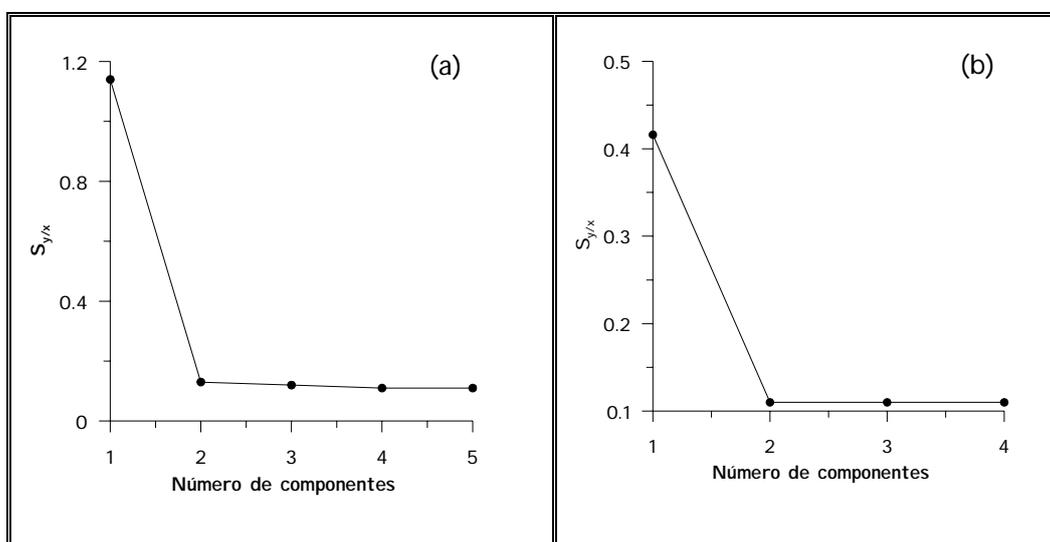


Figura VI.38.- Representación del error de regresión de la pseudo regresión univariante para flufenámico (a) y meclofenámico (b), para una muestra de orina contaminada con ambos ácidos

En la Figura VI.39, podemos ver los perfiles de las matrices B y C, que se obtienen al procesar una muestra problema tras aplicar PARAFAC. En esta figura se han etiquetado los componentes de acuerdo con el orden asignado por el modelo. Los componentes aparecen en orden, en función a su contribución al total de la varianza.

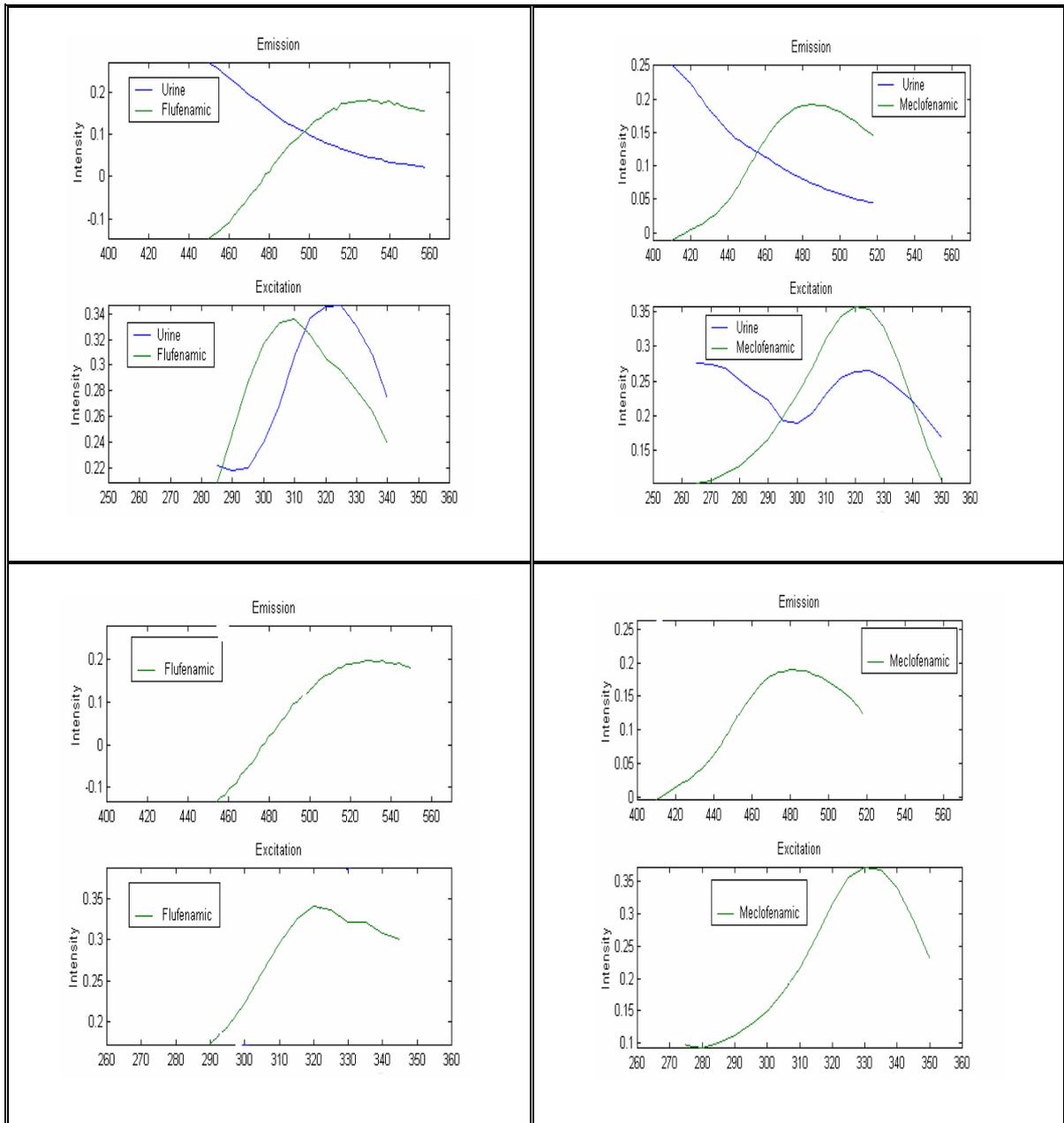


Figura VI.39.- Perfiles de emisión y excitación de los factores optimizados: espectros de una muestra de orina en presencia de los ácidos flufenámico y meclofenámico y espectros de los patrones de dichos ácidos.

Como en el estudio individualizado de cada ácido, la interferencia de la orina aparece en primer lugar.

Comparando los perfiles dados por PARAFAC, con el espectro de los analitos puros, se puede asignar el número uno corresponde a la orina y el dos al flufenámico y meclofenámico respectivamente.

Se obtienen gráficos de calibración pseudounivariante, Figura VI.40, donde se representan las distintas adiciones realizadas, así como la concentración calculada, cuyo valor se muestra en el espacio de MATLAB, junto con los parámetros estadísticos.

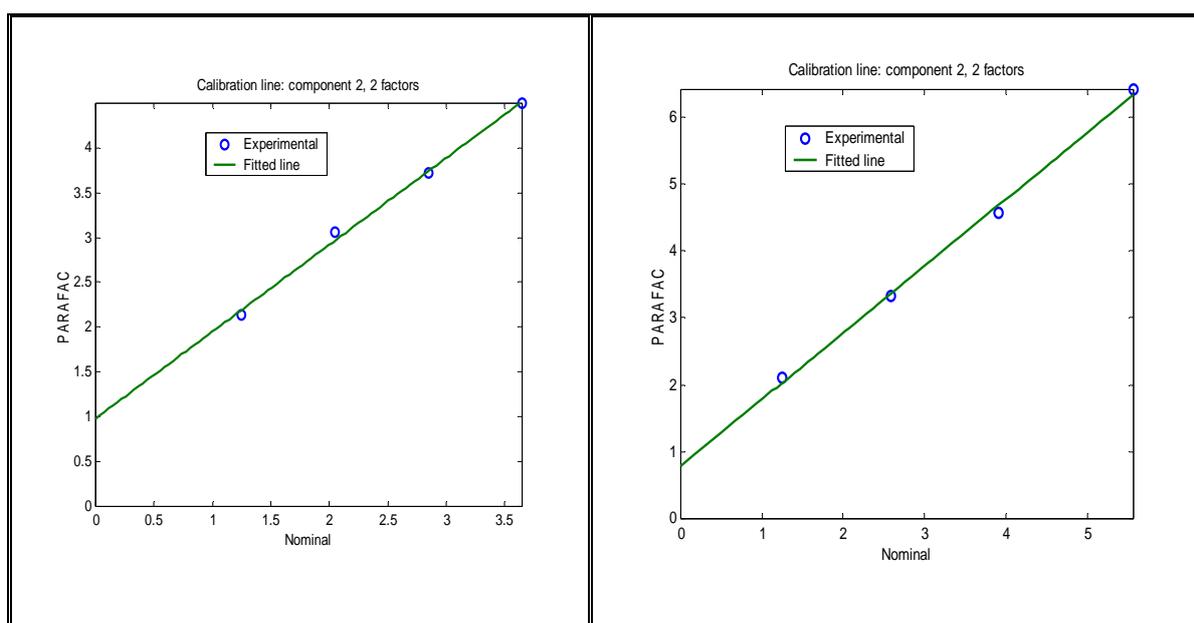


Figura VI.40.- Gráfico de la calibración pseudovariante obtenida al aplicar PARAFAC-IS, a una muestra de orina fortificada con los ácidos flufenámico y meclofenámico

En la Tabla VI.10, se resumen los valores de concentración encontrados para las muestras de orina analizadas por triplicado. Los resultados estadísticos recogidos en la Tabla VI.10, presentan un valor de REP bastante aceptable para las dos metodologías aplicadas, pero, si se comparan con los obtenidos para los analitos por separado, son ligeramente mayores. Es lógico, suponemos, debido a que en la mezcla de los analitos aumenta el número de interferencias, provocando que las predicciones sean algo menos precisas, siendo el valor para una y otra similares.

Tabla VI.10.- Resultados de la determinación de Flufenámico (a) y Meclofenámico (b) en orina, mediante calibración de segundo orden

Muestra	Añadido ^a ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C.Final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% R	SWATLD-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% R	Añadido ^b ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	C.Final ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	PARAFAC-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% R	SWATLD-IS ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	%R
Orina1	150	1.50	1.57±0.04	105	1,53±0.05	102	150	1.5	1.61±0.02	107	1.61±0.02	107
	110	1.10	1,00±0.03	91	0.99 ± 0.03	90	70	0.7	0.77 ± 0.02	110	0.77 ± 0.02	110
Orina2	90	0.90	0,83±0.04	92	0.83 ± 0.03	92	90	0.9	0.84 ± 0.02	93	0.83 ± 0.03	94
	80	0.80	0,85±0.06	106	0.84 ± 0.04	105	140	1.4	1.24 ± 0.06	88	1.24 ± 0.04	88
Orina 3	50	0.50	0.46±0.04	93	0.45 ± 0.04	90	110	1.1	1.01 ± 0.02	92	1.005±0.02	91
	40	0.45	0.45±0.02	112	0.44 ± 0.03	110	60	0.6	0.64 ± 0.05	106	0.65 ± 0.04	108
REP			9.47		9.6				9.1		8.0	
RMSEP			0.09		0.09				0.08		0.07	

Para obtener mayor información sobre la capacidad predictiva de los métodos empleados, se ha realizado una regresión entre la concentración nominal y predicha por los diferentes métodos y para ambos analitos. El valor del intervalo de confianza para la ordenada y pendiente obtenidos en dicha regresión para cada método se han comparado con los valores (0,1) teóricos mediante el denominado test de la elipse (EJCR, Elliptical Joint Confidence Region)[25].

Cómo se puede observar en la Figura VI.41, las cuatro elipses contienen el punto teórico (0,1), aunque las correspondientes a la determinación de meclofenámico son de menor tamaño que las correspondientes al flufenámico, con lo que se podría concluir que, en la determinación de meclofenámico, los resultados son más precisos.

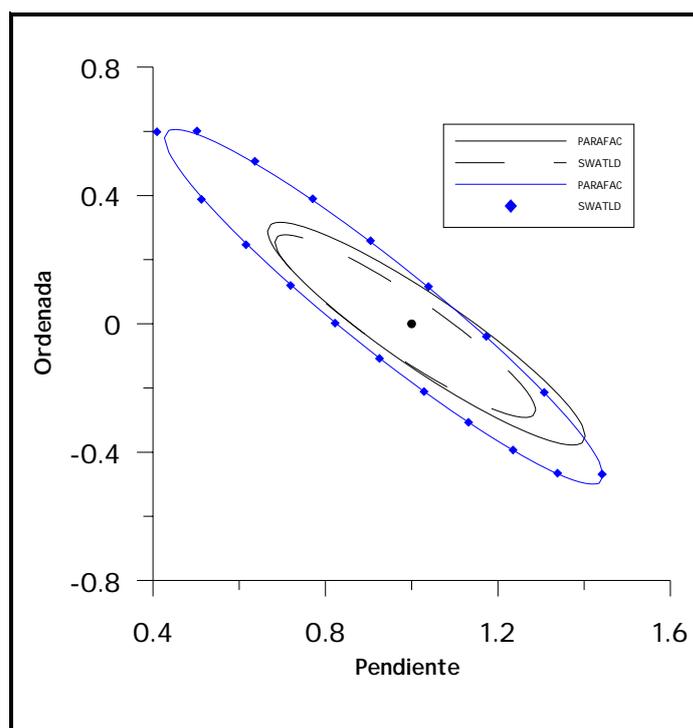


Figura VI.41.- Test de la elipse (EJCRS) de la pendiente y la ordenada correspondiente a la regresión de la concentración predicha frente a la actual. El punto negro marca el punto teórico ($a=0$, $b=1$). Las elipses negras corresponden al Meclofenámico y las azules al Flufenámico

3.- CONCLUSIONES

Se han estudiado las propiedades fluorescentes de los ácidos meclofenámico y flufenámico en disolución acuosa. Se han determinado de forma individual y simultánea dichos ácidos en muestras de orina, empleando técnicas de calibración multivariante de segundo orden (PARAFAC-IS y SWATLD-IS) y medios micelares. Los métodos quimiométricos señalados, se han aplicado según el método de la adición patrón para evitar la el problema de la gran señal que produce el fondo de orina. Se consiguen determinar concentraciones más bajas de dichos analitos en orina, en comparación al método propuesto en el capítulo anterior. Además, se evita la etapa de extracción en cloroformo y se trabaja en medio acuoso, con el considerable ahorro económico y de tiempo.

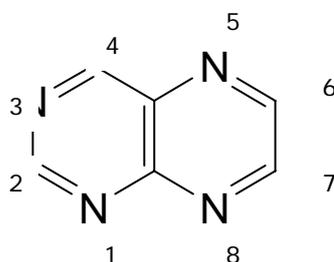
- 1.- Pelizzetti E., Pramauro E. .. *Anal. Chim. Acta*, 1985, 169, 1
- 2.- Cline Love L.J., Habarta J.G., Dorsey J. G., *Anal. Chem.*, 1984, 56 A, 1132
- 3.- Pramauro E., Pelizzetti E., *Comprehensive Analytical Chemistry, Vol: XXXI, Surfactants in Analytical Chemistry*, Nueva York (1996)
- 4.- Thomas J.K. , *Chem. Rev.*, 1980, 80, 283
- 5.- Lindman B., Wennerstrom H., Eicke H. F., “*Micelles*” en *Topics in Current Chemistry*, n°87, Springer-Verlag, Nueva York ,1980
- 6.- Fender J.H., “*Membrane Mimetic Chemistry*”, Wiley, Nueva York,1982
- 7.- McIntire G., *Crit. Reviews in Anal. Chem.*, 1990, 21 257
- 8.- Menger F.M., *Acc. Chem. Res.*, 1979, 12, 111
- 9.- Thomas J.K., *Ibid*, 1977, 10, 133
- 10.- Kalyanasundaram K., Thomas J.K., *J. Phys. Chem.*, 1976, 80, 1462
- 11.- Dill K.A., Kappel D.E., Cantor R.S., Dill J.D., Bendedouch D., Chen S.H., *Nature*, 1984, 309, 42
- 12.- Hinze W.L., Singh H.N., Baba Y., Harvey N.G., *Trends in Anal. Chem.*, 1984, 3 193
- 13.- Hinze W.L., “*Solution Chemistry of Surfactants*”, K.L. Mittal Ed. Plenum Press, Nueva York (1979)
- 14.- Wolf T., Bunsenges Ber.. *Phys. Chem.*, 1981, 85, 145
- 15.- Wolf T., Colloid J., *Interfase Sci.*, 1981, 83, 658
- 16.- Muñoz de la Peña A., T.T. Nolon and Warner I.M., Spectroscopic studies in organized media: an overview, Capítulo 1, en “*Advances in Multidimensional Luminiscence* “, Editores: Warner I.M. y Mc Gown L.B., Volumen 2, JAI Press, London, 1993.
- 17.- Cruces Blanco C., Segura Carretero A. y Cañabate Díaz B., “ Fosforescencia a temperatura ambiente en medios micelares”, Capítulo VII en “ Fosforescencia molecular analítica: Una aproximación práctica”, Editores: Fernández Gutierrez A. y Schulman S.G., Editorial Universidad de Granada, Granada, 2001.
- 18.- Sabry S. M., *Anal. Chim. Acta*, 1998, 367, 41
- 19.- Esteban M., Ariño C., Díaz Cruz J. M., Díaz Cruz M. S., Tauler R., *Trends Anal. Chem.* 2000, 19, 49
- 20.- Schulman S. G., *Acid-Base Chemistry of Excited Singlet States*, in *Modern Fluorescence Spectroscopy*, E. L. Wehry, Ed. (Plenum Publishing Corporation, New York, 1976), vol. 2, Ch. 6.
- 21.- Pramauro E., Pelizzetti E., *Surfactants in Analytical Chemistry. Applications of Organized Amphiphilic Media*. S. G. Weber (Ed.), *Wilson & Wilson’s Comprehensive Analytical Chemistry* (Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1996) vol. XXXI, Ch 4.

- 22.- Marriner S., Bogan J.A., *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1979,2, 109
- 23.- Bro, R; Kiers, H.A.L; *Journal of Chemometrics*, 2003, 17, 274
- 24.- Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, D. González-Gómez, A.C Olivieri, H.C Goicochea, *Anal. Chem*, 2003, 75, 2640
- 25.- González , A.G., Herrador, M.A., Asuero, A.G., *Talanta* 1999, 48, 729-736

1.- PTERIDINAS

Las primeras aportaciones al conocimiento de las denominadas “pteridinas” vienen dadas en 1890 por Hopkins, cuando publica sus investigaciones sobre los pigmentos presentes en las alas de las mariposas.

El nombre “pteridina” proviene del griego “pteron” y se emplea como nombre común para denominar al sistema de anillos condensados pirazino[2,3-d]pirimidina.



Las pteridinas naturales presentan un grupo amino en posición 2 y uno hidroxilo en posición 4, siendo posible una gran variedad de sustituyentes en las posiciones 6 y 7. Estos compuestos están presentes como precursores y también como metabolitos de los denominados folatos. Su similitud estructural con el ácido fólico (precursor del DNA) hace que jueguen un importante papel en diversas rutas bioquímicas en el organismo humano.

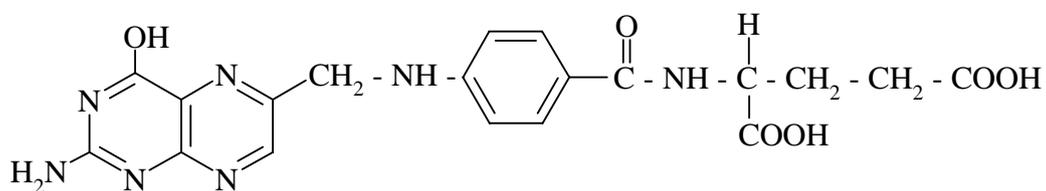


Figura VII.1 .- *Estructura del ácido fólico*

El ácido fólico (ácido pteroilglutámico ó ácido 4-(2-amino-4-hidroxipteridin-6-il)metilamino-benzoil-L-glutámico) es una vitamina hidrosoluble del complejo B (vitamina B₉) que ayuda a la formación de células saludables. Que sea vitamina “hidrosoluble” quiere decir que no permanece en el cuerpo durante mucho tiempo, por tanto, necesitamos un aporte diario de la misma.

El interés en la determinación de este compuesto radica en recientes investigaciones, las cuales indican que su falta está relacionada con numerosos desórdenes celulares, especialmente los relacionados con malformaciones durante el embarazo. Se emplea normalmente en el tratamiento o la prevención de anemia megaloblástica, durante el embarazo, y otras situaciones clínicas a menudo asociadas con el alcoholismo [1].

CARACTERÍSTICAS DEL ÁCIDO FOLÍNICO O LEUCOVORÍN

El ácido folínico (LV), (ácido 5-formiltetrahidrofólico), también denominado Leucovorín, pertenece al grupo de las pteridinas. Por esto, presenta un sistema bicíclico conjugado conteniendo 4 átomos de nitrógeno. Su estructura es de la forma:

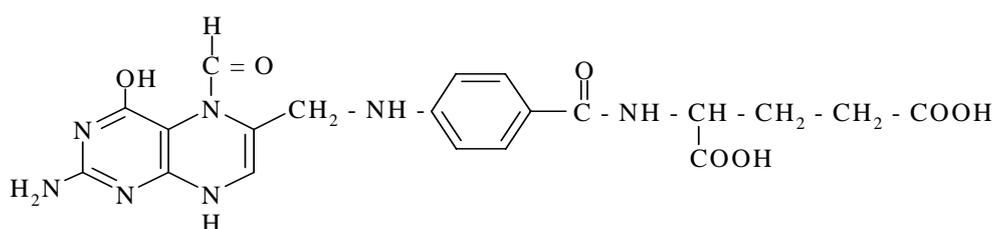


Figura VII.2.- Estructura química del leucovorín

El leucovorín se considera como parte de combinaciones de antineoplásicos, utilizados para el tratamiento de varios desórdenes malignos. Está químicamente relacionado con el ácido fólico y actúa del mismo modo en el cuerpo.

Se usa como terapia de rescate después de dosis intermedias-altas de metotrexato y también como modulador del antagonista de la pirimidina 5-fluoruracil (5-FU) [2]. Junto con fluorouracilo se utiliza en el tratamiento de cáncer de colon. También se emplea para el tratamiento o prevención de ciertas anemias.

El LV originado por una reducción química no es estereoespecífico y por lo tanto, resultan cantidades equivalentes de los diastereoisómeros (6R)-LV y (6S)-LV [3]. Su actividad biológica está restringida aparentemente al diastereoisómero (6S)-LV, el cual es convertido rápidamente a su metabolito (6S)-5-metiltetrahidrofolato (METHF), mientras que el diastereoisómero (6R)-LV no es metabolizado y es excretado a través de la orina en un tiempo medio alrededor de 7 horas [4,5].

La información acerca de una fuerte interacción entre ambas formas isoméricas, y la poca eficacia del diastereoisómero (6R), hace pensar que el (6R)-LV podría inhibir la acción celular del (6S)-LV y (6S)-METHF. Este hecho ha dado una especial importancia a la capacidad de purificar el (6S)-LV. Para analizar la interacción entre ambos diastereoisómeros y analizar sus farmacocinéticas es conveniente utilizar métodos de HPLC.

CARACTERÍSTICAS DEL METOTREXATO

El metotrexato (MTX) es un principio activo que inhibe competitivamente la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR), impidiendo la formación de tetrahidrofolato, necesario para la síntesis de purinas y pirimidinas y la consecuente formación de DNA y RNA. Por tanto, el MTX se considera como un antifolato con actividad antineoplásica efectiva, en el tratamiento de proliferación de desórdenes celulares.

La eficacia del MTX ha sido demostrada en el tratamiento de desórdenes neoplásicos tales como leucemia linfocítica, linfoma non-Hodgkin, carcinomas de mama, lengua, faringe, coriocarcinoma, sarcoma osteogénico, tumores de vejiga urinaria, tumores de cerebro y neoplasmas cutáneos tales como micosis [6-8]. La actividad antineoplásica del MTX es mayor en dosis elevadas, siendo los primeros ensayos clínicos de este fármaco de hace aproximadamente 40 años.

Propiedades físicas y químicas del MTX:

El MTX, antifolato típico, es un compuesto pteridínico 4-amino-sustituído de la forma:

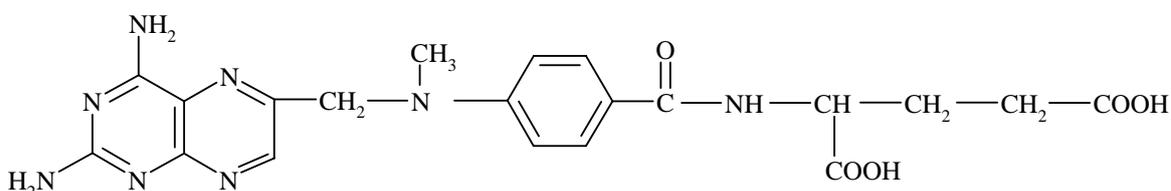


Figura VII.3.- Estructura química del metotrexato

De la sustitución del 4-hidroxil por un grupo amino, resulta un folato análogo con una gran afinidad por la dihidrofolato reductasa (DHFR) y el MTX se considera un inhibidor de este compuesto.

Es insoluble a pH ácido y precipita en orina acidificada para una concentración superior a 2 mM. A pH 7.4, se ioniza, y su solubilidad es 10 veces mayor que en orina ácida. La alcalinización previene la precipitación, mejora la claridad renal y, de este modo, reduce la nefrotoxicidad.

Como ocurre con la mayor parte de los folatos intracelulares, el MTX está sustituido por la adición secuencial de ácido glutámico. Los metabolitos predominantes son las formas penta y hexaglutamatos.

Mecanismo de actividad quimioterapéutica:

El MTX y sus análogos, edatrexato y trimetrexato, inhiben la enzima intracelular DHFR, esencial para la conversión del ácido fólico al folato reducido.

La concentración celular de DHFR es mucho mayor que la necesaria para mantener una cantidad adecuada de folato reducido. Si el MTX liga a DHFR, la síntesis de folato continúa hasta que aproximadamente el 95% de la actividad de la enzima ha sido inhibida. Por tanto, para que el MTX pueda actuar, debe estar en una concentración relativamente alta, para asegurar la inhibición de incluso pequeñas fracciones de DHFR.

Si el MTX inhibe la DHFR, estaremos logrando que no se de una proliferación grande de células que es lo que ocurre en un cáncer.

En la Figura VII.4 se resume la acción del MTX:

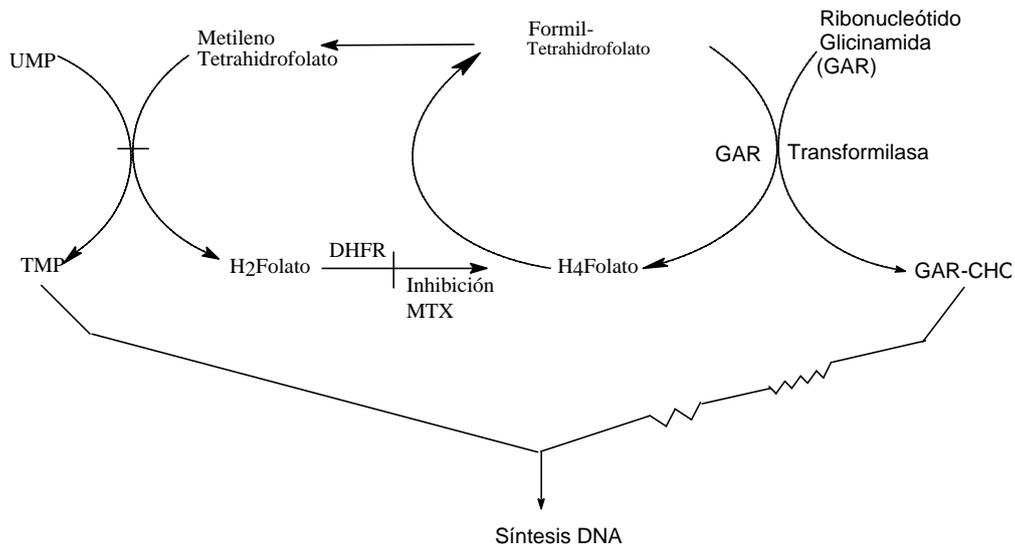


Figura VII.4.- Mecanismo de acción del MTX

El MTX actúa bloqueando dos reacciones: la reducción del dihidrofolato (H₂folato) a tetrahidrofolato (H₄folato) y la conversión de monofosfatodeoxiuridina (UMP) a monofosfatodeoxitimidina (TMP).

Consideraciones terapéuticas:

Se ha demostrado que dosis bajas de MTX (<100 mg/m²) son efectivas en ciertos tratamientos malignos. Pero en muchas ocasiones el MTX debe administrarse en altas dosis (1.000 mg/m²) [9]. Debido a las altas concentraciones extracelulares, el MTX entra en la célula por difusión pasiva y puede acumularse en células que son deficientes en transportadores.

La eficacia de las drogas antifolato se puede extender a la poliglutamación intracelular [9-11]. En la mayoría de las células, la poliglutamación no ocurre hasta que éstas son expuestas a una concentración de MTX de 10^{-6} M durante al menos 6 h. Así, la glutamación es dependiente del tiempo y la concentración [10].

Los pacientes que reciben altas dosis de MTX deben tener un riguroso control, para evitar la toxicidad del tratamiento. La nefrotoxicidad reversible es uno de los graves problemas, seguido de mucositis gastrointestinal, náusea y vómitos, que son señales evidentes de su toxicidad.

La toxicidad intrínseca inducida por MTX puede reducirse mediante uso de leucovorín (LV), que actúa como una estrategia de rescate en el tratamiento terapéutico [8,10]. El LV es una mezcla racémica de los esteroisómeros del N⁵-formiltetrahidrofolato, siendo solo el isómero L el efectivo en el tratamiento de la toxicidad del MTX. El LV protege selectivamente a las células normales (no cancerígenas) de los efectos antimetabólicos del MTX, mientras que las células tumorales no son protegidas y los efectos del MTX continúan. La clave del rescate o “protección”, radica en que el LV puede desplazar al MTX de DHFR, permitiendo la reactivación de la enzima.

Nos podemos preguntar el por qué las células tumorales y normales no se afectan igualmente por LV. La respuesta debe ser que las células tumorales tienen una gran afinidad por la forma MTX-poliglutamato que las células normales no tienen. En presencia de MTX-poliglutamato, no se da el desplazamiento competitivo por parte de LV y la DHFR es inactiva.

La toxicidad en los pacientes debido al MTX es difícil de predecir, ya que varía de un individuo a otro. Concentraciones de 10^{-5} , 10^{-6} y 10^{-7} M a las 24, 48 y 72 h en suero, después de la administración de MTX, son consideradas como tóxicas.

2.- ANÁLISIS MULTIVARIANTE DE TERCER ORDEN

Como hemos podido comprobar en los capítulos anteriores, el análisis de datos multivariantes es una herramienta muy potente, para el desarrollo de métodos analíticos, cuyo objetivo sea la determinación de componentes de interés en muestras complejas [12]. En teoría, la utilización de datos con una estructura dimensional mayor que uno aporta métodos que son más robustos frente a la presencia de interferencias y a los efectos de matriz, en comparación con las metodologías de primer orden.

Así, se ha demostrado que, en algunas situaciones, el análisis multivariante con métodos de orden mayor a uno permite la deconvolución del conjunto de señales instrumentales, separando las aportaciones de los analitos individuales de las correspondientes al resto de los componentes de la matriz. Por otra parte, los instrumentos que generan este tipo de datos se encuentran hoy fácilmente disponibles en los laboratorios analíticos. Ejemplos de instrumentos que generan datos de segundo orden son, por ejemplo, un cromatógrafo de líquidos acoplado con un detector de diodos (HPLC-DAD) [13] o con un detector fluorescente de barrido rápido [14], o un espectrofluorímetro capaz de registrar matrices de excitación-emisión (EEMs) [15].

Uno de los problemas del uso de una técnica acoplada, como una cromatografía-espectroscopía, es la falta de reproducibilidad en los tiempos de retención, lo que provoca la no trilinearidad del modelo de calibración. En muchos casos, es necesario un proceso matemático previo, que permite ajustar los tiempos de retención, de manera que se eviten los errores procedentes de la falta de reproducibilidad de los mismos y, en consecuencia, linearizar los datos.

Muchas de las aplicaciones analíticas publicadas para datos de tres vías están relacionadas con el uso de EEMs como señal analítica. Un ejemplo de esta utilización, se encuentra en el método desarrollado en el capítulo III, para la determinación de sulfatiazol en miel [16]. La razón está en la facilidad de obtener datos fluorescentes de dos-vías de la muestra de interés y datos de tres-vías cuando se tomen sobre varias

muestras conjuntas, excitando la muestra a diferentes longitudes de onda y midiendo la señal emitida a diversas longitudes de onda de emisión. Con la instrumentación de que se dispone hoy día para las medidas de fluorescencia, esto puede hacerse en un periodo de tiempo relativamente corto y de manera automática.

En el contexto de medidas de EEM fluorescentes, se han descrito varios métodos quimiométricos para el análisis de datos de tres vías, bien para resolver mezclas de multicomponentes, o bien para realizar la determinación de algún componente de interés en muestras complejas, aún en presencia de interferencias no calibradas. Un resumen de referencias actualizadas, que reúne una gran variedad de analitos y muestras, analizadas mediante esta técnica ha sido realizado por Swilde y col. [17] y Olivieri y col. [18].

Una lista de los diferentes métodos multivariantes utilizados para resolver problemas de mezclas multicomponentes incluye el Método Generalizado de Reducción de Rango (GRAM) [19], el de Descomposición Trilineal Directo (DTLD) [20], Análisis en Factores Paralelos (PARAFAC) [21], Descomposición Trilineal Alternada Autodescompuesta (SWATLD) [22], Resolución Curva Multivariante Acoplada a Mínimos Cuadrados Alternos (MCR-ALS) [23], Mínimos Cuadrados Parciales N-dimensionales (N-PLS) [24], PLS combinado con Bilinearización Residual (RBL) [25] y las variantes introducidas recientemente de Mínimos Cuadrados Bilineares (BLLS) [26,27] acopladas con RBL. Entre éstas últimas variantes, la más usada es la que combina descomposición de valores singulares (SVD) para la estimación de los perfiles y predicción por mínimos cuadrados, dando lugar a la combinación SVD-LS/RBL.

El método PARAFAC es uno de los más utilizados, particularmente cuando los datos siguen un modelo trilineal, como es el caso de las matrices de excitación-emisión (EEM) [24]. Esto se debe al hecho de que la descomposición de los datos de tres vías construidos con las respuestas de la medida de matrices para un número de muestras es, a menudo, única, mostrando los perfiles espectrales y las concentraciones relativas de los componentes individuales de la muestra, de las que se extraen directamente las

concentraciones puras. Esta propiedad ha sido denominada la “ventaja de segundo orden” [28], constituyendo la base de muchas de las aplicaciones de los modelos de calibración con PARAFAC. Debemos hacer notar que la combinación SVD-LS/RBL también es útil a este respecto, y éste método también es capaz de modelar interferencias no calibradas [29].

Bro y colaboradores publicaron una revisión acerca de los métodos espectroscópicos de análisis que utilizaban métodos de calibración de orden superior a uno, cubriendo los procedimientos publicados hasta 1995 [30]. Ejemplos recientes son los métodos propuestos para la determinación de los siguientes compuestos: hidrocarburos aromáticos polinucleares [31], pesticidas de la familia de los carbamatos [32], mezclas ternarias de derivados del naftaleno [33], trifenilestaño en agua de mar [34,35], clorofilas y feopigmentos [36], verapamil en pastillas farmacéuticas [37], propranolol, amilorida y dipiridamol [38], mezclas binarias de naproxeno y ácido salicílico en suero y de naproxeno, ácido salicílico y ácido salicílico en orina [39], las fluoroquinolonas norfloxacin, enoxacin y ofloxacin en suero [40], doxorubicina en plasma [41], piroxicam en suero [42], los pesticidas carbendazim, fuberidazol y tiabendazol [43], ibuprofeno en preparaciones farmacéuticas y en suero [44], carbamecepin y su principal metabolito, el 10,11-epóxido carbamecepin en preparaciones farmacéuticas y suero [45], ciprofloxacino en orina [18] y sulfatiazol en muestras de miel [16].

En este capítulo se introducen nuevos métodos quimiométricos, Mínimos Cuadrados Trilineales y Unfolded-PLS acoplados a trilinearización residual (TLLS y Unfolded PLS/RTL), que utilizan datos de cuatro vías. Estos métodos han sido desarrollados por nuestro grupo de investigación, en colaboración con el Dr. A.C Olivieri, del Departamento de Química Analítica de la Universidad Nacional de Rosario (Argentina).

Los datos de cuatro vías ofrecen la posibilidad de introducir una dimensión adicional al conjunto de datos de tres vías, permitiendo un incremento teórico de la selectividad. Hasta la fecha, se han realizado muy pocas experiencias con este tipo de datos, dado que los sistemas susceptibles de generarlos son más limitados que los que generan datos de segundo orden. En todos en los que se datalla una aplicación analítica, se ha utilizado el análisis de la evolución con el tiempo de EEMs, mediante reacciones cinéticas no excesivamente rápidas, en las cuales los productos de reacción son especies fluorescentes [46,47]. Un problema para obtener la evolución cinética de las EEMs es el tiempo necesario para registrar la EEM completa de la muestra. De hecho, sólo hay tres referencias en la bibliografía hasta la fecha.

En un primer estudio [47], se monitorizaron las reacciones de degradación de las clorofilas a y b, registrando las EEMs con un fluorímetro convencional, interrumpiendo la reacción en 16 tiempos diferentes entre 0 y 570 minutos. En este caso, el tiempo necesario para obtener las EEMs no es ningún problema, ya que la reacción es muy lenta. En un segundo caso [48] se utilizó un fluorímetro equipado con una cámara CCD como detector, para cuantificar adrenalina y noradrenalina. Dicho fluorímetro ha sido descrito y diseñado por los propios autores, no estando disponible comercialmente [49,50,51]. Las EEMs pueden registrarse en un periodo de tiempo de un segundo con este instrumento, aunque se eligió una integración de 15 segundos para la obtención de cada EEM. Se necesitó un periodo total de tiempo de 900 segundos (15 minutos) para obtener 60 EEMs de cada muestra.

El ejemplo más reciente de calibración con datos de EEMs de cuatro vías [18], ha sido desarrollado por nuestro grupo de investigación y en él se ha utilizado, por primera vez, un espectrofluorímetro de barrido rápido comercial para la adquisición de los datos. Cada EEM se obtenía en 12 segundos, a una velocidad de registro de longitudes de onda de 24000 nm/min, obteniéndose 10 matrices en un tiempo de 0 a 10.8 min, con un intervalo de 72 segundos entre el registro de una matriz y la siguiente. Es decir, se tardaban 12 segundos en el registro de la matriz de datos y el

espectrofluorímetro permanecía parado durante 60 segundos, antes de comenzar el registro de la siguiente matriz. Sin embargo, es de esperar que en un futuro cercano se incremente este tipo de análisis, en el momento en que estos espectrofluorímetros de barrido rápido comerciales se popularicen.

Cuando usamos datos de orden mayor que dos, la noción de trilinearidad que hemos empleado con datos de 3 vías, puede extenderse a cuadrilinearidad, etc. La idea básica es la misma: fijando los parámetros en todas las dimensiones menos una, el modelo es lineal en el conjunto restante de parámetros. Esto se cumple para todos los conjuntos de parámetros. Los datos de cuatro vías exhibirían en principio las mismas ventajas que los de tres vías, manteniendo la ventaja de segundo orden, aportando una selectividad adicional y conduciendo a mejoras en el modelo predictivo. Booksh y Kowalski, cuando se refieren a datos de cuatro vías (calibración de tercer orden), sugieren el término de “ventaja de tercer orden” [17]. También Kowalski, en la presentación de un libro publicado recientemente sobre análisis multivariante, hace referencia otra vez a la “ventaja de tercer orden” [17], aunque las implicaciones analíticas de este término no se han explorado todavía. Es decir, no hay evidencias experimentales que demuestren la existencia de una ventaja adicional, al utilizar datos de 4 vías, respecto al uso los de 3 vías. Por ello, aún no se encuentran en la bibliografía referencias a la teórica “ventaja de tercer orden”, aún cuando de manera empírica parece evidente que el introducir un parámetro informativo más del sistema, debe conducir a mejoras en el modelo predictivo.

En el presente Capítulo se describe con detalle una nueva herramienta quimiométrica para el análisis de datos instrumentales de cuatro vías, basado en una extensión de SVD-LS acoplado con RBL para una dimensión más, y llamado Mínimos Cuadrados Trilineares (TLLS) con Trilinearización Residual (RTL), capaz de resolver el problema de componentes no calibrados. Se describe también la combinación de Unfolded-PLS con RTL, como una extensión de Unfolded-PLS acoplado con RBL para una dimensión adicional. Comparamos el método TLLS con PARAFAC y también con la

combinación Unfolded PLS/RTL, respecto a un ejemplo numérico simulado utilizando cálculos tipo Monte Carlo, y respecto a un ejemplo experimental que implica la determinación de fármacos anticancerígenos, en una aplicación analítica en la que se requiere la ventaja de segundo orden. Dicho ejemplo experimental es una extensión del trabajo ya mencionado [18] en el que se pretende poner en evidencia que el nuevo método TLLS claramente manifiesta la ventaja de segundo orden. De este modo, el problema de la existencia de interferencias no calibradas se soluciona utilizando estas nuevas herramientas quimiométricas.

Los datos experimentales de cuatro vías mencionados proceden de los estudios cinético fluorescentes, correspondientes a un sistema compuesto por la combinación de los antineoplásicos metotrexato y leucovorin. Dicho sistema, como ya se ha mencionado, sirvió de base para proponer un nuevo método de determinación simultánea de estos dos compuestos en muestras de orina [18]. El metotrexato recientemente se ha utilizado también como un agente inmunosupresor en transplantes de órganos, en el tratamiento de algunas enfermedades autoinmunes, y en la terapia de asma severos y artritis reumatoides [52]. El inherente riesgo de toxicidad que comporta la utilización de altas dosis terapéuticas de MTX, hace necesaria su determinación en fluidos biológicos y la coadministración del ácido folínico (LV; leucovorín, N⁵-formiltetrahidrofolato), el cual se usa como agente de rescate. Como ya hemos expuesto, la presencia de ácido folínico permite administrar altas dosis de metotrexato sin riesgo de toxicidad. En el tratamiento de leucemias linfáticas agudas, linfomas y osteosarcoma [53] se han utilizado altas dosis de MTX ($> 500 \text{ mg/m}^2$) combinado con LV.

MTX está presente en diversas muestras biológicas, como plasma, suero, orina o saliva y puede extraerse, separarse y detectarse bajo una variedad de condiciones cromatográficas. Así Rubino publicó una revisión [54] en la que más de 70 artículos discuten ensayos cromatográficos para MTX y sus metabolitos, en algunos de los cuales se usa detección fluorescente. El uso de HPLC para la determinación de folatos está

también bien documentado, habiéndose propuesto varios métodos de cromatografía líquida para la determinación de LV en mezclas de folatos y antifolatos, mediante una combinación de detección UV y fluorimétrica [55].

La determinación simultánea de MTX y LV presenta algunas dificultades [56]. Para este propósito se han propuesto: HPLC utilizando una post-columna en línea, irradiación UV y detección fluorescente [56]; electroforesis capilar [57] y calibración multivariante [58], basada en la señal neta del analito de datos espectrofotométricos.

Una propiedad interesante que presentan ambos analitos es que pueden transformarse en derivados altamente fluorescentes por reacción con peróxido de hidrógeno o permanganato potásico. Anteriormente, se han establecido las propiedades fluorescentes de los productos generados por reacción con el permanganato potásico y se han propuesto dos métodos cinético-fluorimétricos, basados en la oxidación del analito a diferentes valores de pH [59,60]. Estas reacciones cinéticas, forman la base de la presente metodología para la generación de datos de cuatro-vías, los cuales son adecuados para la determinación simultánea de metotrexato y leucovorín en muestras de orina [18].

3.-TEORÍA

➤ *PARAFAC*

Una muestra produce un dato de tercer orden cuando se obtiene una matriz de datos de dimensiones $J \times K \times L$, donde J, K y L denotan el número de longitudes de onda de emisión, longitudes de onda de excitación y medidas de tiempo en cada una de las tres dimensiones. Por ejemplo, en la medida cinética de matrices de excitación-emisión (EEM), J es el número de longitudes de onda de emisión, K es el número de longitudes de onda de excitación y L es el número de datos en el tiempo. Para obtener la

ventaja de segundo orden, las I matrices de calibración $\underline{\mathbf{X}}_{i,\text{cal}}$ se juntan con la matriz de la muestra desconocida $\underline{\mathbf{X}}_u$ en una matriz de datos de cuatro vías \mathbf{X} , cuyas dimensiones son $[(I + 1) \times J \times K \times L]$. Si \mathbf{X} sigue un modelo quadrilinear PARAFAC, puede describirse matemáticamente en términos de cuatro vectores para cada componente responsable de la respuesta. Estos cuatro vectores son designados como \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n y \mathbf{d}_n y recogen los valores de concentraciones relativas $[(I+1) \times 1]$, los perfiles de emisión $(J \times 1)$, los perfiles de excitación $(K \times 1)$ y los perfiles de tiempo $(L \times 1)$ respectivamente para el componente n , respectivamente. La expresión aplicable es [61]:

$$X_{ijkl} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} d_{ln} + E_{ijkl} \quad (1)$$

donde N es el número total de componentes, a_{in} es la concentración relativa del componente n en la muestra i , y b_{jn} , c_{kn} y d_{ln} son las intensidades normalizadas de emisión j , de excitación k , y tiempo l , respectivamente. Los valores de E_{ijkl} son los elementos de la matriz \mathbf{E} , la cual es un término de error residual de las mismas dimensiones que \mathbf{X} . Los vectores columnas \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n y \mathbf{d}_n se recogen en las correspondientes matrices loadings \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{C} y \mathbf{D} (\mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n y \mathbf{d}_n normalmente se normalizan a la unidad).

El modelo descrito por la ecuación 1 define la descomposición de \mathbf{X} , que permite conocer los perfiles espectrales (\mathbf{B} y \mathbf{C}), perfiles de tiempo (\mathbf{D}) y concentraciones relativas (\mathbf{A}), de los componentes individuales en las $(I+1)$ mezclas, tanto si son químicamente conocidos como si no. Esto constituye la base de la “ventaja de segundo orden”. La descomposición se realiza normalmente a través de un esquema de minimización mediante mínimos cuadrados alternos (*alternating least-squares*, ALS) [63,21].

Para la aplicación del modelo PARAFAC en calibración multivariante hay que tener en cuenta una serie de etapas que son: **1)** establecimiento del número de componentes que provocan respuesta, **2)** identificación específica de los componentes a partir de la información que provee el modelo y **3)** calibración del modelo para obtener las concentraciones absolutas para un componente particular, en una muestra desconocida.

El número de componentes óptimo (N) se puede estimar por varios métodos. Una de las técnicas utilizadas es CORCONDIA, que consiste en una herramienta de diagnóstico que considera el parámetro interno de PARAFAC, conocido como “core consistency” o “consistencia del núcleo” [63,64]. La identificación de los constituyentes químicos bajo investigación se consigue con la ayuda de los tres perfiles estimados, espectros de emisión, espectros de excitación y perfiles cinéticos, comparándolos éstos con los de disoluciones patrones del analito de interés. Es necesario hacer esto porque los componentes que se obtienen por descomposición de \mathbf{X} , se ordenan de acuerdo a su contribución a la varianza espectral y este orden no se mantiene necesariamente cuando se cambia la muestra desconocida.

Las concentraciones absolutas de los analitos se obtienen después de la calibración, porque la descomposición del sensor de cuatro vías sólo provee valores relativos de concentración, que se encuentran contenidos en la matriz \mathbf{A} . La calibración se realiza por medio de un conjunto de patrones de concentraciones conocidas (contenidas en el vector \mathbf{y} de dimensiones $I \times 1$) y regresión de los primeros I elementos de la columna \mathbf{a}_n frente a \mathbf{y} :

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1n} \mid \dots \mid a_{In}] \quad (2)$$

donde “+” implica calcular la pseudo-inversa de la matriz \mathbf{y} . La conversión de concentraciones relativas de n a absolutas en la muestra desconocida se realiza mediante

división del último elemento de la columna $\mathbf{a}_n [a_{(I+1)n}]$ por la pendiente de la gráfica de calibración K :

$$y_u = a_{(I+1)n} / k \quad (3)$$

➤ *TLLS*

El método de tercer orden TLLS es una extensión para datos de 4 vías del de segundo orden SVD-LS, una de las variantes de BLLS, cuya formulación discuten con detalle Linder y col. [26,27]. Igual que en PARAFAC, se requiere un conjunto de calibración compuesto de I mezclas de los N_{cal} analitos. Sin embargo, a diferencia de PARAFAC, la información sobre la concentración del analito se introduce en BLLS en la etapa de calibración (sin incluir la muestra desconocida). Así, se obtienen aproximaciones a las matrices del analito puro \mathbf{S}_n a concentración unidad. Éstas se calculan mediante los siguientes pasos: **1)** se obtienen las matrices ponderadas de concentración, \mathbf{T}_n , de tamaño $J \times K$ (tamaño de la matriz de calibración), **2)** se calcula la matriz de productos de concentraciones, \mathbf{D} , de tamaño $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$, y **3)** se estiman las matrices \mathbf{S}_n a partir de \mathbf{D} y las N_{cal} matrices \mathbf{T}_n .

$$\mathbf{T}_n = \sum_{i=1}^I Y_{in} \mathbf{X}_{i,\text{cal}} \quad (4)$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \quad (5)$$

$$\mathbf{S}_n = \sum_{n'=1}^N (D^{-1})_{nn'} \mathbf{T}_{n'} \quad (6)$$

Las \mathbf{S}_n matrices, de dimensión $J \times K$, (una por cada uno de los N_{cal} analitos) permiten la estimación de los perfiles espectrales de los analitos calibrados, empleando el estimador de perfiles basado en la descomposición en valores singulares (SVD), procedimiento que tiene en cuenta el SVD de cada analito para cada uno de los \mathbf{S}_n (SVD₁) [26,27]:

$$(g_n, \mathbf{b}_n, \mathbf{c}_n) = \text{SVD}_1(\mathbf{S}_n) \quad (7)$$

donde g_n es el primer valor singular, y \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n son los $J \times 1$ y $K \times 1$ autovectores izquierdo y derecho de \mathbf{S}_n , respectivamente, los cuales constituyen los perfiles en ambas dimensiones de la matriz de datos. Los perfiles para todos los analitos se juntan en las matrices de calibración \mathbf{B}_{cal} y \mathbf{C}_{cal} que son similares a las descritas anteriormente en PARAFAC, excepto que no incluyen los posibles componentes no modelados, que pueden aparecer en muestras desconocidas. Hay que hacer notar que los componentes calibrados no necesitan ser identificados en SVD-LS, sino que el propio algoritmo los identifica automáticamente.

Si es exacta la calibración del modelo, \mathbf{B}_{cal} y \mathbf{C}_{cal} pueden emplearse para estimar la concentración de los analitos en muestras desconocidas. La ecuación de predicción, mediante mínimos cuadrados, viene dada por [26,27]:

$$\mathbf{y}_u = [(\mathbf{G} \mathbf{B}_{\text{cal}})^T (\mathbf{G} \mathbf{B}_{\text{cal}}) * (\mathbf{C}_{\text{cal}}^T \mathbf{C}_{\text{cal}})]^{-1} \text{Diag}[(\mathbf{G} \mathbf{B}_{\text{cal}})^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}}] \quad (8)$$

donde \mathbf{y}_u es un vector de dimensiones $N_{\text{cal}} \times 1$, que contiene las concentraciones predichas de los N_{cal} analitos calibrados, “*” indica la operación producto, \mathbf{X}_u es la matriz de datos desconocidos, \mathbf{G} la matriz diagonal de dimensiones $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$, cuyos elementos diagonales son los g_n valores de descomposición (7), y “Diag” convierte la diagonal principal de la matriz $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ $(\mathbf{B}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}})$ en un vector $N_{\text{cal}} \times 1$.

Como se ha demostrado recientemente [65], la ecuación (8), es el resultado de una minimización por mínimos cuadrados, equivalente a computar primero la matriz \mathbf{S}_{cal} de dimensiones $JK \times N_{\text{cal}}$, a partir de los perfiles del analito vectorizado [la notación $JK \times N_{\text{cal}}$ para el tamaño de la matriz \mathbf{S}_{cal} implica que su tamaño es (J veces K) por N_{cal}]:

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1 (\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) | g_2 (\mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) | \dots | g_{N_{\text{cal}}} (\mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (9)$$

donde \otimes implica el producto de Kronecker. Las concentraciones de los analitos en las muestras desconocidas se predicen como:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{cal}^+ \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (10)$$

Es interesante resaltar que la etapa de calibración representada por las ecuaciones (4)-(6) es equivalente al método de mínimos cuadrados clásicos (CLS) concatenado, aproximación que se lleva a cabo trabajando con matrices de datos vectorizados. En efecto, las ecuaciones (4)-(6) pueden escribirse también de la siguiente manera. Primero los datos de calibración se vectorizan y agrupan en la matriz \mathbf{V}_x :

$$\mathbf{V}_x = [\text{vec}(\mathbf{X}_{1,cal}) \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{2,cal}) \mid \dots \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{L,cal})] \quad (11)$$

después se emplea el procedimiento de mínimos cuadrados directos para obtener \mathbf{S}_n , análogo a mínimos cuadrados clásicos:

$$\mathbf{V}_s = \mathbf{V}_x \mathbf{Y}^{T+} \quad (12)$$

donde \mathbf{V}_s (de tamaño $JK \times N_{cal}$) contiene la matriz vectorizada \mathbf{S}_n :

$$\mathbf{V}_s = [\text{vec}(\mathbf{S}_1) \mid \text{vec}(\mathbf{S}_2) \mid \dots \mid \text{vec}(\mathbf{X}_{N,cal})] \quad (13)$$

Esto completa la idea de que SVD-LS es similar a un análisis mediante el método CLS, excepto que los perfiles necesarios para la ecuación (9) se obtienen después de desarrollar $\text{vec}(\mathbf{S}_n)$ [ecuación (13)], seguido del análisis SVD.

Se entiende así que la extensión de SVD-LS a una dimensión más implica un esquema de calibración similar al de las ecuaciones (11)-(13), es decir, reemplazando $\text{vec}(\mathbf{X}_{i,cal})$ por $\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_{i,cal})$ en la ecuación (11) y $\text{vec}(\mathbf{S}_n)$ por $\text{vec}(\underline{\mathbf{S}}_n)$ en ecuación (13). Así, la analogía implica también reemplazar el operador SVD por una descomposición Tucker3 de cada una de las matrices $\underline{\mathbf{S}}_n$:

$$(g_n, \mathbf{b}_n, \mathbf{c}_n, \mathbf{d}_n) = \text{Tucker3}(\underline{\mathbf{S}}_n) \quad (14)$$

Este procedimiento calcula el primer elemento g_n y los perfiles normalizados \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n y \mathbf{d}_n en los tres modos para cada analito calibrado. Análogamente a la ecuación (9):

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1 (\mathbf{d}_1 \otimes \mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) \mid g_2 (\mathbf{d}_2 \otimes \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) \mid \dots \mid g_{N_{\text{cal}}} (\mathbf{d}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (15)$$

lo cual conduce a la siguiente ecuación de predicción para TLLS:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) \quad (16)$$

- “Ventaja de segundo orden” con TLLS

Cuando en la matriz \mathbf{X}_u aparecen componentes no calibrados, la ecuación (16) no sirve para la predicción del analito. En este caso, los residuos del procedimiento de predicción de TLLS, s_p , serán anormalmente grandes comparados con el ruido instrumental típico, (éste último puede conocerse fácilmente mediante medidas de réplicas del blanco):

$$s_p = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_p)\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) - \mathbf{S}_{\text{cal}} \mathbf{y}_u\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} \quad (17)$$

donde $\|\cdot\|$ indica la norma de Euclide.

Si aparece una interferencia en la muestra desconocida, se aplica un procedimiento iterativo separado, llamado trilinearización residual. Consiste en la estimación de los perfiles de los interferentes \mathbf{b}_{int} , \mathbf{c}_{int} y \mathbf{d}_{int} por un procedimiento que involucra la minimización de la matriz de los residuos $\underline{\mathbf{E}}_u$, calculados cuando se ajustan los datos de la muestra a la suma de las contribuciones de los componentes :

$$\underline{\mathbf{X}}_u = \sum_{n=1}^{N_c} \underline{\mathbf{S}}_n' y_{n',u} + \underline{\mathbf{X}}_{\text{int}} + \underline{\mathbf{E}}_u \quad (18)$$

donde $\underline{\mathbf{X}}_{\text{int}}$ es la señal de tres vías de la interferencia reconstruida usando el modelo Tucker3.

Durante la minimización, los perfiles de la interferencia se estiman por el análisis Tucker3 de la matriz residual E_p mostrada en la ecuación (17), usando el primer componente principal:

$$(g_{\text{int}}, \mathbf{b}_{\text{int}}, \mathbf{c}_{\text{int}}, \mathbf{d}_{\text{int}}) = \text{Tucker3}(\underline{\mathbf{E}}_p) \quad (19)$$

Las concentraciones de los analitos podrían ser calculadas por una expresión similar a la ecuación (16), excepto que \mathbf{S}_{cal} se reemplaza por \mathbf{S}_{exp} , una versión expandida de \mathbf{S}_{cal} :

$$\mathbf{S}_{\text{exp}} = [\mathbf{S}_{\text{cal}} \mid g_{\text{int}} (\mathbf{d}_{\text{int}} \otimes \mathbf{c}_{\text{int}} \otimes \mathbf{b}_{\text{int}})] \quad (20)$$

El número de interferencias N_i puede evaluarse comparando los residuos finales s_u con el nivel de ruido instrumental, donde:

$$s_u = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_u)\| / [JKL - (N_{\text{cal}} + N_i)]^{1/2} \quad (21)$$

donde $\underline{\mathbf{E}}_u$ proviene de la ecuación (18). Típicamente, una gráfica que represente s_u frente al número de componentes, mostraría un decrecimiento del valor de éste, comenzando con un valor s_p cuando $N_i = 0$, hasta estabilizarse con un valor compatible con el del ruido instrumental, permitiendo así localizar el número correcto de componentes. Cada

vez que se añade un nuevo componente al modelo, el análisis Tucker3 mostrado en la ecuación (19) se lleva a cabo usando los N_i componentes principales.

➤ *UNFOLDED PLS/RTL*

En esta sección se describe un breve resumen de una nueva técnica, la combinación de unfolded PLS y RTL. Ha sido desarrollado en analogía con la metodología RBL ya descrita, la cual añade la ventaja de segundo orden a PLS [25], extendiéndolo a una dimensión más. El paso de calibración en esta metodología es el conocido modelo PLS, en el que las matrices de los vectores directores \mathbf{P} y de los vectores directores ponderados \mathbf{W} (ambos de tamaño $JKL \times A$) se obtienen de las señales de calibración y concentración, donde A es el número de factores necesarios para modelar la matriz de calibración. La calibración también provee un vector \mathbf{v} (de tamaño $A \times 1$) de los coeficientes de regresión, el cual convierte el conjunto de escalares de la muestra \mathbf{t}_u en la concentración para el analito calibrado:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (22)$$

donde:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) \quad (23)$$

Cuando se requiere la ventaja de segundo orden, puede aplicarse el procedimiento RTL, de forma análoga a lo discutido en TLLS, con los siguientes cambios: la matriz de residuos, $\underline{\mathbf{E}}_p$, que se requiere en la ecuación (19) se obtiene después de convertir en una matriz de tres vías $J \times K \times L$ el vector de los residuos de predicción:

$$\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_p) = \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) - \mathbf{P} (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u)$$

Durante este procedimiento, \mathbf{P} se mantiene constante en los valores de calibración, y \mathbf{t}_u se varia hasta que el residuo final $\|\mathbf{e}_u\|$ se minimiza, donde:

$$\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + g_{\text{int}} (\mathbf{d}_{\text{int}} \otimes \mathbf{c}_{\text{int}} \otimes \mathbf{b}_{\text{int}}) + \mathbf{e}_u \quad (24)$$

Una vez que RTL converge, el nuevo vector de escalares \mathbf{t}_u permite predecir la concentración del analito mediante la ecuación (22), en la que el vector \mathbf{v} se calcula a partir de la calibración.

4.-CONJUNTOS DE CALIBRACIÓN Y DE VALIDACIÓN

Se prepararon dos conjuntos de calibración por separado, compuestos por cinco muestras cada uno. El primero se utilizó para la determinación de MTX y el segundo para la de LV. Los métodos se validan con un conjunto de validación de muestras desconocidas, conteniendo diferentes concentraciones de cada uno de los compuestos, en presencia del otro como interferente. Es decir, no se utiliza el tratamiento usual en estos casos, en el que se suele preparar una matriz de calibración, que incluye muestras que contienen mezclas de los dos analitos de interés, en distintas proporciones. Por el contrario, se pretende enfocar el problema considerando, en primer lugar, que el analito de interés es metotrexato. Así, la presencia en las mismas de LV se considera simplemente como una interferencia. De manera similar, utilizando el segundo conjunto de calibración, se determina solamente leucovorín en el conjunto de muestras de validación, siendo el metotrexato considerado en este caso como un interferente.

En el primer conjunto de calibración, los patrones contenían cinco niveles igualmente espaciados de concentraciones en el rango entre 0.00 y 1.00 mg.L⁻¹ de MTX, mientras que en el segundo conjunto, los cinco niveles igualmente espaciados de concentración estaban en el rango de 0.00 hasta 0.50 mg.L⁻¹ de LV. Para preparar las muestras, una alícuota de 3 mL de una disolución conteniendo MTX y/o LV

(volúmenes adecuados de soluciones diluidas), y 2 mL de tampón borax de pH 9.4 se colocaron en una celda de cuarzo, se adicionaron 50 μL de KMnO_4 0.028 M y se mezclaron. Se registró la evolución cinética de las matrices fluorescentes de excitación-emisión (EEM) de las correspondientes disoluciones para obtener los datos para llevar a cabo el análisis de datos de cuatro vías. Los rangos de longitud de onda seleccionados fueron: la emisión desde 335 a 490 nm, con un intervalo de 5 nm ($J = 32$ longitudes de onda) y la excitación desde 255 hasta 315 nm, con un intervalo de 6 nm ($K = 11$ longitudes de onda), obteniendo un número total de puntos espectrales por matriz de 352. La alta velocidad de registro del aparato permitía la adquisición completa de una EEM en un tiempo de 12 segundos, siendo la velocidad de registro de 24.000 nm/min, en el rango de longitud de onda seleccionado.

En la dimensión temporal, las matrices de excitación-emisión se obtuvieron a intervalos de 72 segundos, para tiempos de reacción que variaban entre 0 y 10.8 minutos. Se recogieron las matrices a diez tiempos diferentes de 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4, 9.6 y 10.8 minutos. Así, la matriz tridimensional de datos consistía en un total de 3520 puntos por muestra ($32 \times 11 \times 10$).

El conjunto de validación estaba compuesto por cinco muestras, preparadas de la misma forma que el conjunto de muestras de calibración, pero utilizando un diseño aleatorio, es decir, seleccionando las concentraciones de ambos analitos de forma aleatoria dentro del rango de calibración de cada analito. Los detalles de la composición de estas muestras se encuentran recogidos en la Tabla VII.1.

En conclusión, los conjuntos de calibración y de validación se han diseñado con objeto de demostrar la existencia de “la ventaja de segundo orden” en los tres métodos de calibración probados, PARAFAC, TLLS y unfolded-PLS combinado con RTL. Así, cuando se realiza la calibración para metrotexato, por ejemplo, LV se considera como una interferencia, y viceversa. Esto nos permite analizar los algoritmos quimiométricos, en cuanto a sus capacidades, para la obtención de los perfiles espectrales de emisión, de

excitación y de los perfiles espectrales temporales, así como para la determinación del analito de interés en presencia de una interferencia no calibrada.

5.- SIMULACIONES NUMÉRICAS

En primer lugar, se ha llevado a cabo una comparación del modelo PARAFAC de cuatro vías con los modelos TLLS y unfolded-PLS combinado con RTL, utilizando simulaciones numéricas de Monte Carlo. Las matrices de datos de tercer orden se obtuvieron para un conjunto de muestras desconocidas que contenían dos componentes diferentes. Los modelos se calibraron con dos conjuntos diferentes de muestras de calibración: **1)** Se calibraron ambos compuestos, por lo que la ventaja de segundo orden no se requería estrictamente y **2)** Sólo se calibró uno de estos componentes, por lo que se requiere la ventaja de segundo orden para posteriores predicciones de muestras desconocidas, que contienen al otro componente como interferencia.

Los datos de las muestras de calibrado se produjeron comenzando por perfiles del componente puro en tres dimensiones sin ruido, imitando la dependencia con el tiempo de las matrices fluorescentes de excitación-emisión. Los perfiles que se emplearon en las tres dimensiones (normalizados a la unidad) se muestran en la Figura VII.5.

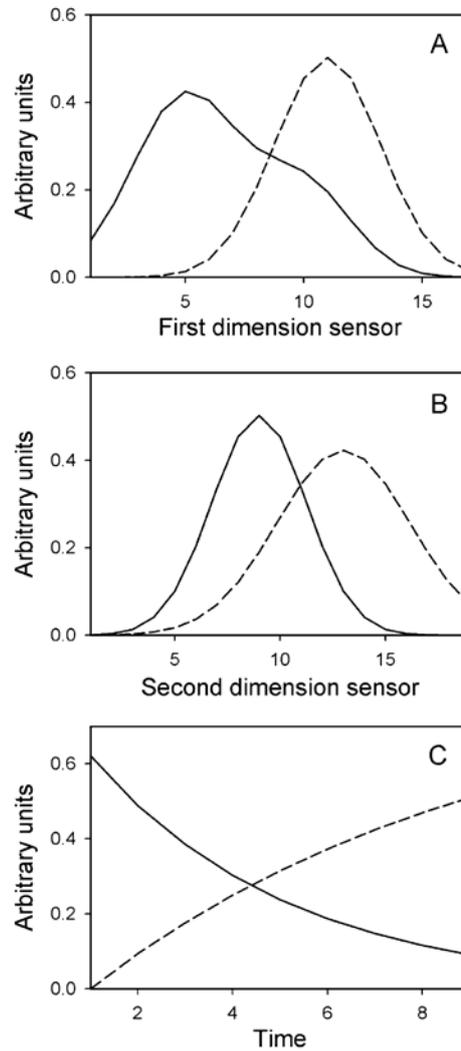


Figura VII.5.- *Perfiles teóricos en las tres dimensiones (A, primera, B, segunda y C, tercera dimensión) para los estudios de simulación numérica. La línea sólida corresponde al componente 1 y la punteada al componente 2.*

Las muestras de calibrado de tres vías se crearon a partir de estos espectros, por adición de una distribución Gaussiana aleatoria de ruido.

La siguiente ecuación muestra los elementos del calibrado de muestras de cuatro vías, cuando se calibra un único componente:

$$X_{ijkl,cal} = k_1 (y_{i1} + r_{ijkl} s_{y1}) b_{j1} c_{k1} d_{l1} + r'_{ijkl} s_X \quad (25)$$

donde y_{i1} es la concentración nominal de calibración para el componente 1, k_1 es la constante de proporcionalidad que convierte las concentraciones en los escalares (scores) (en TLLS es idéntica a g_1), s_x y s_y son las desviaciones estándar de la señal instrumental y de la concentración, y los diferentes r_{ijkl} son números aleatorios dados por distribuciones Gaussianas estandarizadas que tienen desviación estándar unidad y media cero. Las tres concentraciones consideradas fueron: 0, 1 y 1.5 unidades de concentración

Cuando se calibran ambos componentes, se aplica la siguiente ecuación:

$$X_{ijkl,cal} = k_1 (y_{i1} + r_{ijkl} s_{y1}) b_{j1} c_{k1} d_{l1} + k_2 (y_{i2} + r'_{ijkl} s_{y2}) b_{j2} c_{k2} d_{l2} + r'_{ijkl} s_X \quad (26)$$

donde y_{i1} y y_{i2} son las concentraciones nominales para cada componente, tomadas de un diseño 3x3 factorial completo de nueve muestras para dos componentes y tres niveles: 0, 1 y 1.5 unidades. En la Figura VII.6 se muestra una representación de datos de tres vías, cuando se computa una mezcla simulada de ambos componentes a nivel de concentración unidad.

Los conjuntos de muestras se crearon de manera similar a la ecuación (26), excepto que el ruido aleatorio sólo se añadió a la señal instrumental, y las concentraciones nominales se seleccionaron aleatoriamente, para cinco muestras diferentes en el rango de 0 a 1.5 unidades:

$$X_{jkl,u} = k_1 y_{1u} b_{j1} c_{k1} d_{l1} + k_2 y_{2u} b_{j2} c_{k2} d_{l2} + r_{jkl} s_X \quad (27)$$

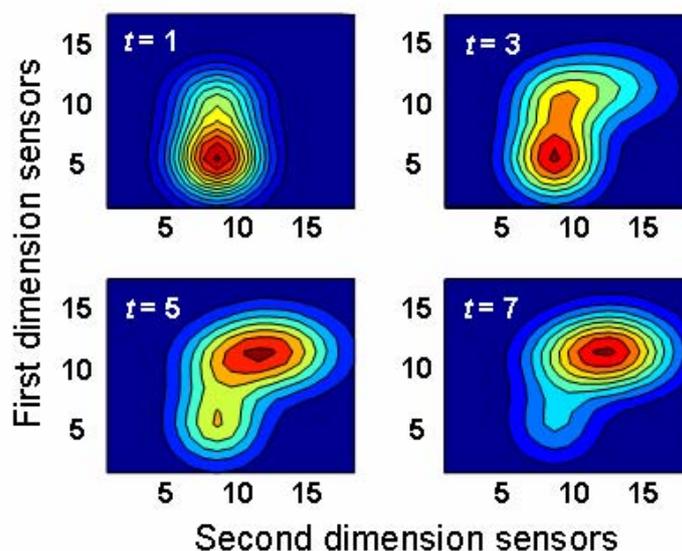


Figura VII.6.- Representación gráfica de un conjunto de datos de tres vías para una muestra simulada a concentración unidad para ambos componentes. Los 4 mapas de contornos se registran a diferentes tiempos seleccionados en el rango de 1 a 9 (mostrados en la esquina). La figura muestra como el pico debido al analito 2 aumenta en intensidad mientras que el correspondiente al analito 1 decrece.

El ruido añadido a las señales instrumentales era de 0,005 unidades (ca. 4% de la máxima señal de calibración y entre un 50 y 80% de la señal media de calibración), y de 0,05 unidades en todas las concentraciones de calibración diferentes de cero (6% en el valor medio). De este modo, las incertidumbres de la concentración relativa y de la señal eran de tamaño comparable.

En el segundo conjunto de simulación, el ruido se añadió sólo a las señales instrumentales de la muestra desconocida. En un caso real, tanto el conjunto de las señales de las muestras de calibración como las experimentales, están afectadas por las mismas fuentes de incertidumbre. Los resultados de la simulación de Monte Carlo, con ruido añadido a las muestras de prueba, son útiles para separar las contribuciones al error que provienen de la muestra, de las que provienen del modelo. Los efectos de las

muestras, a su vez, son sumamente útiles para evaluar la sensibilidad del modelo, la cual puede ser empleada para comparación.

El procedimiento de calibración-predicción se repitió en cada caso 10000 veces, y se determinaron los errores estandar de calibración, los valores medios de la raíz cuadrada de los cuadrados de los errores (RMSE) y las medias de los errores de predicción en el conjunto de muestras de validación.

6.-SOFTWARE

Todos los cálculos se realizaron utilizando MATLAB 6.0 [66]. Las rutinas apropiadas para aplicar PARAFAC de orden N, desarrolladas por Bro, están disponibles en internet [67]. La interfase gráfica se desarrolló en entorno MATLAB en el Departamento de Química Analítica de la Universidad Nacional de Rosario. Esta interfase provee un medio simple de introducir los datos matriciales en el espacio de trabajo de MATLAB, facilitando la selección apropiada de la región espectral de trabajo, dibujando los perfiles de excitación y emisión, los perfiles cinéticos y los gráficos de calibración pseudo-univariante. Dicha interfase, programa MVC3, permite asimismo trabajar con el algoritmo TLLS. Las rutinas para TLLS y unfolded PLS/RTL están disponibles mediante solicitud a los autores.

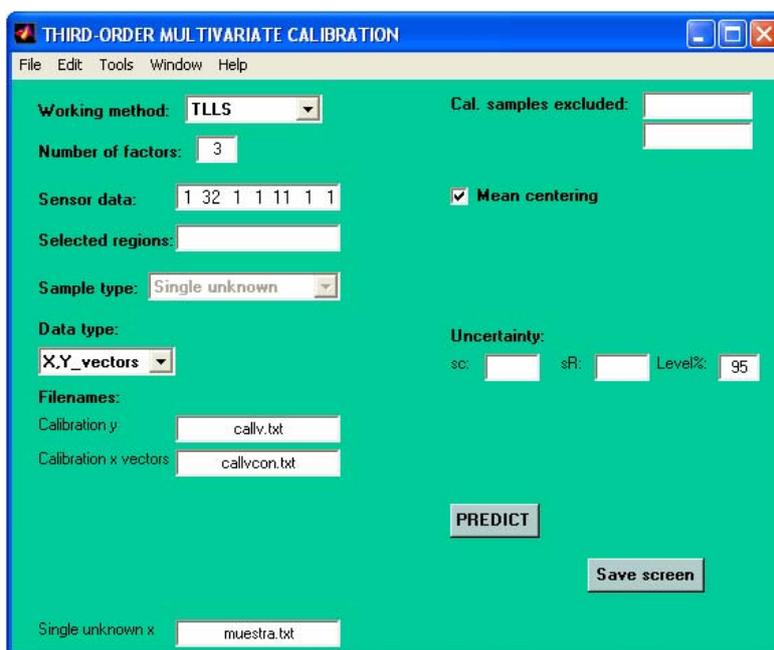


Figura VII.7.- Interfase del programa MVC3 que permite trabajar con PARAFAC y TLLS

7.- DISCUSIÓN DE RESULTADOS

✓ *Simulaciones numéricas*

Las simulaciones numéricas se desarrollaron incluyendo ruido en las señales y concentraciones del conjunto de calibración, intentando imitar una situación real, en la cual las muestras de calibración y las muestras problemas se miden bajo circunstancias similares, y las concentraciones de referencia poseen un error similar. Las concentraciones empleadas en la calibración y en las muestras de validación se muestran en la Tabla VII.1.

Tabla VII.1.- *Concentraciones diseñadas para realizar simulaciones de Monte Carlo*

Muestra	Componente 1	Componente 2
1	0.75	0.20
2	0.23	0.44
3	0.60	0.61
4	0.48	0.79
5	0.02	0.25

Se analizaron dos diferentes situaciones de calibración. En la primera de ellos, ambos componentes están en las muestras de calibración. En la segunda, calibramos solo el componente 1, mientras que el componente 2, que no se incluye en el conjunto de calibración, actúa como una interferencia en el conjunto de validación. En ambos casos PARAFAC requiere dos componentes. TLSS y unfolded-PLS, a su vez, operan calibrando uno o dos componentes, dependiendo de la situación de calibración, e incluyen RTL, usando un componente extra, cuando sólo se calibra 1 componente. Los resultados de los errores de predicción, valores de RMSE y valores promedios se recogen en la Tabla VII.2.

Tabla VII.2.- Resultados de la simulación de Monte Carlo relativos a los errores de predicción y RMSE, cuando se añade ruido en las concentraciones de las muestras de calibración, en las señales de calibración y en las señales desconocidas^a

Se calibran ambos componentes			
Muestra desconocida	Media de la simulación Monte Carlo $s(y_u)$		
	PARAFAC	TLLS	U-PLS/RTL
1	0.0133	0.0139	0.0131
2	0.0066	0.0069	0.0069
3	0.0110	0.0132	0.0111
4	0.0089	0.0103	0.0123
5	0.0048	0.0045	0.0054
RMSE medio	0.008	0.009	0.010
Error de predicción medio	0.007	0.007	0.008
Solo se calibra 1 componente			
Muestra desconocida	Average Monte Carlo $s(y_u)$		
	PARAFAC	TLLS	U-PLS/RTL
1	0.0222	0.0226	0.0215
2	0.0090	0.0083	0.0084
3	0.0192	0.0162	0.0145
4	0.0143	0.0156	0.0122
5	0.0051	0.0061	0.0061
RMSE medio	0.014	0.014	0.015
Bias medio	0.010	0.011	0.010

^a Los valores medios de RMSE y del error de predicción se calcularon para un ruido instrumental de 0.005 unidades, y un nivel de ruido en la concentración de 0.05 unidades, y se promediaron para todo el conjunto de muestras de prueba

Los valores son comparables para los tres métodos, indicando un comportamiento muy similar de predicción de estos modelos quimiométricos. Esto ayuda a confirmar que los métodos TLLS o unfolded PLS, combinados con RTL son serios competidores de PARAFAC cuando se requiere la “ventaja de segundo orden”, una situación de suma importancia en el campo del análisis multicomponente en muestras de composición compleja.

Se realizó otra simulación en la cual el ruido sólo se añadía en las señales de las muestras de validación. Esta segunda simulación prueba que el error estándar en la concentración predicha en cada método era proporcional a la desviación estándar s_x de la ecuación (25), y que la constante de proporcionalidad era similar en los tres métodos. Esto indica que la precisión de todas las metodologías estudiadas es similar.

✓ *Sistema Experimental*

Los datos experimentales de cuatro vías se obtenían del seguimiento cinético de las reacciones de metotrexato y leucovorín con permanganato potásico, produciendo productos altamente fluorescentes. Este sistema ha sido previamente estudiado por nuestro grupo, obteniendo métodos cinéticos-fluorimétricos para la determinación individual de metotrexato [68] y leucovorín [69] y para la determinación simultánea de ambos compuestos en mezclas [18]. La reacción se completa en 10 minutos aproximadamente, y puede ser seguida por registro sucesivo de matrices de excitación-emisión (EEMs) en función del tiempo, como se ha descrito anteriormente. La Figura VII.8. muestra una serie de EEMs para una mezcla patrón de metotrexato y leucovorín, tomadas a diferentes tiempos de reacción en el rango de 0 a 10.8 minutos.

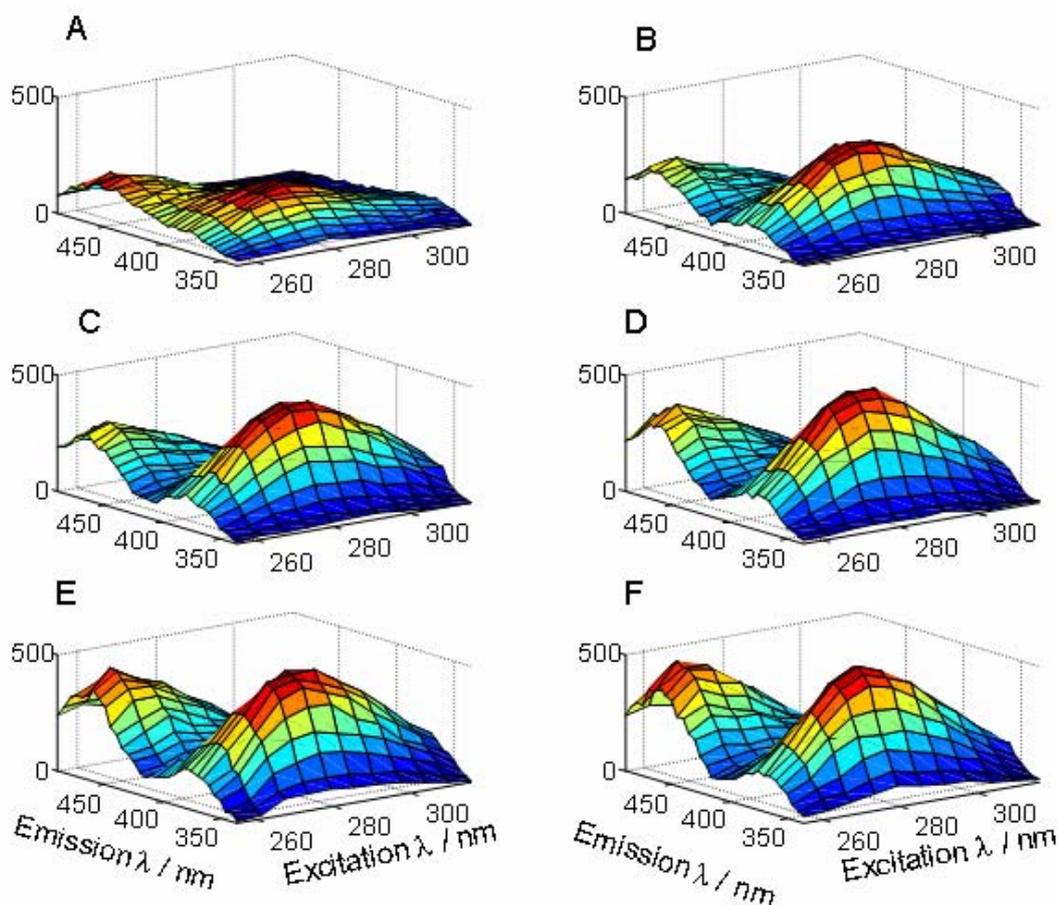


Figura VII.8.- Representación tridimensional de EEMs para una solución acuosa ($pH = 9.4$) conteniendo 0.60 mg L^{-1} de metotrexato y 0.25 mg L^{-1} de leucovorín en función del tiempo y de la oxidación con permanganato. Los tiempos seleccionados en estas gráficas para la evolución cinética de las EEMs son en minutos: A) 0, B) 2.4, C) 4.8, D) 7.2, E) 9.6 y F) 10.8

Cuando el conjunto de cinco muestras de ambos fármacos se analizó con la ayuda de PARAFAC, el análisis del valor de la consistencia del núcleo (core consistency), aplicado a cada una de las muestras analizadas, requiere la consideración de dos especies fluorescentes como era de esperar, dada la composición de la muestra.

Un incremento del número de componentes no mejora el modelo del ajuste, conduciendo a perfiles poco definidos para los constituyentes adicionales.

Los perfiles de emisión y excitación que se encuentran al aplicar PARAFAC (Figuras VII.9A, VII.9B, VII.9D y VII.9E) están bastante de acuerdo con los esperados, en base a los registrados para patrones de analitos puros de ambos compuestos. Además, los perfiles cinéticos (Figuras VII.9C y VII.9F) son también coincidentes con los encontrados en estudios previos [68,69].

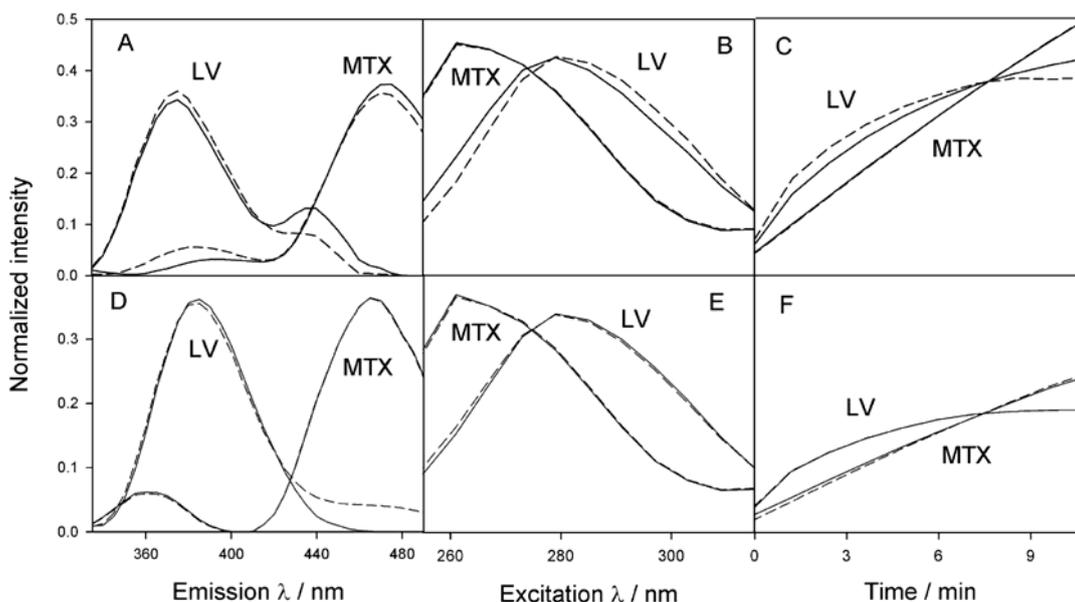


Figura VII.9.- A), B) y C) perfiles de emisión de fluorescencia, excitación y tiempo para ambos componentes, respectivamente (como se indican), normalizados a la unidad, encontrados por PARAFAC (línea continua) y por TLLS (línea discontinua). Los perfiles se obtuvieron después de procesar la primera mezcla de validación usando un conjunto de calibración conteniendo sólo MTX. D), E) y F) Perfiles para ambos componentes cuando el conjunto de calibración sólo contiene LV.

En la Figura VII.9 se observa que los perfiles obtenidos por ambos algoritmos son similares, y que hay coincidencia entre los perfiles extraídos por uno y otro modo de calibración empleado. Los resultados de predicción para ambos modos de calibración (es decir, si MTX o LV es el analito calibrado) se muestran en la Tabla VII.3, en la que puede verse que son razonablemente buenos, teniendo en cuenta que en estudios clínicos, se aceptan errores de predicción de alrededor de $\pm 10\%$.

Tabla VII.3.- Resultados de predicción usando PARAFAC, TLLS y U-PLS/RTL para un conjunto de cinco muestras experimentales, conteniendo mezclas binarias de MTX y LV.^a

	Muestra					RMSE
	1	2	3	4	5	
	MTX					
Nominal MTX	0.14	0.00	0.49	0.60	0.93	
PARAFAC ^b	0.18	0.06	0.61	0.68	0.96	0.08
TLLS ^b	0.19	0.06	0.62	0.70	0.95	0.09
U-PLS/RTL ^b	0.18	0.05	0.62	0.70	0.85	0.10
	LV					
Nominal LV	0.14	0.17	0.31	0.25	0.10	
PARAFAC ^c	0.14	0.16	0.33	0.24	0.17	0.04
TLLS ^c	0.16	0.16	0.31	0.26	0.19	0.05
U-PLS/RTL ^c	0.14	0.19	0.33	0.31	0.18	0.05

^a Todas las concentraciones se expresan en mg L⁻¹.

^b Calibración solo para MTX, considerando LV como interferencia.

^c Calibración solo para LV, considerando MTX como interferencia.

TLLS se aplicó a continuación al conjunto de validación. En todas las muestras, el estudio de los residuos de predicción lleva a la conclusión de que se requiere más de un componente para mejorar el ajuste. De este modo, para aplicar el procedimiento RTL, se realizaron réplicas del blanco para obtener un promedio del nivel de ruido instrumental. En todos los casos, el error de ajuste en TLLS se estabilizaba cuando se consideraba dos componentes, de acuerdo con los resultados de PARAFAC. Además, los perfiles de emisión y excitación y los perfiles de tiempo que se obtienen por RTL son similares a los obtenidos por PARAFAC. Este resultado muestra como conclusión que TLLS da buenos resultados en la obtención de perfiles y que el método disfruta, asimismo, de la ventaja de segundo orden. Los resultados de la predicción se recogen en la Tabla VII.3, conduciendo a la conclusión de que la metodología TLLS muestra una capacidad de predicción comparable con la de PARAFAC.

En el caso de la combinación de Unfolded-PLS con RTL, se empleó una sola variable latente para modelar los datos de calibración, mientras que RTL ayudó a encontrar el componente extra. Los perfiles encontrados para los interferentes eran comparables con los obtenidos por TLLS. Esta metodología también presenta la ventaja de segundo orden para el análisis de las muestras experimentales, obteniendo los resultados que se recogen en la Tabla VII.3, los cuales son similares a los obtenidos por TLLS.

8.- CONCLUSIONES

El uso de datos de órdenes superiores para la resolución de problemas analíticos complejos podría incrementarse en un futuro cercano, debido a las ventajas asociadas a su utilización. Esto conlleva la necesidad de disponer de métodos quimiométricos apropiados para realizar calibraciones con estructuras de datos de órdenes superiores. El presente capítulo presenta un nuevo algoritmo, TLLS, basado en una extensión de SVD-LS, con un orden más. Dicho método constituye una alternativa al método PARAFAC

de cuatro vías, para el análisis y calibración de datos instrumentales de cuatro vías. Una metodología adicional, desarrollada por nosotros, basada en la combinación de Unfolded PLS con RTL, desarrollado como una extensión de Unfolded-PLS combinado con RBL, se comparó con las dos herramientas quimiométricas anteriores. Los resultados obtenidos, de las simulaciones numéricas de Monte Carlo y de datos reales experimentales, llevan a concluir que las nuevas metodologías descritas muestran una capacidad de predicción similar a la de PARAFAC. Se ha demostrado también que TLLS y Unfolded PLS acoplados con RTL, conllevan la “ventaja de segundo orden” y pueden cuantificar la concentración del analito de interés, en presencia de interferentes no modelados.

- 1.- Al-Shammary, F.J., Al-Rashood, K.A., Mian, N.A., Mian, M.S., *Anal. Profiles of Drug Sub.* 1990,19, 221
- 2.- El- Maali, N.A., *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 1992, 27 , 465
- 3.- Milyaev, YuF, Grigor'ev, V.I., Balyatinskaya, L.N., *Zh. Anal. Khim.*, 1990, 45 , 2380
- 4.- Buhl, F. y Hachula, U., *Chem. Anal.*, 1991, 36 , 27
- 5.- Cruces Blanco, C., Segura Carretero, A., Fernández Gutiérrez, A. y Román Ceba, M., *Anal. Lett.*, 1994, 27,1339
- 6.- Bleyer, W.A., *Cáncer*, 1978, 41, 36
- 7.- Goldman, I.D. y Matherly L.H., *Pharmacol. Ther.*, 1985, 28, 77
- 8.- Kamen, B.A.; Folic acid antagonist. In: Powis G, Prough RA, eds.; *Metabolism and action of anti-cáncer drugs. Philadelphia: Taylor and Francis; 1987,141*
- 9.- Ackland S.P. y Schilsky R.L., *J. Clin. Oncol.*, 1987, 5, 2017
- 10.- Covey, J.M., *Life Sci.*, 1980, 26, 665
- 11.-Kris, M.G., Kinaham, J.J. y Gralla, R.J., *Cáncer Res.*, 1988, 48, 5573
- 12.-Faber N.M, Bro R., Hopke P.K, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2003, 65, 119
- 13.-Johnson K., De Juan A., Rutan S.C, *J. Chemometrics* 1999, 13, 331
- 14.-Beltran J.L, Guiteras J., Ferrer R., *Anal. Chem*, 1998, 70, 1949
- 15.-Andersen C.M, Bro R., *J. Chemometrics* 2003, 17, 200
- 16.-Mahedero M.C, Mora Díez N., Muñoz de la Peña A., Espinosa Mansilla A., González Gómez D., Bohoyo Gil D., *Talanta*, 2004, 65, 806
- 17.- Smilde A., Bro R. Geladi P., Wiley, Chichester, *Multi-way Analysis. Applications in the chemical sciences*, 2004
- 18.- Olivieri A.C., Arancibia J.A., Muñoz de la Peña A., Durán-Merás I., Espinosa Mansilla A., *Anal. Chem.* 2004, 76, 5657.
- 19.- Sánchez E., Kowalski B.R., *Anal. Chem.* 1986 ,58 ,496.
- 20.- Sánchez E., Kowalski B.R., *J. Chemometrics* 1988, 2 ,265.
- 21.- R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149-171.
- 22.- Z.P. Chen, H.L. Wu, J.H. Jiang, Y. Li, R.Q. Yu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52 (2000) 75-86.

- 23.- Esteban M., Ariño C., Díaz-Cruz J.N., Díaz-Cruz M.S., Tauler R., *Trends Anal. Chem.* 2000, 19 ,49.
- 24.- Bro R., *J. Chemometrics* 1996,10, 47.
- 25.- Öhman J., Geladi P., Wold S., *J. Chemometrics* 1990 ,4 ,79.
- 26.- Linder M., Sundberg R., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1998 ,42 ,159.
- 27.- Linder M., Sundberg R., *J. Chemometrics* 2002, 16, 12.
- 28.- Booksh K. S., B.R. Kowalski, *Anal. Chem* 1994,66, 782A
- 29.- Damiani P.C, Nepote A.J, Berzotti M., Olivieri A.C, *Anal. Chem*, 2004, 76, 2798
- 30.- Bro R., Workman J.J., Mobley P.R, Kowalski B.R, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 1997,32, 237
- 31.- Beltran J.L, Guiteras J., Ferrer R., *Anal. Chem.*, 1998, 70, 1949
- 32.- Jiji R.D, Booksh K.S, *Anal. Chem.* 2000, 72, 718
- 33.-. Cao Y.Z, Chen Z.P, Mo C.Y., Wu H.L, Yu R.Q, *Analyst* 2000, 125, 2303
- 34.- Saurina J., Tauler R., *Analyst* 2000, 125, 2038
- 35.- Saurina J., Leal C., Compañó R., Granados M., Tauler R., Prat M.D, *Anal. Chim. Acta* 2000, 409, 237
- 36.- Moberg L., Robertson G., Karlberg B., *Talanta* 2001, 54, 161
- 37.- Esteves da Silva J.C.G. , Litao J.M.M, Costa F.S, Ribeiro J.L, *Anal. Chim. Acta* 2002, 453, 105
- 38.- Cao Y.Z., Mo C.Y., Long J.G, Chen H., Wu H.L, Yu R. Q., *Anal. Sci.* 2002, 333
- 39.- Arancibia J.A, Olivieri A.C, Escandar G.M, *Anal. Bioanal. Chem.* 2002, 374, 451
- 40.- Muñoz de la Peña A., Espinosa-Mansilla A., González-Gómez D., Olivieri A.C, Goicochea H.C, *Anal. Chem*, 2003, 75, 2640
- 41.- Trevisan M.G, Poppi R.J, *Anal. Chim. Acta* 2003, 493, 69
- 42.- Arancibia J.A, Escandar G.M, *Talanta.* 2003, 60, 1113
- 43.- Rodríguez-Cuesta M.J, Boque R., Rius F.X, Picón-Zamora D., Martínez-Galera M., Garrido-Frenich A., *Anal. Chim. Acta* 2003, 491, 47
- 44.- Hergert L.A, Escandar G.M, *Talanta* 2003, 60, 235
- 45.- Escandar G.M, González Gómez D., Espinosa Mansilla A., Muñoz de la Peña A., Goicochea H.C, *Anal. Chim. Acta* 2004, 506, 161

- 46.- Olivieri A.C., Arancibia J.A., Muñoz de la Peña A., Durán-Merás I., Espinosa Mansilla A., *Anal. Chem.* 2004, 76, 5657
- 47.- Tan Y., Jiang J.H., Wu H.L., Cui H., Yu R.Q., *Anal. Chim. Acta* 2000,412, 195
- 48.- Nikolajsen R.P.H., Booksh K.S., Hansen A.M., Bro R., *Anal. Chim. Acta* 2003,475, 137
- 49.- Muroski A.R., ., Booksh K.S., Myriek M.L, *Anal. Chem.*, 1996, 68, 3534
- 50.- Jiji R.D., Cooper G.A., Booksh K.S, *Anal. Chim. Acta*, 1999, 397, 61
- 51.- Jiji R. D., Anderson G.G., Booksh K.S., *J. Chemom.*, 2000, 14, 171
- 52.-Parfitt, K.; Sweetman, S.C., Blake, P.S.; Parsons, A.V. *The Extra Pharmacopeia*, 32th ed.; Pharmaceutical Press: London, 1999; 541
- 53.-Graf, N; Winkler, K., Betlemovic, M., Fuchs, N., Bode, U. *J. Clin. Oncol.* 1994, 12, 1443.
- 54.-Rubino, F.M, *J. Chromatogr.*, B 2001, 764, 217
- 55.-Belz, S., Frickel, C.; Wolfrom, C., Nau, H., Henze, G., *J. Chromatogr.*, B., 1994,661,109
- 56.-Mandal, A., Linder, W., *Chromatographia* 1996, 43, 327
- 57.-Sczesny, F., Hempel, G., Boos, J., Blaschke, G., *J. Chromatogr. B.*, Biomed. Appl, 1998, 718, 177
- 58.-Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I.,Rodríguez Gómez, M.J.,Muñoz de la Peña, A., Salinas, F., *Talanta* 2002, 58, 255
- 59.-Durán Merás, I., Espinosa Mansilla, A., Rodríguez Gómez, M.J.; Salinas , F., *Talanta* 2001, 55, 623
- 60.-Espinosa Mansilla, A., Durán Merás, I.; Zamoro Madera, A.; Pedano, L.; Ferreira, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 851
- 61.- Leurgans S., Ross R.T., *Statist. Sci.* 1992, 7, 289.
- 62.- Paatero P, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 1997 , 38, 223.
- 63.- Bro R., *Multi-way analysis in the food industry*, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- 64.- Bro R., H.A.L. Kiers, *J. Chemometrics* 2003, 17, 274.

- 65.-** Faber N.M., Ferré J., Boqué R., Kalivas J.H., *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2002,63, 107.
- 66.-** MATLAB 6.0, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA, 2000.
- 67.-** <http://www.models.kvl.dk/source/>
- 68.-** Durán Merás I., Espinosa Mansilla A., Rodriguez Gómez M.J, Salinas F., *Talanta*, 2001, 55, 623.
- 69.-** Espinosa Mansilla A., Durán Merás I., Zamora Madera A., Pedano L., Ferreira C, *J. Pharm. Biom. Anal.* 2002, 29, 851.

CONCLUSIONES

1.- Se ha llevado a cabo la determinación individual de *metaciclina* y *demeclociclina* en muestras de suero haciendo uso de fluorescencia sensibilizada por lantánidos. Se utiliza simultáneamente EDTA y Europio para prevenir la formación de hidróxidos de europio en soluciones alcalinas. El uso de sistemas micelares, particularmente CTACl, provee un entorno caracterizado por la baja polaridad y la alta viscosidad de la fase acuosa, que aumenta de manera simple la luminiscencia sensibilizada de las tetraciclinas con Europio (III), mejorando los límites de detección.

2.- Se ha propuesto un método para determinar sulfatiazol en formulaciones zoosanitarias mediante el uso de fluorescencia inducida fotoquímicamente, así como la determinación de esta sulfamida en mieles utilizando como señal la primera derivada de la fluorescencia inducida fotoquímicamente obtenida. Debido al amplio uso de formulaciones zoosanitarias donde se coadministran sulfatiazol y sulfanilamida, se ha desarrollado un método para la determinación de sulfanilamida en presencia de sulfatiazol en dichas formulaciones, utilizando como señal analítica la primera derivada del espectro de emisión.

3.- Se demuestra que es factible la determinación fluorimétrica de sulfatiazol utilizando técnicas de calibración multivariante de segundo orden. El proceso previo de fotoinducción incrementa drásticamente la fluorescencia de sulfatiazol. La aplicación de la ventaja de segundo orden, utilizando las matrices tridimensionales de excitación-emisión, permite la determinación de sulfatiazol en presencia de interferencias no conocidas, que se encuentran en las distintas matrices de mieles ensayadas. Se encuentran resultados algo mejores al aplicar SWATLD, en comparación con los obtenidos al aplicar PARAFAC. Los valores de recuperación encontrados en el análisis de mieles procedentes de distintos países fueron satisfactorios.

4.- Se han desarrollado dos métodos para la determinación sulfametoxazol y sulfaguanidina, tanto en orina como en mieles. Se han realizado los correspondientes estudios de los complejos de inclusión que forman con β -ciclodextrina. Se consigue un aumento de sensibilidad cuando utilizamos dicha ciclodextrina disuelta en Urea 4M. Es necesario la utilización de métodos de calibración multivariante de primer (PLS) y segundo orden (PARAFAC-IS), para la determinación de dichos analitos en las muestras reales. En la determinación en orina se concluye que los mejores resultados se obtienen cuando en los patrones que constituyen el conjunto de calibración, se encuentra presente la matriz compleja de orina en la dilución adecuada. Las recuperaciones obtenidas en todos los casos son satisfactorias.

5.- Se han comparado diferentes técnicas de calibración multivariante de segundo orden, tales como N-PLS, U-PLS, PARAFAC, SWATLD y BLLS, en la determinación de los ácidos mefenámico, meclofenámico y flufenámico en orina, empleando una etapa previa de extracción en cloroformo. Los resultados más precisos se obtienen cuando empleamos PARAFAC, SWATLD y BLLS debido a que dichos métodos aprovechan la denominada *ventaja de segundo orden*.

6.- Se han estudiado las propiedades fluorescentes así como se realizado un estudio detallado para el cálculo de las constantes de ionización tanto por fotometría como por fluorescencia, de los ácidos meclofenámico y flufenámico en disolución acuosa. Se han determinado de forma simultánea e individual dichos ácidos en muestras de orina empleando técnicas de calibración multivariante de segundo orden (PARAFAC-IS y SWATLD-IS) y medios micelares, aplicando el método de la adición patrón, para evitar la el problema de la gran señal que produce el fondo de orina. Se consiguen mejores límites de detección y se evita la etapa de extracción con cloroformo.

7.- Se desarrolla un nuevo algoritmo, TLLS, basado en una extensión de SVD-LS, con un orden más. Dicho método constituye una alternativa al método PARAFAC de cuatro vías, para el análisis y calibración de datos instrumentales de cuatro vías. Se ha desarrollado, asimismo, una metodología adicional, basada en la combinación de Unfolded PLS con RTL, como una extensión de Unfolded-PLS combinado con RBL, comparándose con las dos herramientas quimiométricas anteriores. Los resultados obtenidos, de las simulaciones numéricas de Monte Carlo y de datos reales experimentales, llevan a concluir que las nuevas metodologías descritas muestran una capacidad de predicción similar a la de PARAFAC. Se ha demostrado también que TLLS y Unfolded PLS acoplados con RTL, conllevan la “ventaja de segundo orden” y pueden cuantificar la concentración del analito de interés, en presencia de interferentes no modelados.

Simultaneous determination of flufenamic and meclofenamic acids in human urine samples by second-order multivariate parallel factor analysis (PARAFAC) calibration of micellar-enhanced excitation–emission fluorescence data

A. Muñoz de la Peña^{a,*}, N. Mora Díez^a, D. Bohoyo Gil^a, A.C. Olivieri^b, G.M. Escandar^b

^a *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain*

^b *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario S2002LRK, Argentina*

Received 7 November 2005; received in revised form 14 February 2006; accepted 17 March 2006

Available online 29 March 2006

Abstract

A new spectrofluorimetric method has been developed for the quantitative determination of the anti-inflammatory flufenamic and meclofenamic acids in urine samples. The method is based on second-order multivariate calibration applying parallel factor analysis (PARAFAC). The fluorescence excitation–emission matrices (EEMs) of these compounds are highly overlapped, precluding analyte direct determination without performing a previous separation procedure. The use of a micellar medium allowed for both fluorescence enhancement and analyte discrimination from the biological background. The calibration solutions were prepared in water, with concentrations in the ranges from 0.15 to 4.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for flufenamic acid and from 0.25 to 6.00 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for meclofenamic acid. The use of the second-order calibration method, in the standard addition mode, was required to avoid internal filter interference effects from the urine background. The measured EEMs of the two analytes as analytical signals allowed their simultaneous determination in human urine samples, in the therapeutic ranges from ca. 40 to 150 mg l^{-1} . The proposed procedure was validated by comparing the obtained results with a capillary electrophoresis method, with satisfactory results for the assayed method.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Second-order multivariate calibration; PARAFAC; Excitation–emission matrices; Flufenamic acid; Meclofenamic acid; Urine; Micellar media

1. Introduction

Flufenamic [*N*-(α,α,α -trifluoro-*m*-tolyl) anthranilic] and meclofenamic [*N*-(2,6-dichloro-*m*-tolyl) anthranilic] acids are potent analgesic and anti-inflammatory drugs. They have been used in the treatment of arthritis and other illnesses related to muscular-skeletal problems [1]. Some cases of nephrotoxicity have been reported, making the monitoring of these drugs in biological fluids of pharmacological and medical interest [2].

The fluorescent properties of these anthranilic acid derivatives have been widely exploited for analytical purposes. Mehta and Schulman [3], suggested that their native fluorescence in organic solvents, e.g. dioxane and chloroform, could be useful

for their determination. Miller et al. [4] reported that flufenamic and mefenamic acids showed no significant fluorescence at room temperature in acidic, neutral or alkaline ethanol solution, but were strongly fluorescent at low temperature. Dell et al. [5] indicated that solvents with a very low dielectric constant were required to obtain fluorescent solutions. Other spectrofluorimetric methods reported for the determination of these compounds involve the use of different fluorogenic agents [6–8].

The application of luminescent techniques to the analysis of drugs in biological fluids is advantageous because of the high sensitivity that can be achieved. However, the selectivity is often reduced by extensive spectral overlap or in the presence of matrix interferences. In this context, multivariate calibration methods are helpful in circumventing the selectivity problems.

Recently, a new method for the determination of flufenamic, mefenamic and meclofenamic acids in mixtures by fluorescence emission spectroscopy, using a partial least-squares (PLS) first

* Corresponding author. Tel.: +34 924289378; fax: +34 924289375.
E-mail address: arsenio@unex.es (A. Muñoz de la Peña).

order calibration model has been reported [9]. The method was applied to pharmaceutical preparations of these compounds, but not to biological samples.

It should be noticed that all first-order calibration methods, including PLS, are sensitive to the presence of uncalibrated interferents. This situation is encountered when dealing with natural samples of complex composition, such as the presently studied urine samples. A good alternative to the problem of unexpected interferents is to move to second-order data [10], that are particularly suitable for the quantitative analysis of complex multicomponent samples [11]. In recent years, second-order data following the trilinear model, such as excitation–emission fluorescence matrices (EEMs), have been gaining wide-spread analytical acceptance [12]. Data of this kind, when joined for a group of samples, are also known as three-way data. Additionally, the recording of three-way fluorescence information conveys certain advantages: the measurements are carried out on a single instrument, and the obtained models are trilinear.

Examples of usually employed second-order methods are parallel factor analysis (PARAFAC) [13] and self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD) [14]. The PARAFAC algorithm is based on least-squares minimization, whereas SWATLD uses a similar procedure, but involving the alternating minimization of three different error functions instead of one. In both methods, the decomposition of the three-way data array built with matrices measured for a number of samples is often unique. This property has been named the second-order advantage [11] and allows spectral profiles and relative concentrations of individual sample components to be extracted directly. Examples of application of second-order calibration to the analysis of different compounds include the determination of methotrexate and leucovorin in human urine [15], fluoroquinolone antibiotics in human serum [16,17], the pesticides carbaryl and chlorpyrifos [18], carbamazepine and its main metabolite, carbamazepine 10,11-epoxide in serum [19], sulfathiazole in honey samples [20], piroxicam in serum [21], ibuprofen in serum [22], ciprofloxacin in human urine [23], naproxen–salicylic acid in serum and naproxen–salicylic acid–salicylic acid in urine [24].

In a recent work [25], mixtures of the above-mentioned three acids have been determined in urine samples, with a previous chloroform extraction step, using second-order multivariate calibration. We now report on the simultaneous determination of flufenamic (FF) and meclofenamic (MC) acids in human urine samples, without any sample pre-treatment procedure, taking advantage of organized media (OM) effects on the fluorescence properties of the analytes. The environment seen by a micelle-solubilized solute differs from that encountered in aqueous solution, e.g. a higher local viscosity which decreases collision-induced non-radiative decay often takes place, increasing the fluorescence quantum yield with a subsequent increase in analytical sensitivity [26]. Different organized media, such as triton X-100 and sodium dodecyl sulfate, have been previously utilized for the determination of flufenamic and mefenamic acids in pharmaceutical preparations [27].

In the present paper, the interactions of flufenamic and meclofenamic acids with a cationic surfactant, hexade-

cytrimethylammonium bromide (HTAB) were studied. This latter OM not only induces fluorescent analyte signals, suitable for their determination, in aqueous basic solutions, but also shifts their emission bands, allowing for additional selectivity with respect to urine background signals. Based on these interesting properties, a new method for the determination of flufenamic and meclofenamic acids in urine samples is proposed, by recording the excitation–emission fluorescence matrices (EEMs) in the presence of HTAB. The method is combined with the second-order multivariate calibration method PARAFAC. Therapeutic concentration ranges for the studied analytes have previously been reported [28,29]. Pérez Ruiz et al. [30] determined mixtures of these acids in urine samples by capillary electrophoresis, in the range of concentrations between 30 and 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, and Fatma et al. [31] determined flufenamic and mefenamic acids by chemiluminescence, in the range of concentrations up to 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Therefore, we established the maximum limits of these anti-inflammatory drugs in urine as ca. 140 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for meclofenamic acid and 120 $\mu\text{g ml}^{-1}$ for flufenamic acid. The results obtained show that the direct fluorimetric analysis, combined with second-order multivariate calibration, allows satisfactory results for predicting the concentrations of the analytes of interest in human urine samples. The procedure is simpler than the method that uses a previous chloroform extraction [25].

2. Experimental

2.1. Apparatus

Fluorescence spectral measurements were performed on a Fluorescence Spectrophotometer Varian Model Cary Eclipse. The instrument consists of two Czerny–Turner monochromators (excitation and emission), a Xenon light source, a range of fixed width selectable slits, selectable filters, attenuators and two photomultiplier tubes as detectors. The fluorimeter is connected to a PC microcomputer via an IEE serial interface. The Cary Eclipse Version 1.0 software was used for data acquisition, data interpretation and graphical display. All measurements were performed in 10 mm quartz cells at 20 °C, by use of a thermostatic cell holder and a Selecta Model Frigiterm thermostatic bath. EEMs were registered in the ranges $\lambda_{\text{em}} = 400\text{--}570$ nm, each 2 nm, and $\lambda_{\text{exc}} = 250\text{--}360$ nm, each 5 nm.

The electrophoretic studies were performed on an HP CE instrument, equipped with a temperature control device by forced air, a diode array detector and the ChemStation Software package to control the instrument, data acquisition and data analysis. Separations were carried out on a 58.5 cm (50 cm to the detector) \times 50 μm i.d. fused silica capillary column (Agilent Technologies, Madrid, Spain).

2.2. Reagents

All solutions were prepared in doubly distilled water. β -Cyclodextrin was obtained from Cyclolab (Budapest, Hungary), HTAB from Sigma and spectroscopic grade acetonitrile from Merck. Stock solutions of flufenamic and meclofenamic acids (Sigma), both containing 100.0 mg l^{-1} of each compound, were

prepared in 100.00 ml volumetric flasks by dissolving 10.0 mg of each drug in 0.13 M aqueous NaOH. These solutions were stored in dark bottles at 4 °C, remaining stable for at least 1 month. Working solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solutions with water.

2.3. Software

All calculations were done using MATLAB 5.3 [32]. Appropriate routines for applying PARAFAC, developed by Bro, are available on the internet [33], although a useful MATLAB graphical interface was developed for easy data manipulation and graphics presentation [34]. This interface provides a simple mean of loading the data matrices into the MATLAB working space before running PARAFAC and SWATLD, and also implements the SWATLD algorithm. It also allows selecting appropriate recording spectral regions, optimizing the number of factors, calculating the analytical figures of merit and plotting emission and excitation spectral profiles and pseudo-univariate calibration graphs. This MATLAB interface code is available from the authors on request.

2.4. Theory

2.4.1. Three-way trilinear data

When a sample produces a $J \times K$ data matrix (a second-order tensor), such as an EEM (J = number of emission wavelengths, K = number of excitation wavelengths), the corresponding set obtained by ‘stacking’ the matrices obtained for each of the I samples included in the calibration set is a three-dimensional or three-way array. Appropriate dimensions of such an array are $I \times J \times K$ (I = number of samples). Since EEMs follow a trilinear model, the array can be written as a sum of tensor product of three vectors for each fluorescent component. If \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n collect the relative concentration ($I \times 1$), emission ($J \times 1$) and excitation ($K \times 1$) profiles for the component n , respectively, the data array \mathbf{F} can be written as

$$F_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ijk} \quad (1)$$

where F_{ijk} is the intensity recorded for the i th sample at j and k channels, N the total number of responsive components, a_{in} the relative concentration (or score) of component n in the i th sample, b_{jn} and c_{kn} the signal intensities at channels j and k in each dimension for component n , and E_{ijk} are the elements of the array \mathbf{E} , which is a residual error array of the same dimensions as \mathbf{F} . The column vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n are usually collected into the three loading matrices \mathbf{A} , \mathbf{B} and \mathbf{C} .

A characteristic property of \mathbf{F} is that it can be uniquely decomposed, providing access to spectral profiles (\mathbf{B} and \mathbf{C}) and relative concentrations (\mathbf{A}) of individual components in the I mixtures, whether they are chemically known or not. This constitutes the basis of the so-called second-order advantage. One popular alternative to decomposing the array \mathbf{F} of Eq. (1) is to employ the PARAFAC algorithm. Its underlying theory has been exhaustively described [11]. This method has been imple-

mented in the present study using the standard addition mode [35], because this allows to circumvent the internal filter effect caused by the urine components on the fluorescence signal of the analytes.

The PARAFAC components will estimate the signals from the individual fluorophores if the data are approximately low-rank trilinear and the correct number of components is used. The number of components can be estimated using the core consistency diagnostic (CORCONDIA) test [36].

The algorithm known as self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD) [14] has been also used. This method attempts to fit the array \mathbf{F} to the trilinear model shown in Eq. (1) by defining three objective functions to be minimized rather than the single one in PARAFAC. Once the three-way decomposition of \mathbf{F} has been performed by SWATLD, the remaining calibration/prediction process is analogous to that described above for PARAFAC.

2.5. Study of the influence of pH

The changes in the UV–vis spectra of solutions of each compound in the presence and absence of HTAB as a function of pH were analyzed. Back-titration procedures were developed, starting the experiments at alkaline pH (ca. 12), and then acidifying the solutions until pH ca. 2. To a 25 ml stirred sodium hydroxide solution of either MC or FF (in the presence or absence of HTAB), HCl solution (0.1–0.01 M, as appropriate) was added in small increments (5.0–100.0 μ l). For each pH point, the solution was aliquoted and the absorption spectrum was read. The initial concentrations of MC or FF in the experimental solutions were in the order of 2.00 μ g ml⁻¹ while the HTAB concentration was 1.8×10^{-4} M. This procedure was repeated in order to provide more than 25 pairs of spectrum and pH values for each experimental run. Each run was conducted at least in duplicate.

The influence of pH in the fluorescence spectra of MC, FF, MC–HTAB and FF–HTAB systems was studied following a similar procedure to that described for the absorbance experiments.

The obtained data were used for the estimation of the deprotonation constant values employing an appropriate MATLAB routine based on an alternating least-squares procedure which uses full spectral data [37]. This routine provides, in addition to the estimated protolytic constants and their associated standard errors, the absorption (or fluorescence) spectra at unit concentration for each prototropic form of the analyte, the spectral residues between calculated and experimental data, and the species distribution as a function of the pH.

2.6. Urine analysis

A urine dilution factor was estimated according to the therapeutic concentration ranges, assuming maximum limits of ca. 140 μ g ml⁻¹ for meclofenamic and of ca. 120 μ g ml⁻¹ for flufenamic acid, respectively, concluding that a 1:100 dilution of the urine samples was optimum, as a compromise between internal filter effects from urine and the linear analytical range. Attempts to carry out the determination of the analytes by building a separate calibration set failed, due to the internal filter effect produced

by urine absorption. Therefore, the standard addition technique was employed.

In a 5.00 ml flask, 0.5 ml of urine was spiked with the analytes (see Table 2), and after 10 min 2 ml of 0.1 M TRIS/HCl buffer of pH 8.6 were added. Completion to the mark was achieved with deionized water. From this latter solution, 0.300 ml were diluted to 3.00 ml in a flask, where 20 μ l of 0.025 M solution of HTAB were added. After completing to the mark with deionized water, the flask was vigorously shaken. The final solution (1:100 dilution of the original urine sample) was placed in a quartz cell, and the fluorescence EEM was registered in the selected spectral regions for this analyte. To apply the standard addition method, a separate calibration scheme is necessary for each analyte. First, to an aliquot of the diluted urine unknown sample, five different amounts of flufenamic acid were added, keeping the final concentration within the linear range, and the EEM was then registered for each of the resulting solutions. Then, to a second aliquot of the diluted urine sample, five different amounts of meclofenamic acid were added, within the linear range and the EEM was again registered for each of the resulting solutions. This means that the way in which PARAFAC is applied in the standard addition mode is different than in the external calibration mode. The difference is that the calibration matrix is constructed by directly working with the unknown samples, to which different standard additions of the analyte of interest are made. In this mode of calibration, the procedure is slightly more time consuming than in the external calibration mode, as for each analyzed sample, we have to perform a series of standard additions for each analyte. In the present case, with two analytes, two calibration schemes are necessary.

3. Results and discussion

3.1. Deprotonation constants of MC and FF

While spectrophotometric measurements allow one to infer the ground-state acidity of a selected compound, fluorescence spectroscopy permits, in principle, the study of its excited-state proton exchange, depending on the lifetimes of the excited acid and its conjugate base, their deprotonation and protonation rate constants and the concentrations of the prototropic species in solution [38]. The studied compounds MC and FF possess in their structures an ionizable group, and from the deprotonation constant values obtained using both spectrophotometric and spectrofluorimetric methods, we may gain insight into the type (ground or excited-state nature) of the evaluated constant.

Before analyzing the effect of the pH on the spectral properties of the analytes, the linear ranges between either absorbance or fluorescence intensity and concentration were assessed for both analytes. As regards spectrophotometry, both FF and MC proved to be linear in concentration ranges up to 10.0 μ g ml⁻¹, whereas for fluorescence measurements, linearity was observed in ranges up to 4.0 and 6.0 μ g ml⁻¹, respectively.

Since the fluorescence signal is enhanced using HTAB, a study of the influence of the concentration of HTAB was carried out with the purpose of determining the optimum concentration at a pH obtained by addition of 0.1 M TRIS/HCl buffer of pH

8.60. An optimum concentration of 1.8×10^{-4} M was found. It was also found that the buffer concentration did not produce significant variations in the fluorescence signal; a convenient concentration of 0.04 M was selected.

3.2. Spectrophotometric studies

Fig. 1A shows the absorption spectra of MC in water solution at different pH values. The concentration of MC used in this experiment is relatively low due to solubility reasons at pH lower than 3. As can be appreciated in this figure, at acid pH and in the UV range, several overlapped and poorly defined bands are detected. On the other hand, at alkaline pH, the absorption below 350 nm increases, while the absorption at higher wavelengths remains insignificant. The presence of an isosbestic point at about 330 nm suggests the presence of two absorbent species in equilibrium: the protonated and deprotonated forms of MC.

The presence of ionic micelles may in principle affect the acid–base properties of a given analyte, since a stabilization of the charged form of the compound is produced by interaction with the micelle of opposite charge. The stabilization depends on the charge of the species involved in the prototropic equilibrium and on the type (anionic or cationic) of micelle used [39]. From the spectrophotometric titrations of MC in the presence of HTAB we can calculate its conditional acidity constant in this medium. It should be noted that this experiment was developed at a surfactant concentration that ensures the presence of micelles in the whole evaluated pH range.

In Fig. 1B the absorption spectra of MC in the presence of HTAB at different pH values are shown. While at acid pH the spectra are similar to those measured in the absence of surfactant, a rather wide band in the region 260–350 nm is observed when the pH increases. This fact can be attributed to the interaction between the carboxylate formed and the cationic surfactant. From the total absorbance–wavelength–pH data of MC in the presence and absence of HTAB, the corresponding acidity constants were calculated and are shown in Table 1. The acidity constant value of MC ($pK_a = 3.64$) is similar to that reported in the literature ($pK_a = 3.76$) [40]. If the deprotonation constants for MC with and without surfactant are compared, we can conclude that the value is significantly lower in the micellar system. The presence of cationic surfactant promotes the deprotonation of the carboxylic group of MC, with the concomitant formation of an ionic pair between the anionic structure of MC and the cationic structure of HTAB.

Fig. 1C shows the absorption spectra corresponding to FF. The protonated form of this acid displays two absorption bands

Table 1
Deprotonation constants of FF and MC, as obtained from spectrophotometry and spectrofluorimetry, in the absence and presence of the micellar medium^a

Method	FF	MC	FF (HTAB) ^b	MC (HTAB) ^b
Spectrophotometry	4.17 (0.05)	3.64 (0.05)	2.81 (0.05)	2.70 (0.03)
Spectrofluorimetry	4.5 (0.1)	3.31 (0.05)	2.77 (0.08)	2.71 (0.05)

^a Standard deviation in parenthesis.

^b In the presence of HTAB 1.8×10^{-4} M.

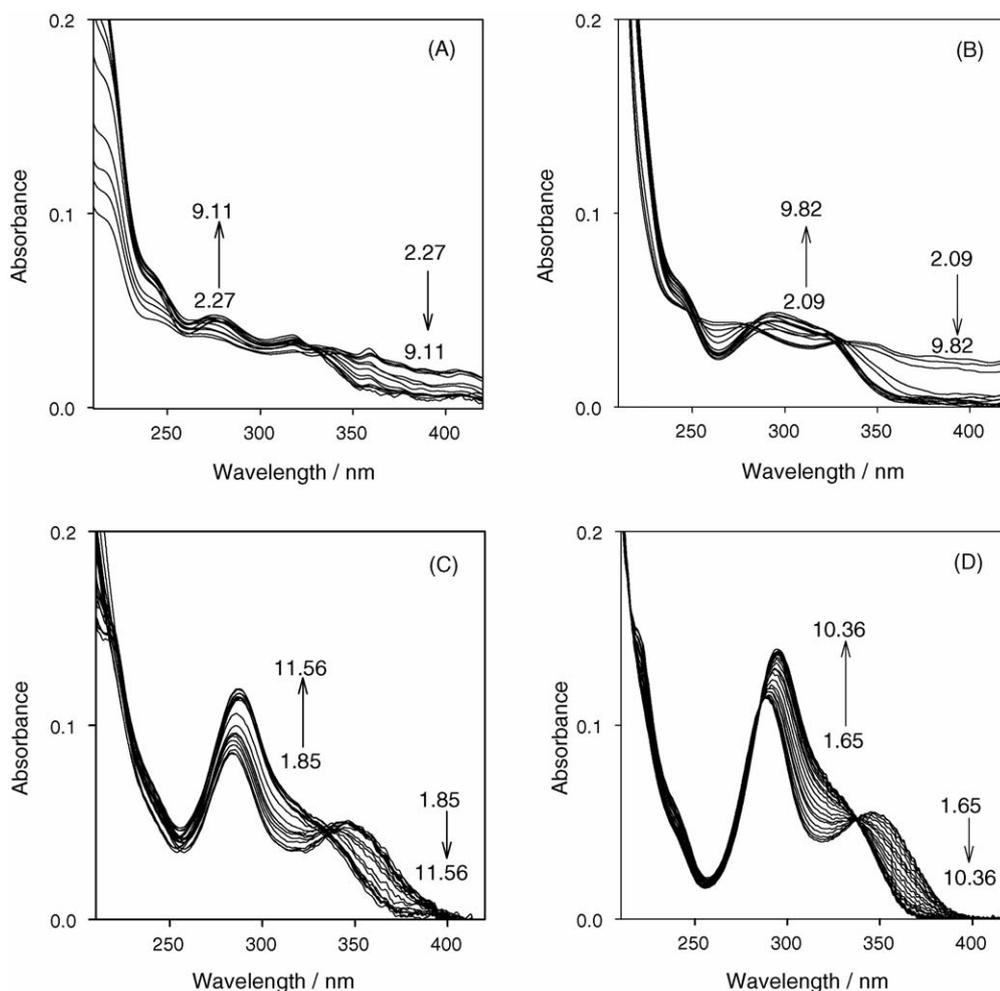


Fig. 1. Absorption spectra at different pH values for MC in the absence (A) and in the presence (B) of HTAB, and for FF in the absence (C) and in the presence (D) of HTAB. Initial concentrations were $C_{MC} = C_{FF} = 2.00 \mu\text{g ml}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

at about 280 and 350 nm. When the pH is increased, the band at 280 nm shifts towards 300 nm, while that corresponding to 350 nm significantly decreases. An isosbestic point at 340 is detected, in accordance with the presence of an equilibrium between the protonated and deprotonated forms of FF in the ground-state. The deprotonation constant for FF calculated from this experiment ($\text{p}K_{\text{a}} = 4.17$, see Table 1) is slightly higher than a value reported in the literature ($\text{p}K_{\text{a}} = 3.84$) [27].

Finally, Fig. 1D shows the FF absorption spectra in the presence of HTAB at different pH values. The conditional deprotonation constant obtained in this case (Table 1), as in the case of the MC system discussed above, is lower than the corresponding value in the absence of surfactant.

3.3. Spectrofluorimetric studies

The acid–base properties of MC and FF were also evaluated from fluorescence spectral measurements. Fig. 2A shows the emission spectra of MC at different pH values. The band at 430 nm decreases as the pH increases. These spectra were used for the estimation of the acidity constant of MC (Table 1). The obtained value is similar to that calculated from spectropho-

metric data, suggesting that the proton transfer rate in MC in the excited-state is lower than the fluorescence relaxation rate. Therefore, even using fluorescence measurements, the deprotonation constant determined in this case does also correspond to a ground-state process.

The presence of HTAB enhances the fluorescence emission at acid pH (Fig. 2B), with a new band detected at higher pH at ca. 480 nm. It is interesting to note that the Stokes shift for this new fluorescent band, ascribed to deprotonated MC, is ca. $14,070 \text{ cm}^{-1}$. This implies an anomalous Stokes shift, usually ascribed to proton transfer in the excited state, of the type already described in the literature [41,42]. The spectrofluorimetrically measured deprotonation constant of MC in the micellar medium is lower than that in its absence, but similar to the spectrophotometrically calculated value, suggesting that the MC–HTAB association does not modify the intrinsic rate of the proton transfer in the excited state, nor the rate for fluorescence relaxation.

Fig. 2C shows the fluorescence spectra for FF at different pH values. The presence of a weak emission band at 440 nm can be observed at acid pH. The intensity of this band significantly increases (about 100%) in the presence of HTAB (Fig. 2D). As the pH increases, the intensity of this band decreases, and

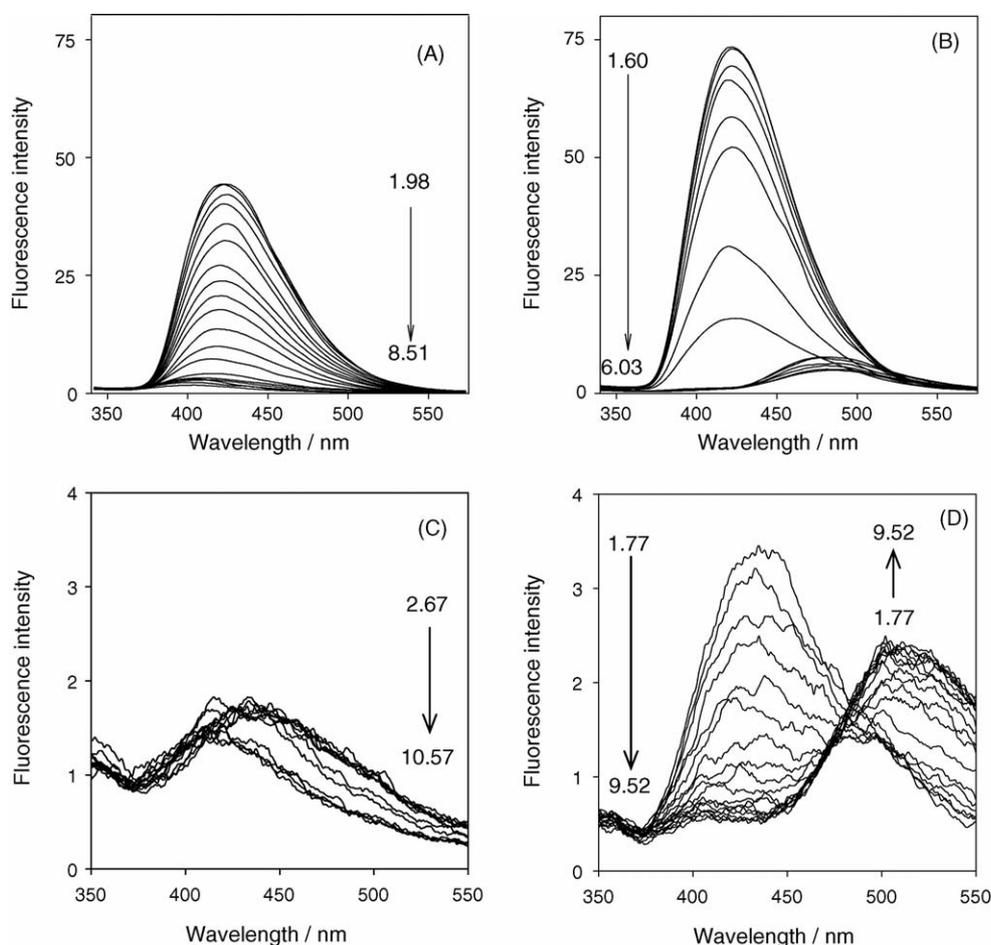


Fig. 2. Fluorescence emission spectra at different pH values for MC in the absence (A) and in the presence (B) of HTAB, and for FF in the absence (C) and in the presence (D) of HTAB. Initial concentrations were $C_{MC} = C_{FF} = 2.00 \mu\text{g ml}^{-1}$, $C_{HTAB} = 1.8 \times 10^{-4} \text{ M}$.

an additional band appears at 510 nm. As with MC, this new band presents an anomalous Stokes shift, due to excited-state proton transfer, of ca. $14,870 \text{ cm}^{-1}$. The deprotonation constant values for FF in both the presence and absence of HTAB obtained by spectrofluorimetry (Table 1) indicate a behaviour similar to that for MC. In other words, the constants in the ground-state are also obtained for these systems through spectrofluorimetric measurements.

An important outcome of these studies is that the spectral changes discussed above have strong analytical implications. The appearance of bands at ca. 500 nm may allow for a better discrimination between the fluorescence signals from the analytes and those from the interferences, such as urine fluorescent components. The optimization of the analytical protocol in view of these interesting findings will be discussed below.

3.4. Selection of EEM spectral ranges for analyte determination

In the above-mentioned chemical conditions, maximum information on the two drugs can be scanned in the region $\lambda_{em} = 400\text{--}570 \text{ nm}$ at 2 nm intervals, exciting in the range 250–360 nm at 5 nm intervals. In these intervals, with complete

EEMs, the presence of the first-order Rayleigh and second-order diffraction grating signals is detected. It is well known that these scatterings do not contain any information concerning the fluorescence properties of the analytes. In order to avoid them and to focus on the responsive spectral regions for each analyte, the wavelength ranges have been appropriately reduced (Fig. 3A and B): emission from 450 to 558 nm and excitation from 285 to 340 nm for flufenamic analysis, and emission from 410 to 518 nm and excitation from 265 to 350 nm for meclofenamic analysis. This implies that the size of the EEMs were 55×12 and 55×18 data points, respectively.

3.5. Selection of the number of components

In order to determine the optimal number of factors for each test urine sample in the case of PARAFAC, the value of the core consistency parameter was analyzed as a function of a trial number of components [36]. For urine samples 1 through 12 (Table 2), this diagnostic tool indicated that $N=2$ was the correct choice. In the case of urine samples 13–18, spiked with both analytes, although the core consistency analysis also suggested that two components were appropriate, the choice of $N=3$ led to the correct retrieval of spectral profiles: two for the analytes and the remaining one for urine (see below). No significant dif-

Table 2
Prediction results for flufenamic acid and meclofenamic acid determination in spiked human urine samples^a

Sample	Flufenamic acid			Meclofenamic acid		
	Spiked ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found PARAFAC	Rec. (%)	Spiked ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Found PARAFAC	Rec. (%)
1	1.50	1.45 (0.03)	97	0.00	ND	–
2	1.24	1.17 (0.03)	94	0.00	ND	–
3	1.00	1.09 (0.04)	109	0.00	ND	–
4	0.90	0.87 (0.05)	97	0.00	ND	–
5	0.80	0.79 (0.05)	99	0.00	ND	–
6	0.50	0.49 (0.03)	98	0.00	ND	–
7	0.00	ND	–	1.50	1.50 (0.06)	100
8	0.00	ND	–	1.24	1.16 (0.04)	93
9	0.00	ND	–	1.00	0.95 (0.06)	95
10	0.00	ND	–	0.90	0.85 (0.05)	94
11	0.00	ND	–	0.50	0.47 (0.04)	94
12	0.00	ND	–	0.36	0.39 (0.05)	108
13	1.50	1.57 (0.04)	105	1.50	1.61 (0.02)	107
14	1.10	1.00 (0.03)	91	0.70	0.77 (0.02)	110
15	0.90	0.83 (0.04)	92	0.90	0.84 (0.02)	93
16	0.80	0.85 (0.06)	106	1.40	1.24 (0.06)	88
17	0.50	0.46 (0.04)	93	1.10	1.01 (0.02)	92
18	0.45	0.45 (0.02)	112	0.60	0.64 (0.05)	106

^bND = not detected.

^a Standard error in parenthesis.

ference was found in the predicted concentrations, however, on employing two or three components for samples 13–18, as the contribution of the third PARAFAC component in these samples, either FF or MC, is small in comparison with the urine contribution. The above analysis also shows that the presence of urine is considered as a single extra component by PARAFAC, and that this is mandatory for achieving the second-order advantage. The SWATLD method was implemented using the same number of components as PARAFAC.

Once the number of components was estimated, the array formed by joining the EEMs for the test sample and those obtained by standard addition was subjected to decomposition. Employment of this method implies that the array decomposition should be repeated for each newly analyzed sample. The identification of the chemical constituents under investigation is required before quantitation by resorting to the pseudo-univariate calibration graph provided by either PARAFAC or SWATLD. This is done with the aid of the spectral profiles extracted by these algorithms, and comparing them with those for standard solutions of the pure analytes of interest. Absolute analyte concentrations are obtained after proper standard addition calibration, starting from the known amounts of analyte added to the test samples.

Fig. 4 plots the loadings provided by PARAFAC when processing the array formed by the EEM of urine sample number 13 and those obtained after standard addition of FF. These emission and excitation spectral profiles are contained in matrices **B** and **C**, respectively. The components have been labelled with the order assigned by the model, i.e., they appear in the order of their contribution to the total of the variance. The comparison of the excitation and emission profiles extracted by the PARAFAC model with the experimental ones shows a satisfactory agreement. Similar success was observed on studying the remaining

samples of Table 2 with both chemometric models, after the standard addition of either of the two analytes. In Fig. 5, examples of the pseudo-univariate calibration graphs obtained when applying PARAFAC in the standard addition mode are presented. Fig. 5A shows the pseudo-univariate calibration graph obtained for flufenamic acid determination in the sample number 14 of Table 2. For the analysis in the standard addition mode, different concentrations of flufenamic acid were added to the sample containing $1.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of flufenamic acid and $0.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ of meclofenamic acid. Fig. 5B shows the corresponding calibration graph for meclofenamic acid determination, for the sample number 15 of Table 2, containing $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ of meclofenamic acid and $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ of flufenamic acid. Table 3 reports the analytical figures of merit of the PARAFAC calibration model for flufenamic and meclofenamic acids calibration. The sensitivity (SEN) for a particular analyte has been estimated as the net analyte signal at unit concentration, whereas the selectivity (SEL) has been computed as the ratio between the sensitivity and the total signal, as suggested by Kalivas and co-workers [43]. The analytical sensitivity, in analogy with univariate calibration, has been computed as the ratio between sensitivity and spectral

Table 3
Figures of merit for the PARAFAC multivariate calibration procedure

	Meclofenamic acid	Flufenamic acid
Sensitivity (AFU ^a l mg ⁻¹)	290	50
Analytical sensitivity (γ) (l mg ⁻¹)	190	188
γ^{-1} ($\mu\text{g l}^{-1}$)	5.2	5.3
Selectivity (SEL)	0.90	0.99
LOD (mg l ⁻¹)	0.09	0.1

^a AFU, arbitrary fluorescence units.

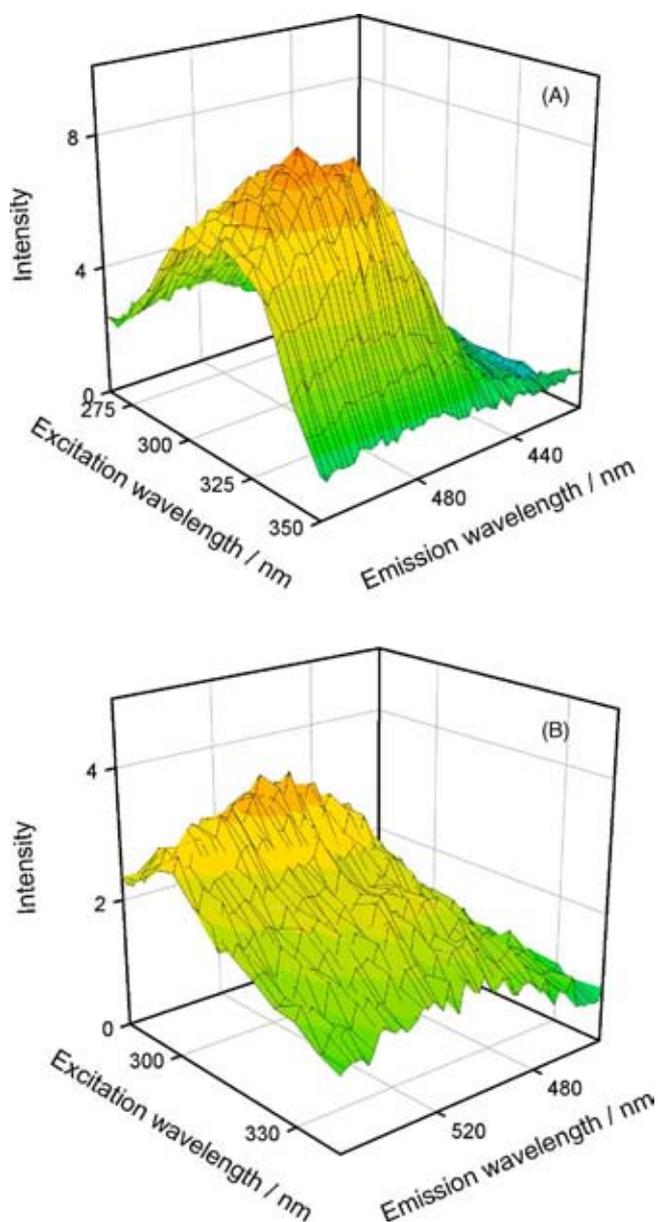


Fig. 3. Three-dimensional excitation–emission matrices (EEMs) of a standard solution, of meclufenamic acid (A) and flufenamic acid (B) in the corresponding selected spectral ranges. In both cases the concentration of the analyte is $1.00 \mu\text{g ml}^{-1}$.

noise:

$$\gamma = \frac{\text{SEN}}{[V(R)]^{1/2}} \quad (2)$$

The inverse (γ^{-1}) establishes the minimum concentration difference that can be appreciated by the method [44]. The factor $V(R)$ in Eq. (2) is the variance of the instrumental signal, which may be estimated by replicate blank measurements. The limit of detection of the method can be estimated as

$$\text{LOD} = 3.3s(0) \quad (3)$$

where $s(0)$ is the standard deviation in the predicted concentration of the analyte of interest in a blank sample [45].

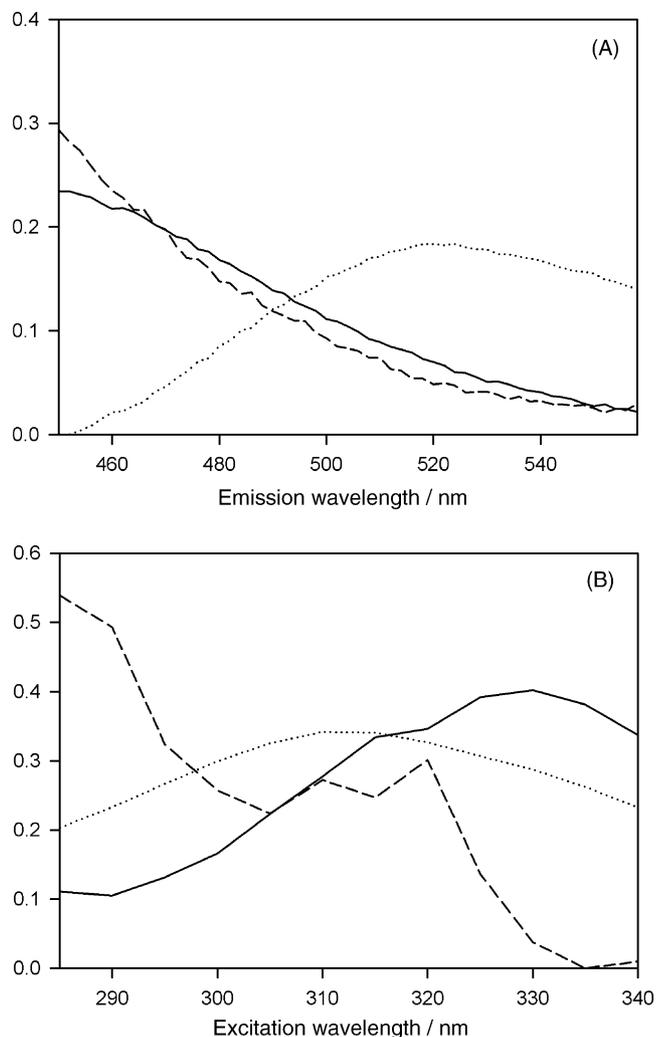


Fig. 4. Emission (A) and excitation (B) profiles provided by a three-component PARAFAC model (B and C matrices, respectively), obtained after processing the array formed by the EEM for urine sample number 13 and those recorded after standard additions of FF. The profiles shown as solid lines can be matched with the spectra of MC, those as dotted lines with spectra of FF, and those as dashed line with urine components.

3.6. Prediction results in urine samples

The concentrations found for flufenamic and meclufenamic acids by the above-described methodology in the spiked urine samples are summarized in Table 2 for the PARAFAC calibration. Similar results were obtained when using SWATLD. To validate the proposed multivariate calibration procedure, the unknown samples were analyzed by an independent method, using capillary electrophoresis [30]. The original method was slightly modified by us for better resolving the peaks and for decreasing the time of analysis. The optimal instrumental conditions for the separation were: voltage, +30 kV, capillary temperature, 25°C , injection in the hydrodynamic mode at the anode side by applying 50 mbar for 10 s, and detection wavelength, 285 nm. Before the first use, the capillary was conditioned by flushing for 5 min with freshly prepared 0.1 M sodium hydroxide and rinsing with the buffer. It was then equilibrated with the buffer for

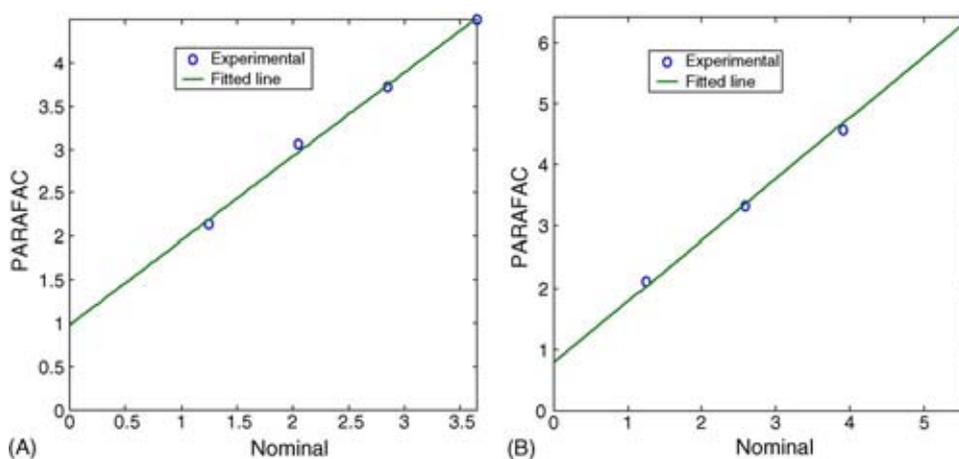


Fig. 5. Plot of the pseudo-univariate calibration graphs, obtained when applying PARAFAC in the standard addition mode, to urine samples containing flufenamic and meclofenamic acids. (A) Flufenamic acid calibration, for the urine sample number 14 of Table 2, containing $1.10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of flufenamic acid and $0.7 \mu\text{g ml}^{-1}$ of meclofenamic acid, to which standard additions of 0.25, 1.00, 1.66 and $2.50 \mu\text{g ml}^{-1}$ of flufenamic acid have been made. (B) Meclofenamic acid calibration for the urine sample number 15 of Table 2, containing $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ of flufenamic acid and $0.9 \mu\text{g ml}^{-1}$ of meclofenamic acid, to which different standard additions of 0.33, 1.70, 3.23 and $4.53 \mu\text{g ml}^{-1}$ of meclofenamic acid, have been made.

15 min applying the separation voltage of 12 kV. Between experiments, the capillary was rinsed with buffer for 2 min. A 30 mM phosphate buffer of pH 12.0 containing β -cyclodextrin (2 mM) and acetonitrile (10%, v/v) was used as the running buffer. For the validation, known amounts of the analytes (between 6 and $20 \mu\text{g ml}^{-1}$) were added to urine samples to establish the calibration curve. In a 5.00 ml flask, 0.5 ml of urine were spiked with the analytes and, after 5 min, 100 μl of 0.1 M NaOH were added. Completion to the mark was achieved with deionized water. All solutions were filtered through a $0.45 \mu\text{m}$ filter (Millisolve Kit, Millipore) before the injections. The resolution of the two peaks was obtained in a time of 5 min. The values obtained were statistically comparable to those provided by the reference technique, when a paired *t*-test was applied at a 95% confidence level.

All predictions are seen to be reasonable for samples of the complexity of human urine. Comparison of the predicted concentrations and recoveries provided by both algorithms shows a good predictive ability towards the test set of spiked urine samples, and confirms the potentiality of the presently studied second-order methods for the analysis of complex biological samples.

In order to gain further insight into the accuracy of the method, linear regression analysis of nominal versus found concentration values was applied. Regression was performed using concentration data for both analytes simultaneously, taken from all the urine samples reported in Table 2, as recommended in the literature [46] in order to obtain better estimates of the experimental errors. The estimated intercept and slope (\hat{a} and \hat{b} , respectively) were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region (EJCR) test [47]. For PARAFAC, the fitted regression parameters were: slope, 1.01(4); intercept, $-0.02(4)$, with the theoretical ($a=0$, $b=1$) point being included within the corresponding ellipse.

4. Conclusions

The fluorimetric determination of flufenamic and meclofenamic acids in a complex matrix such as human urine, using second-order multivariate calibration techniques, is demonstrated to be feasible. The method is developed in an HTAB micellar medium, enhancing the fluorescence emission of the aqueous solutions of the analytes, making it suitable for analytical purposes, and allowing the measurement of fluorescence excitation–emission matrices (EEMs) in a range of emission wavelengths which are longer than those observed in other micellar media or organic solvents, which is advantageous in terms of selectivity. An adequate selection of the excitation and emission ranges, to avoid first-order Rayleigh and second-order diffraction grating harmonic signals, improved the predictive capacity of the model. The employed second-order calibration methods, PARAFAC and SWATLD, when applied using the standard addition mode, are both able to model the system in the present situation, through the unique decomposition of the three-way data array. This allows the direct extraction of excitation and emission spectral profiles, as well as the relative concentrations of the analytes. Reasonably good recovery values are obtained in all the analyzed urine samples. The proposed procedure is simpler than the reported method using a previous chloroform extraction, as the latter extraction step is avoided.

Acknowledgements

Financial support was provided by DGI-MEC of Spain (Project CTQ 2005-02389) and AECI (Programa Intercampus Iberoamérica/PCI Project A/2394/05). Diego Bohoyo Gil is grateful to the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura for a fellowship (DOE 21/06/01). Financial support from CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas) and Universidad Nacional de

Rosario is also acknowledged. The authors are grateful to Antonio Silva Rodriguez for his help in the validation of the method by the capillary electrophoresis method.

References

- [1] P.A. Insel, in: A. Goodman Gilman (Ed.), *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, McGraw-Hill, New York, 1996 [Chapter 27].
- [2] K.A. McGurk, R.P. Remmel, V.P. Hosagrahara, D. Tosh, B. Burchell, *Drug Metab. Dispos.* 24 (1996) 842.
- [3] A.C. Mehta, S.G. Schulman, *Talanta* 20 (1973) 702.
- [4] J.N. Miller, D.L. Phillips, D.T. Burns, J.W. Bridges, *Talanta* 25 (1978) 46.
- [5] H.D. Dell, B. Kutschbach, *Fresen. Z. Anal. Chem.* 262 (1972) 356.
- [6] S. Narita, T. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.* 37 (1989) 831.
- [7] R.H. Huang, X. Xu, *Yaoxue Xuebao (China)* 24 (1989) 37.
- [8] M.I. Albero, C. Sanchez-Pedreño, M.S. García, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13 (1995) 1113.
- [9] L.F. Capitán Valley, N. Navas, M. Del Olmo, V. Consonni, R. Todeschini, *Talanta* 52 (2000) 1069.
- [10] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149.
- [11] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [12] A. Smilde, R. Bro, P. Geladi, *Multi-way Analysis, Applications in the Chemical Sciences*, Wiley, England, 2004.
- [13] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149.
- [14] Z.P. Chem, H.L. Wu, Y. Li, R.Q. Yu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52 (2000) 75.
- [15] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa Mansilla, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5657.
- [16] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, A.C. Olivieri, H.C. Goicoechea, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640.
- [17] A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, F. Salinas López, *Anal. Chim. Acta* 531 (2005) 257.
- [18] A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, *Appl. Spectrosc.* 58 (2004) 83.
- [19] G.M. Escandar, D. González Gómez, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 161.
- [20] M.C. Mahedero, N. Mora Díez, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil, *Talanta* 65 (2004) 806.
- [21] J.A. Arancibia, G.M. Escánder, *Talanta* 60 (2003) 1113.
- [22] L.A. Hergert, G.M. Escánder, *Talanta* 60 (2003) 235.
- [23] P.C. Damián, A.J. Nepote, M. Bearzotti, A.C. Olivieri, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2798.
- [24] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, G.M. Escánder, *Anal. Bioanal. Chem.* 374 (2002) 451.
- [25] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, N. Mora Díez, D. Bohoyo Gil, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, *Appl. Spectrosc.* 60 (2006) 330.
- [26] J.G. Dorsey, *Adv. Chromatogr.* 27 (1987) 198.
- [27] S.M. Sabry, *Anal. Chim. Acta* 367 (1998) 41.
- [28] J.E.F. Reynolds (Ed.), *Martindale, The Extra Pharmacopeia*, The Pharmaceutical Press, London, 1996.
- [29] E. Abignente, P. Caprariis, in: K. Florey (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances*, McGraw-Hill, New York, 1976.
- [30] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, E. Bravo, *J. Chromatogr. B* 708 (1998) 249.
- [31] A.A. Fatma, A.A. Salma, A.A. Abdulrahman, *Anal. Chim. Acta* 416 (2000) 87.
- [32] MATLAB 5.3, The Mathworks, Inc., Natick, MA, USA, 1999.
- [33] <http://www.models.kvl.dk/source/>.
- [34] A.C. Olivieri, MVC2, Universidad Nacional de Rosario, Argentina, 2003.
- [35] C.M. Andersen, R. Bro, *J. Chemometr.* 17 (2003) 200.
- [36] R. Bro, H.A.L. Kiers, *J. Chemometr.* 17 (2003) 274.
- [37] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz Cruz, M.S. Díaz Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [38] S.G. Schulman, Acid-base chemistry of excited singlet states, in: E.L. Wehry (Ed.), *Modern Fluorescence Spectroscopy*, vol. 2, Plenum Publishing Corporation, New York, 1976 [Chapter 6].
- [39] E. Pramauro, E. Pelizzetti, *Surfactants in analytical chemistry. Applications of organized amphiphilic media*, in: S.G. Weber (Ed.), *Wilson & Wilson's Comprehensive Analytical Chemistry*, vol. 21, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 1996 [Chapter 4].
- [40] S. Marriner, J.A. Bogan, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 2 (1979) 109.
- [41] L.G. Arnaut, S.J. Formosinho, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 75 (1993) 1.
- [42] S.J. Formosinho, L.G. Arnaut, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 75 (1993) 21.
- [43] N.J. Messick, J.H. Kalivas, P.M. Lang, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1572.
- [44] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [45] R. Boque, J. Ferré, N.M. Faber, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 313.
- [46] A. Martínez, J. Riu, O. Busto, J. Guasch, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 257.
- [47] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, *Talanta* 48 (1999) 729.

Second-Order Calibration of Excitation–Emission Matrix Fluorescence Spectra for the Determination of N-Phenylanthranilic Acid Derivatives

A. MUÑOZ DE LA PEÑA,* A. ESPINOSA MANSILLA, N. MORA DÍEZ, D. BOHOYO GIL, A. C. OLIVIERI, and G. M. ESCANDAR

Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071, Badajoz, España (A.M.d.I.P., A.E.M., N.M.D., D.B.G.); and Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario, S2002LRK, Argentina (A.C.O., G.M.E.)

A spectrofluorimetric method has been developed for the quantitative determination of mefenamic, flufenamic, and meclofenamic acids in urine samples. The method is based on second-order data multivariate calibration (unfolded partial least squares (unfolded-PLS), multi-way PLS (N-PLS), parallel factor analysis (PARAFAC), self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD), and bilinear least squares (BLLS)). The analytes were extracted from the urine samples in chloroform prior to the determination. The chloroform extraction was optimized for each analyte, studying the agitation time and the extraction pH, and the optimum values were 10 minutes and pH 3.5, respectively. The concentration ranges in chloroform solution of each of the analytes, used to construct the calibration matrix, were selected in the ranges from 0.15 to 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for flufenamic and meclofenamic acids and from 0.25 to 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for mefenamic acid. The combination of chloroform extraction and second-order calibration methods, using the excitation–emission matrices (EEMs) of the three analytes as analytical signals, allowed their simultaneous determination in human urine samples, in the range of approximately 80 mg L^{-1} to 250 mg L^{-1} , with satisfactory results for all the assayed methods. Improved results over unfolded-PLS and N-PLS were found with PARAFAC, SWATLD, and BLLS, methods that exploit the second-order advantage.

Index Headings: Second-order calibration; Excitation–emission matrices; Mefenamic acid; Flufenamic acid; Meclofenamic acid; Urine.

INTRODUCTION

Flufenamic (*N*-(α - α -trifluoro-*m*-tolyl) anthranilic acid), mefenamic (*N*-(2,3-xylyl) anthranilic acid), and meclofenamic (*N*-(2,6-dichlor-*m*-tolyl) anthranilic acid) acids are derivatives of *N*-phenylanthranilic acid and are widely used as nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). They have been proposed as potent analgesic and anti-inflammatory drugs in the treatment of rheumatoid arthritis, osteoarthritis, and other muscular-skeletal illnesses. However, the use of these drugs has been implicated in several cases of nephrotoxicity.¹ These compounds appear to owe their properties primarily to their capacity to inhibit cyclooxygenase. Unlike other NSAIDs, they may also antagonize certain effects of prostaglandins.²

Several methods have been proposed for the determination of these fenamic acids, which depend on polarographic,³ spectrophotometric,⁴ chromatographic,^{5,6} capillary electrophoresis,⁷ and flow injection^{8,9} techniques. The native fluorescence shown by these *N*-phenylanthranilic acid derivatives in organic solvents has also been used for their detection and determination.¹⁰

The application of luminescent techniques to the analysis of complex mixtures is particularly attractive due to the high sensitivity that can be achieved. However, conventional spectrofluorimetry has a restricted scope of application in the analysis of complex mixtures, because its selectivity is reduced by extensive spectral overlap.

In spectrometric analysis, the application of first-order multivariate calibration techniques for the analysis of mixture components with strong overlapping spectra is well known. Among the possible first-order regression methods from which to choose, partial least squares (PLS) is the most used. This method is mainly applied using the whole range of wavelengths (full-spectrum method), although it has been demonstrated that the method may be improved by wavelength selection, particularly for difficult multicomponent systems.¹¹

In a recent work, a new method has been proposed for the determination of flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acid mixtures by emission fluorescence, using a PLS calibration model with a previous wavelength selection by Kohonen artificial neural networks (K-ANN).¹² The method was applied to pharmaceutical preparations of these compounds, but not to biological samples.

An interesting characteristic of PLS is that calibration can be performed by ignoring the concentrations of all other components except the analyte of interest. However, all first-order methods, including PLS, are sensitive to the presence of unmodeled interferents. This situation is encountered when dealing with natural samples of complex composition, such as the presently studied urine samples. A good alternative to the problem of unexpected interferents is to move to second-order data,¹³ which are particularly suitable for the quantitative analysis of complex multicomponent samples.¹⁴ In recent years, second-order (three-way) data, such as excitation–emission fluorescence matrices (EEMs), have been gaining wide-spread analytical acceptance. Pertinent examples are the determination of 1-naphthol, carbaryl and carbofuran,¹⁵ naphthalene, 1-naphthol and 2-naphthol,¹⁶ triphenyltin,^{17,18} chlorophylls and pheopigments,¹⁹ verapamil,²⁰ propranolol, amiloride and dipyrindamole,²¹ naproxen, salicylic acid and salicylic acid,²² norfloxacin, enoxacin and ofloxacin,²³ doxorubicin,²⁴ piroxicam,²⁵ carbendazin, fuberidazole and thiabendazole,²⁶ ibuprofen,²⁷ ciprofloxacin,²⁸ carbamazepine and carbamazepine 1,10-epoxide,²⁹ and sulfathiazole.³⁰ The recording of this type of data conveys certain advantages: the measurements are carried out on a single instrument, the signals are selective and sensitive, and the obtained models are trilinear.

The different multiway methods used to resolve multicomponent mixtures belong to three main groups: (1) direct

Received 1 July 2005; accepted 30 December 2005.

* Author to whom correspondence should be sent. E-mail: arsenio@unex.es.

solution, (2) iterative, and (3) least-squares methods. The first group includes the generalized rank annihilation method (GRAM)³¹ and direct trilinear decomposition (DTLD).³² Examples of iterative methods are parallel factor analysis (PARAFAC),¹³ self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD),³³ residual bilinearization (RBL),³⁴ and *N*-way partial least squares (N-PLS).³⁵ N-PLS is the multidimensional variant of PLS and the PARAFAC algorithm is based on a least squares minimization, whereas SWATLD uses a procedure known as alternating trilinear decomposition. Bilinear least squares (BLLS) is a recently introduced technique, based on a direct least squares procedure.^{36,37} Iterative algorithms have been most widely employed, as they are considered to be less sensitive to instrumental noise and model deviations. Especially useful are PARAFAC and SWATLD, particularly when the data follow the so-called trilinear model.³⁵ This is due to the fact that decomposition of a three-way data array built with response matrices measured for a number of samples is often unique, allowing spectral profiles as well as relative concentrations of individual sample components to be extracted directly. This property has been named the *second-order advantage*¹⁴ and is fully exploited by both PARAFAC and SWATLD. It should be noted that BLLS, coupled to a separate procedure called residual bilinearization (RBL), has also been shown to be useful in this regard.²⁸

In the case where no relevant relationship between the various orders exists, an alternative is to rearrange the second-order data array into vectors and then apply a first-order method. This procedure leads to the unfolded-PLS method, mainly used before the popularization of true second-order methods.³⁸

In this work, a new method for the determination of flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids in urine samples is proposed by recording the excitation–emission fluorescence matrices (EEMs). The method is combined with multivariate calibration methods including unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD, and BLLS.

THEORY

Three-Way Trilinear Data. When a sample produces a $J \times K$ data matrix (a second-order tensor), such as an EEM (J = number of emission wavelengths, K = number of excitation wavelengths), the corresponding set obtained by “stacking” the matrices obtained for each of the I samples included in the calibration set is a three-dimensional array. Appropriate dimensions of such an array are $I \times J \times K$ (I = number of samples). Since EEMs follow a trilinear model, the array can be written as a sum of tensor product of three vectors for each fluorescent component. If \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , and \mathbf{c}_n collect the relative concentration ($I \times 1$), emission ($J \times 1$), and excitation ($K \times 1$) profiles for the component n , respectively, the data array $\underline{\mathbf{F}}$ can be written as:

$$F_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ijk} \quad (1)$$

where F_{ijk} is the intensity recorded for the i th sample at j and k channels, N is the total number of responsive components, a_{in} is the relative concentration (or score) of component n in the i th sample, b_{jn} and c_{kn} are the signal intensities at channels j and k in each dimension for component n , and E_{ijk} are the elements of the array $\underline{\mathbf{E}}$, which is a residual error term of the same

dimensions as $\underline{\mathbf{F}}$. The column vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , and \mathbf{c}_n are usually collected into the three loading matrices \mathbf{A} , \mathbf{B} , and \mathbf{C} .

A characteristic property of $\underline{\mathbf{F}}$ is that it can be uniquely decomposed, providing access to spectral profiles (\mathbf{B} and \mathbf{C}) and relative concentrations (\mathbf{A}) of individual components in the I mixtures, whether they are chemically known or not. This constitutes the basis of the so-called second-order advantage.

One popular alternative to decomposing the array $\underline{\mathbf{F}}$ of Eq. 1 is to employ the PARAFAC algorithm. Its underlying theory has been exhaustively described.¹⁴ This method was implemented using an external calibration sample set, and the EEM of the unknown component was added to this training sample set before decomposition of the three-dimensional data array.³⁹

The PARAFAC components will estimate the signals from the individual fluorophores if the data are approximately low-rank trilinear and when the correct number of components is used. In this work, the number of components has been estimated using the CORCONDIA diagnostic test⁴⁰ and using an alternative approach considering the regression error of the pseudo-univariate calibration; the regression error is stabilized when the correct number of factors is reached.²³

Chen et al.³³ proposed a novel algorithm called self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD). This methodology attempts to fit the array $\underline{\mathbf{F}}$ to the trilinear model shown in Eq. 1 by defining three objective functions to be minimized rather than the single one in PARAFAC. These three functions are alternatively minimized by least squares. With this algorithm the calculations are faster and it is less sensitive to an excess on the number of factors used for the model according to its authors. Once the three-way decomposition of $\underline{\mathbf{F}}$ has been performed by SWATLD, the remaining calibration/prediction process is analogous to that described above for PARAFAC.

The BLLS technique^{36,37} has been introduced as an appealing second-order chemometric technique, based on a completely different philosophy as compared to PARAFAC, and showing the important characteristics of handling multiple standard samples and exploiting the second-order advantage. This algorithm is based on a calibration step where unfolded matrices and analyte concentrations are employed in order to build a model that is similar to classical least squares analysis. This model renders unit-concentration signals for each analyte, which can be reshaped into matrices and employed to estimate analyte profiles in both dimensions by singular value decomposition.^{36,37} If there were no interferences in an unknown sample, these profiles could be used to safely predict the analyte concentrations. However, the presence of uncalibrated substances leads to the calculation of large spectral residuals. However, the latter ones can be modeled, if they show a bilinear structure, by a technique called residual bilinearization (RBL),³⁷ which is usually implemented in the form of an iterative algorithm.

The BLLS technique has been tested using simulated data sets and relatively simple experimental examples and has been claimed to give results of at least the same quality as PARAFAC.³⁹ To the best of our knowledge, however, BLLS has not been seriously tested against real samples of high complexity, such as those of biological origin. In a recent report, BLLS was employed to predict the concentration of the antibiotic ciprofloxacin in human urine samples using second-order fluorescence data.²⁸

On the other hand, in N-PLS the three-way array of independent variables is decomposed into a trilinear model,

which, however, is not fitted in a least squares sense.³⁵ According to the philosophy of the partial least-squares model, it intends to describe the covariance of the dependent and the independent variables. Although the N-PLS model is unique, the uniqueness in this case does not imply that real underlying phenomena like pure-analyte spectra can be recovered, because the model assumptions do not reflect any fundamental or theoretical model. Furthermore, N-PLS does not exploit the second-order advantage. In addition, unfolded-PLS, in which the second-order EEMs data are rearranged into vectors, giving rise to concatenated first-order data, has also been used.

EXPERIMENTAL

Apparatus. Fluorescence spectral measurements were performed on a Fluorescence Spectrophotometer Varian Model Cary Eclipse. The instrument consists of two Czerny–Turner monochromators (excitation and emission), a xenon light source, a range of fixed-width selectable slits, selectable filters, attenuators, and two photomultiplier tubes as detectors. The fluorimeter is connected to a PC microcomputer via an IEE serial interface. The Cary Eclipse Version 1.0 software was used for data acquisition, data interpretation, and graphical display. All measurements were performed in 10 mm quartz cells at 20 °C, by use of a thermostatic cell holder and a Selecta Model Frigiterm thermostatic bath. EEMs were registered in the ranges $\lambda_{em} = 360\text{--}550$ nm, every 3 nm, and $\lambda_{ex} = 230\text{--}400$ nm, every 5 nm.

Software. All calculations were done using MATLAB 5.3.⁴¹ Appropriate routines for applying N-PLS and PARAFAC, developed by Bro, are available on the internet,⁴² although a useful MATLAB graphical interface was developed for easy data manipulation and graphics presentation.⁴³ The interface also implements SWATLD³³ and the BLLS method, in this case following the algorithm described in Refs. 36 and 37. This interface provides a simple means of loading the data matrices into the MATLAB working space before running unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD, and BLLS. It also allows selecting appropriate recording spectral regions, optimizing the number of factors, and plotting emission and excitation spectral profiles and pseudounivariate calibration graphs. This MATLAB interface code is available from the authors on request.

Reagents. All solutions were prepared in chloroform; stock solutions of flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids (Sigma), containing 100 mg L⁻¹ of each compound, were prepared in 100 mL volumetric flasks by dissolving 10.0 mg of each drug in chloroform. These solutions were stored in dark bottles at 4 °C, remaining stable for at least 1 month. Working solutions were prepared by appropriate dilution of the stock solutions with chloroform.

Excitation and Emission Spectra of the Three Compounds. There are some literature reports in which chloroform is selected for obtaining fluorescence emission from these compounds.^{10,12,44} Chloroform solutions were prepared from flufenamic acid, mefenamic acid, and the sodium salt of meclofenamic acid. The first two compounds can be easily dissolved in chloroform. On the other hand, the sodium salt of meclofenamic acid cannot be dissolved directly in this solvent. To obtain the acidic form, 1.0 g of the salt is dissolved in 100 mL of water, and then hydrochloric acid is added until all the acid is precipitated. After filtration and recrystallization, the acidic form is dried during four days in a vacuum stove. To check the compound purity, infrared (IR) and nuclear magnetic

resonance (NMR) spectra were obtained, and melting point studies were made. Once the acidic form was obtained, the stock solutions in chloroform were prepared (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The stability of these solutions was monitored during one month, and they were stable during this period.

In Fig. 1, the excitation and emission spectra of the drugs are shown. It can be observed that mefenamic acid exhibits two excitation maxima at 280 and 353 nm, and one emission maximum at 463 nm. Flufenamic acid presents three excitation maxima at 252, 287, and 343 nm, respectively, and one emission maximum at 422 nm, whereas meclofenamic acid presents three excitation maxima at 252, 280, and 334 nm, respectively, and one emission maximum at 402 nm. These maxima are in agreement with previous reports.^{10,12,44}

Excitation–Emission Matrices: Selection of Spectral Ranges. In order to establish the ranges in which linearity between fluorescence intensity and concentration exists for the three compounds, different stock solutions were prepared in 10.0 mL flasks. For each drug, the maximum excitation wavelengths were used. Both meclofenamic and flufenamic acids showed a linear range up to 0.8 $\mu\text{g mL}^{-1}$, whereas mefenamic acid showed a linear range up to 3.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. To build these regression lines, each standard was prepared in triplicate.

In the above-mentioned chemical conditions, maximum information on the three drugs can be scanned in the region $\lambda_{em} = 360\text{--}550$ nm, exciting in the range 230–400 nm, and excitation and emission slits maintained at 5 and 10 nm, respectively. In Fig. 2, with complete EEMs, we can observe the presence of the first-order Rayleigh and second-order diffraction grating harmonic scattering signals. As is known, scattering does not contain any information concerning the fluorescence properties of the sample. To avoid these signals, the wavelength ranges have been reduced, that is, emission from 381 to 537 nm, at 3 nm intervals, and excitation from 273 to 370 nm, at 5 nm intervals, were selected for the analysis.

Calibration and Test Sets. A 15-sample set was built for calibration with unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC,

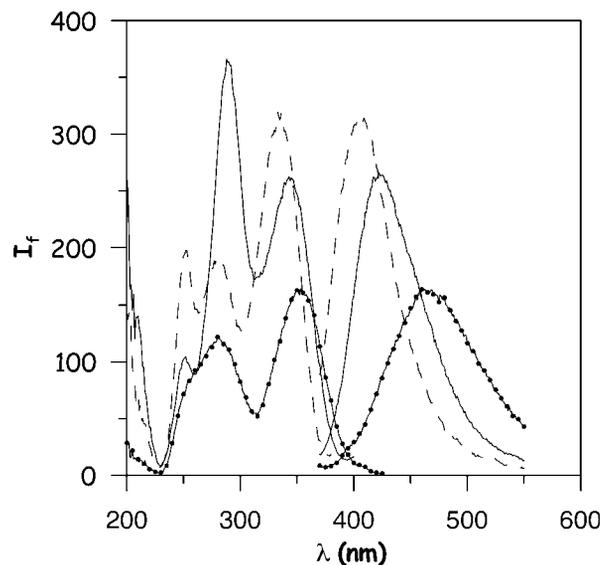


Fig. 1. Excitation and emission spectra of (—●—●) mefenamic (2 mg L⁻¹) ($\lambda_{ex} = 280, 353$ nm; $\lambda_{em} = 463$ nm); (—) flufenamic (0.75 mg L⁻¹) ($\lambda_{ex} = 252, 287, 343$ nm; $\lambda_{em} = 422$ nm); and (- - -) meclofenamic (0.75 mg L⁻¹) ($\lambda_{ex} = 252, 280, 334$ nm; $\lambda_{em} = 402$ nm).

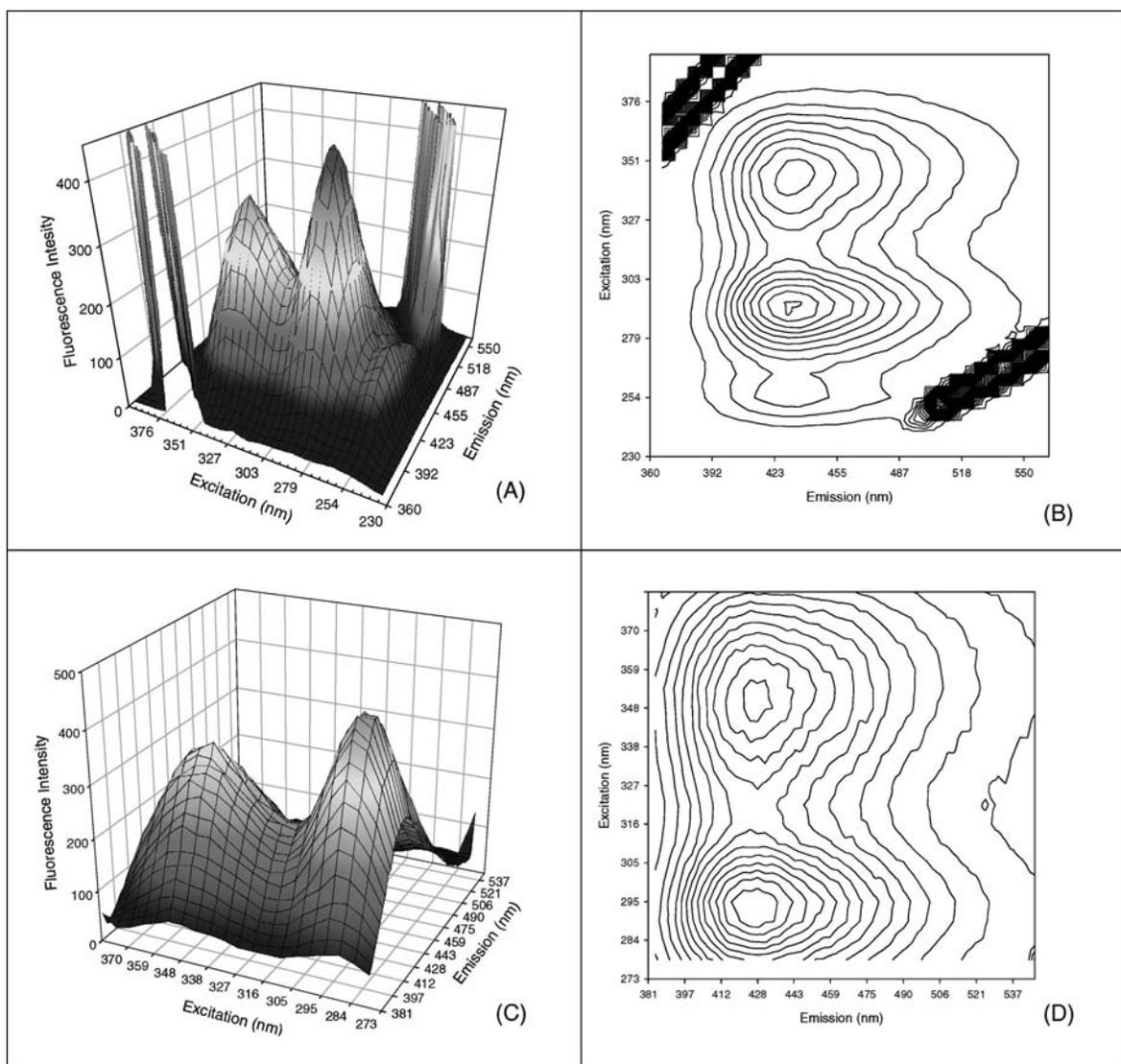


FIG. 2. (A and C) Three-dimensional EEM and (B and D) contour plots of the first calibration standard containing mefenamic, $0.634 \mu\text{g mL}^{-1}$, flufenamic, and meclofenamic acids, $0.168 \mu\text{g mL}^{-1}$, in chloroform. (A and B) Complete spectral region and (C and D) selected spectral region.

SWATLD, and BLS models. The analyte concentrations corresponded to a central composite design, formed by a three-component full-factorial design at two levels (i.e., $2^3 = 8$ samples), a central point (one sample), and a star design ($2 \times 3 = 6$ samples), making a total of 15 samples (samples M1 to M15, Table I). The extreme concentrations for the design were as follows: mefenamic acid, $0.00\text{--}3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, meclofenamic and flufenamic acids, $0.00\text{--}0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$. A validation set (samples V1 to V10, Table I) was also prepared in the same form as those for calibration, but using a random design, i.e., selecting the target concentrations of the three analytes at random from the calibration range for each analyte.

RESULTS AND DISCUSSION

Selection of the Number of Factors and Validation of the Synthetic Samples. The set of 10 test ternary samples was investigated with the aid of the five multivariate calibration methods described, before performing the analysis in the real urine samples. Although in principle three fluorophores are

expected for these samples, the selection of the optimum number of components was performed.

For unfolded-PLS and N-PLS, cross-validation and the Haaland and Thomas criterion⁴⁵ were employed to choose the optimum number of factors, and three factors were found for both methods, and for each of the three components of the mixture.

In PARAFAC, when the variation of the core consistency⁴⁰ is plotted versus the trial number of components, the core value drops when a number of factors higher than three was used. Three factors were considered the optimum for the prediction step in this case for each of the mixture components. In SWATLD, an optimum of three factors was also selected for the prediction of the samples included in the validation set.

The optimum number of factors in the BLS model was calculated by analyzing the regression error.^{36,37} An optimum of three factors was selected, because using a higher number of factors does not produce any change in the regression error value.

With the aim of validating the proposed chemometric methods, the set of ten ternary mixture samples was analyzed. The analyte concentrations were within the calibration set

TABLE I. Concentration of mefenamic, flufenamic, and meclofenamic acids in each of the samples of the calibration (M1 to M15) and validation sets (V1 to V10).

Sample	Mefenamic acid Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Meclofenamic acid Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Flufenamic acid Concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
M1	0.634	0.168	0.168
M2	0.634	0.168	0.632
M3	0.634	0.632	0.168
M4	0.634	0.632	0.632
M5	2.40	0.168	0.168
M6	2.40	0.168	0.632
M7	2.40	0.632	0.168
M8	2.40	0.632	0.632
M9	0.00	0.40	0.40
M10	3.00	0.40	0.40
M11	1.50	0.00	0.40
M12	1.50	0.80	0.40
M13	1.50	0.40	0.00
M14	1.50	0.40	0.80
M15	1.50	0.40	0.40
V1	1.95	0.60	0.60
V2	1.95	0.52	0.72
V3	0.00	0.36	0.52
V4	1.05	0.60	0.36
V5	1.05	0.20	0.52
V6	1.05	0.00	0.20
V7	0.45	0.72	0.36
V8	0.45	0.36	0.00
V9	2.55	0.20	0.36
V10	2.85	0.72	0.20

range (samples V1 to V10, Table I). In these samples, no interferences were added and each sample was analyzed in duplicate. In Table II, the results of the validation with the five chemometric methods employed are shown. It can be observed that the results of the analysis of the validation set are satisfactory for all the methods, in the synthetic samples analyzed, with mean recovery values, in percentage, ranging from 96 to 106%.

Urine Sample Analysis. To determine these compounds in urine samples, the first step of the analysis must be the extraction of the drugs from the aqueous medium (biological fluid) to the organic medium, in which the calibration has been developed.

These drugs are soluble in water when the pH is basic. The working solutions were prepared using NaOH 0.2 M (pH 10.4). The chloroform extraction was optimized for each analyte, studying the agitation time and the extraction pH.

Optimization of the Chloroform Extraction. The optimization of the extraction in chloroform of each analyte was performed separately. In 10 mL flasks, aqueous solutions of the

three analytes were prepared. The pH was modified with HCl 0.1 M, since an acidic medium was necessary to obtain the acid form of our analytes and to extract them in chloroform. This aqueous solution was placed in a decantation funnel, to which another 10 mL of chloroform was added; the mixture was shaken and, after the phases were separated correctly, the organic phase was collected through a funnel that contained sodium sulfate. This final solution was used for recording the three-dimensional EEM spectra. These spectra were compared with those obtained for stock solutions of the three analytes in chloroform. After exploring different times for agitation and different values for pH, though always acidic, the following values were found to be optimum: an agitation time of 10 minutes and a pH of 3.5.

Ten different samples with different concentrations of the analytes were analyzed. In all the cases, satisfactory results were found for the extraction of the three analytes under the selected conditions.

After verifying that the extraction of the synthetic mixtures was acceptable, it was probed with real urine samples. Each analyte was tested to verify the degree of extraction. First, the maximum dilution was established according to the biological limits. A 1 mL aliquot of urine was contaminated with the analytes, and the sample was allowed to sit for 10 minutes to favor the interactions. Next, it was diluted to 50 mL. From this flask, 5 mL were removed and placed in a 25 mL flask, to which 5 mL of chloroacetic/chloroacetate sodium solution of pH 3.5 was added, with the balance of milliQ water added. This solution was placed in a decantation funnel and 25 mL of chloroform was added. During 10 minutes the samples were shaken and then they were allowed to rest in order to separate the phases. After that, the organic phase was taken. In Fig. 3 we can observe the emission spectra for stock solutions and extracted solutions, indicating that the extraction step is practically quantitative. Under these experimental conditions, the different excitation–emission spectra were recorded in order to apply unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD, and BLLS.

Selection of the Number of Factors. In order to determine the optimum number of factors in each urine sample in the case of PARAFAC, the value of the core consistency was analyzed.⁴⁰ Figure 4 shows the value obtained for the 15-calibration-sample array when studying urine sample number 1. As can be seen, the core consistency drops to a very low value when using five spectral components to model the array, suggesting that $N=4$ is an optimum choice. The same number of factors was also found for the remaining urine samples, showing that although the calibration samples were built starting from the pure analytes, the presence of urine is considered as a single extra component by PARAFAC and SWATLD.

TABLE II. Validation statistical results for the simultaneous determination of mefenamic, flufenamic, and meclofenamic acids in the validation set of synthetic samples, by application of the different multivariate calibration methods.

	Mean recovery (%)			RMSEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$) ^a		
	Mefenamic acid	Meclofenamic acid	Flufenamic acid	Mefenamic acid	Meclofenamic acid	Flufenamic acid
Unfolded-PLS	106	105	96	0.04	0.06	0.04
N-PLS	106	106	99	0.04	0.05	0.05
PARAFAC	105	105	102	0.03	0.04	0.04
SWATLD	104	104	102	0.03	0.04	0.04
BLLS	105	105	101	0.04	0.04	0.03

^a RMSEP: root mean square error of prediction = $[1/(I - 1) \sum_1^I (C_{\text{act}} - C_{\text{pred}})^2]^{1/2}$ where I is the number of prediction samples, and C_{act} and C_{pred} are the actual and predicted concentrations, respectively.

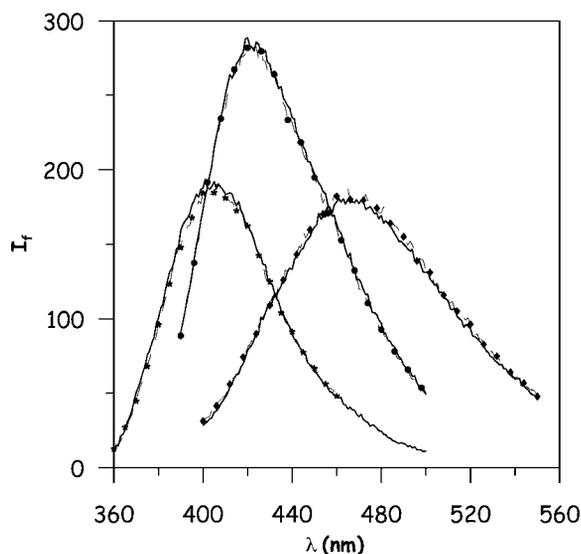


FIG. 3. Emission spectra of the extraction from the fortified urine samples and of the corresponding standards in chloroform. (—) Stock solutions, (---) flufenamic acid, (---) mefenamic acid, and (---) meclofenamic acid extracts.

An alternative approach, considering the regression error ($S_{y/x}$) of the pseudo-univariate calibration plot obtained when representing the actual concentration of each analyte in the samples of the calibration set versus the predicted concentration by the model, was also applied.²³ This procedure was applied for each unknown sample. Figure 5 shows that, in the case of urine sample number 1, the regression error for each of the three analytes is stabilized after selecting four spectral components, in agreement with the core consistency diagnostic. The optimum number of factors in the BLS model was calculated analyzing the regression error.^{36,37} The residuals of the BLS prediction least squares fit, computed for the trial number of components will show decreasing values until stabilizing at a value compatible with instrumental noise, allowing the determination of the correct number of components (Fig. 4). Four factors were sufficient to obtain a good least squares fit for all unknown samples.

The identification of the chemical constituents under investigation is done with the aid of the spectral profiles extracted by PARAFAC and comparing them with those for standard solutions of the pure analytes of interest.

Absolute analyte concentrations are obtained after proper calibration by employing the set of calibrations described earlier (see Experimental section). The method involves decomposing an array formed by joining the EEMs for the I training samples with that for the unknown samples. It should be noticed that employing this method implies that the array decomposition should be repeated for each newly analyzed sample.

Figure 6 shows a plot of the loading matrices provided by PARAFAC when processing urine sample number 1 together with the calibration set and excitation and emission spectral profiles (loading matrices) **B** and **C** (Figs. 6A and 6B). The components have been labeled with the order assigned by the model. The components appear as a function of their contribution to the total variance. In this case, the urine appears in last place because it is the origin of the minor fluorescence intensity contribution, as the extraction step

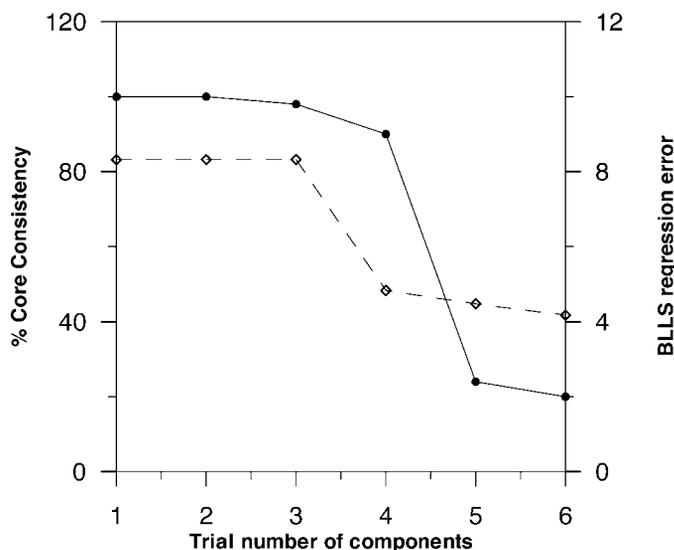


FIG. 4. Plot of the PARAFAC core consistency values (—●—●—) and BLS least squares regression error values (---◇---◇---) as a function of the trial number of components, for the cube composed of the EEM for urine sample number 1 and the 15-calibration EEMs. The solid and dotted lines are connecting the points (PARAFAC and BLS, respectively).

eliminates most of the possible fluorescence interferences from the urine samples. Excitation and emission experimental spectra of pure standard analytes (Figs. 6C and 6D) have been compared, allowing assignment of the components. The comparison of the excitation and emission profiles extracted by the PARAFAC model with the experimental ones shows a satisfactory agreement.

Urine Sample Results. In Table III, the concentration values found for the three components in the set of urine samples analyzed, using four factors for PARAFAC, SWATLD, and BLS, and three factors for unfolded-PLS and NPLS, are summarized. Urine samples were spiked with concentration values of flufenamic acid from 90 to 150 mg L⁻¹, mefenamic acid from 100 to 250 mg L⁻¹, and meclofenamic acid from 80 to 150 mg L⁻¹, respectively, which are in the ranges of physiological levels.^{46,47} Pérez Ruiz et al.⁷ determined mixtures of the three acids, by capillary electrophoresis, in urine samples in the range of concentrations between 30 and 200 mg L⁻¹ and Fatma A. Aly et al.⁹ determined mixtures of flufenamic and mefenamic acids, by chemiluminescence, in the range of concentrations up to 200 mg L⁻¹.

All predictions are seen to be reasonable for samples of the complexity of human urine. In comparing the root mean square errors of prediction values provided by the different algorithms, it seems that PARAFAC, SWATLD, and BLS perform somewhat better than unfolded-PLS and N-PLS.

In order to gain further insight into the accuracy of the different algorithms herein analyzed, linear regression analysis of nominal versus found concentration values was applied for each procedure. The estimated intercept and slope (\hat{a} and \hat{b} , respectively) were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region (EJCR) test.⁴⁸ Figure 7 shows the EJCRs for the employed chemometric methods. As can be seen, although all the ellipses contain the theoretical ($a = 0$, $b = 1$) point, in those corresponding to unfolded-PLS and N-PLS, the point is in an extreme of the ellipse, and the ellipses show a larger size, indicating less

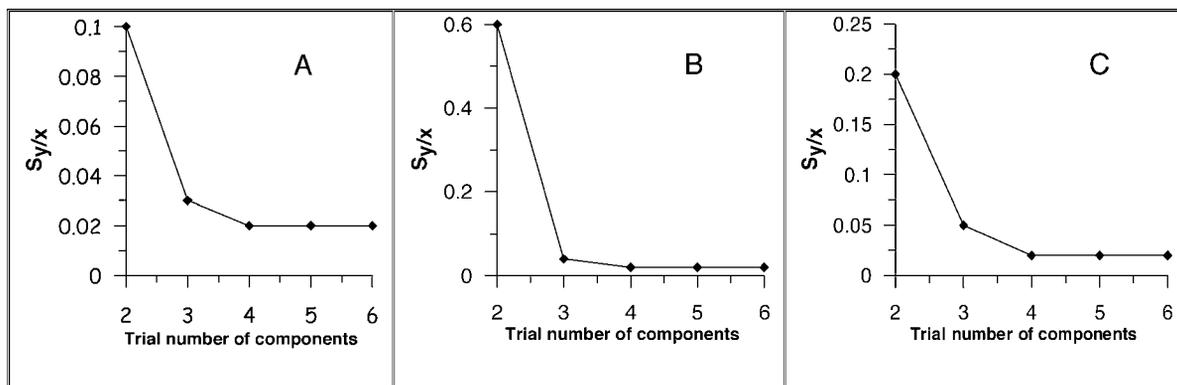


FIG. 5. Plot of regression errors ($S_{y/x}$) for the PARAFAC pseudo-univariate calibration graphs, generated for each of the three analytes, as a function of the trial number of components, for the cube composed of the EEM for urine sample number 1 and the 15-calibration EEMs. (A) Flufenamic acid, (B) meclofenamic acid, and (C) mefenamic acid.

precise results. On the contrary, the theoretical point is totally included in the ellipses corresponding to the PARAFAC, SWATLD, and BLS models, which also present a smaller size, indicating more precise results.

CONCLUSION

The fluorimetric determination of flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids in a complex matrix such as human urine samples, using second-order multivariate calibration techniques, is demonstrated to be feasible. An adequate

selection of the excitation and emission ranges, selected to avoid first-order Rayleigh and second-order diffraction grating harmonic signals, improved the predictive capacity of the model. All the assayed algorithms, unfolded-PLS, N-PLS, PARAFAC, SWATLD, and BLS, are capable of modeling the system in the present situation, in which a previous chloroform extraction practically eliminated the possible urine interferences. However, when a complex and in part unknown matrix is present, the application of the methods exploiting the second-order advantage (PARAFAC, SWATLD, and BLS), inherent to this type of method, permits the simultaneous

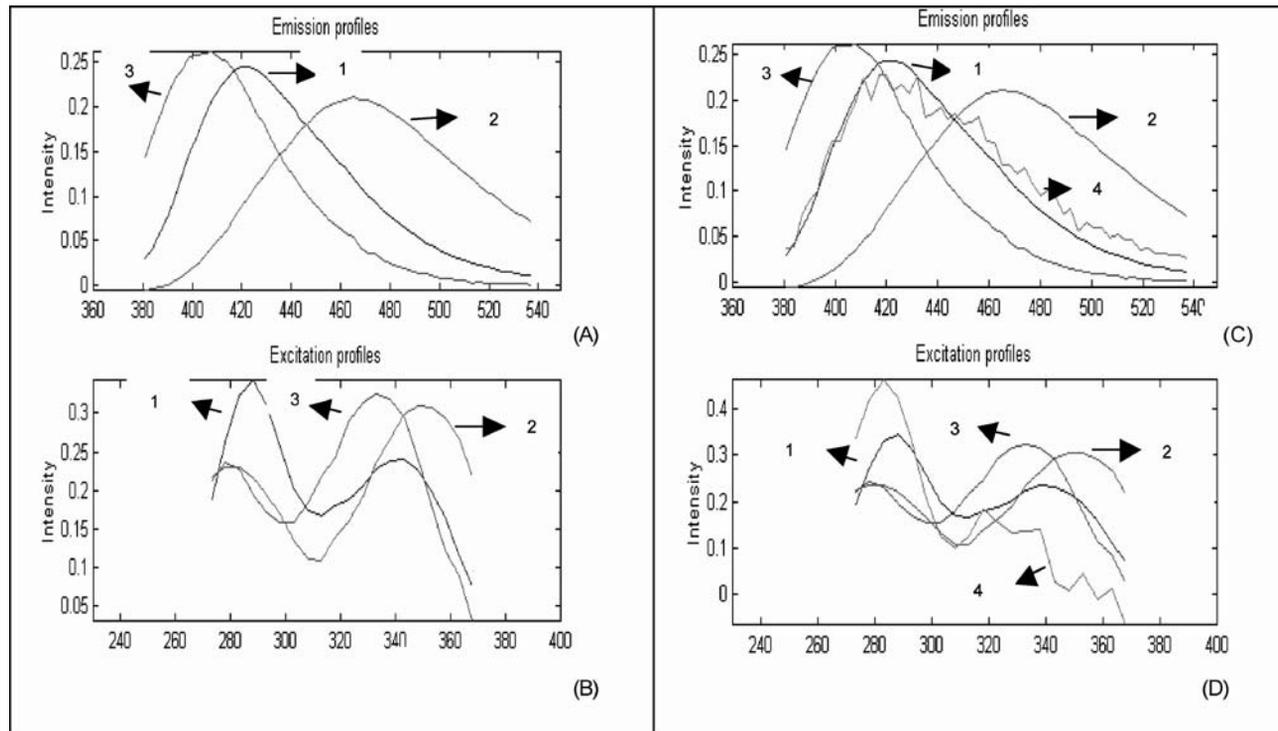


FIG. 6. (A) Normalized experimental emission spectra for the three studied analytes, as indicated, using $\lambda_{ex} = 353$ nm. The spectra were recorded every 3 nm in the same spectral range as in (C) for proper comparison. (B) Normalized experimental excitation spectra (at $\lambda_{em} = 463, 422,$ and 402 nm, for mefenamic acid, flufenamic acid, and meclofenamic acid, respectively), recorded every 5 nm in the same spectral range as in (D). (C) Emission profiles provided by a four-component PARAFAC model (B matrix) used to process the cube formed by sample number 1 and the 15 calibration samples. The components are labeled according to the contribution to the overall spectral variance ($I =$ flufenamic acid, $2 =$ mefenamic acid, $3 =$ meclofenamic acid, and $4 =$ urine). (D) Excitation profiles (C matrix).

TABLE III. Prediction results obtained when applying the different multivariate second-order calibration methods to urine samples contaminated with flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids.

	Mefenamic acid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						Meclofenamic acid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						Flufenamic acid ($\mu\text{g mL}^{-1}$)					
	Added			Found			Added			Found			Added			Found		
	U-PLS	N-PLS	PARAFAC	SWATLD	BLLS		U-PLS	N-PLS	PARAFAC	SWATLD	BLLS		U-PLS	N-PLS	PARAFAC	SWATLD	BLLS	
1	100	107	106	105	100	100	95	95	96	95	95	75	65	65	72	72	71	
2	250	245	242	255	255	100	110	110	95	95	95	100	87	88	88	89	87	
3	100	112	110	106	107	150	157	158	153	153	153	150	155	156	152	152	151	
4	200	207	208	205	205	80	87	88	90	91	90	110	110	111	112	113	112	
5	150	142	142	140	142	125	135	136	137	136	137	100	87	88	96	97	97	
6	150	162	160	160	160	125	136	135	136	136	137	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.0	
7	150	150	152	153	154	100	96	97	98	98	97	0.00	0.01	0.00	0.01	0.02	0.01	
8	200	212	214	192	192	100	110	110	107	108	108	0.00	0.005	0.006	0.01	0.01	0.0	
9	100	107	107	105	106	0.00	0.00	0.01	0.005	0.01	0.01	150	155	155	148	147	147	
10	150	162	162	160	161	0.00	-0.01	0.00	0.01	0.0	-0.01	150	150	150	151	152	152	
11	0.00	0.005	0.01	0.0	0.0	100	101	100	101	101	101	120	112	113	112	112	113	
12	0.00	0.005	0.005	0.01	0.01	130	140	141	137	138	138	150	148	147	152	152	153	
13	150	160	162	156	155	0.00	0.01	0.0	0.005	0.0	0.01	0.00	0.02	0.01	0.01	0.01	0.0	
14	100	112	114	108	108	0.00	0.005	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.005	0.01	0.01	
15	0.00	0.01	0.01	0.0	0.0	75	67	68	67	68	67	0.00	0.007	0.01	0.00	0.01	0.0	
16	0.00	0.00	0.005	0.01	0.01	100	107	108	107	108	107	0.00	0.01	0.02	0.01	0.01	0.0	
17	0.00	-0.01	0.00	0.0	-0.01	0.00	-0.01	-0.01	0.01	0.0	-0.01	100	110	110	107	107	108	
18	0.00	0.01	0.01	0.0	0.02	0.00	0.02	0.01	0.01	0.0	0.02	110	110	110	111	112	112	
19	0.00	0.006	0.005	0.01	0.01	0.00	0.00	0.01	0.005	0.01	0.01	0.00	0.02	0.01	0.00	0.01	0.005	
20	0.00	0.01	0.01	0.0	0.02	0.00	0.008	0.01	0.01	0.0	0.02	0.00	0.005	0.01	0.008	0.01	0.01	

Statistical results									
	MR (%) ^a	REP (%) ^b	RMSEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MR (%) ^a	REP (%) ^b	RMSEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	MR (%) ^a	REP (%) ^b	RMSEP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Unfolded-PLS	108	11.9	0.09	105	9.8	0.05	104	8.2	0.05
N-PLS	108	11.8	0.08	106	10.0	0.05	103	8.1	0.04
PARAFAC	106	10.8	0.07	102	9.0	0.04	102	7.9	0.04
SWATLD	107	11.0	0.07	103	9.4	0.05	103	8.0	0.04
BLLS	106	10.4	0.07	102	9.0	0.04	102	7.9	0.04

^a MR: mean recovery (%).

^b REP: relative error of prediction = $(100/\bar{c}) \times \text{RMSEP}$, where \bar{c} is the average component concentration.

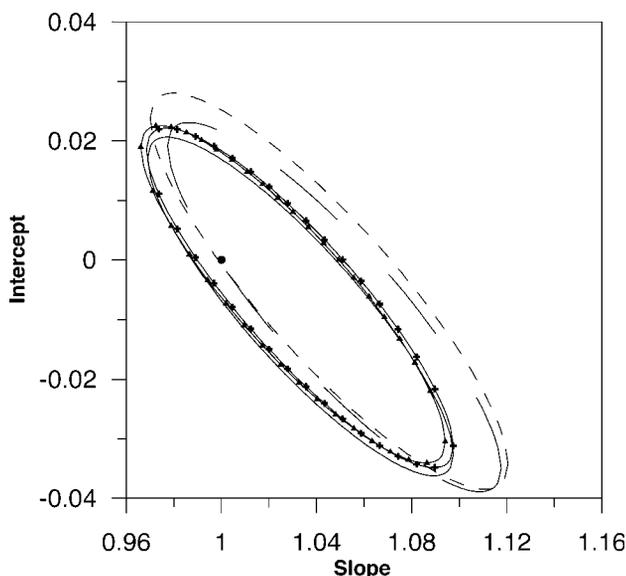


FIG. 7. Elliptical joint confidence regions (EJCRs) for the slope and intercept corresponding to regressions of predicted versus added concentrations of flufenamic, mefenamic, and meclofenamic acids, when applying the (—) unfolded-PLS; (---) N-PLS; (—▲—) PARAFAC; (—+—) SWATLD; and (—) BLLS calibration methods. The large black circle marks the theoretical ($a = 0$, $b = 1$) point.

determination of the analytes of interest in the presence of unmodeled interferents that may be extracted from the urine in the chloroform extraction step. Adequate recovery values are obtained in all cases when several urine samples are analyzed, although these latter algorithms, those exploiting the second-order advantage, produce predictive results of superior quality, providing more precise results.

ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by DGI-MCYT of Spain (Project CTQ2005-02389). Diego Bohoyo Gil is grateful to the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura for a fellowship (DOE 21/06/01). Financial support was also provided by CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Universidad Nacional de Rosario.

1. P. A. Insel, in *The Pharmacological Basis of Therapeutics* (McGraw-Hill, New York, 1996), Chap. 27.
2. K. A. McGurk, R. P. Rimmel, V. P. Hosagrahara, D. Tosh, and B. Burchell, *Drug Metab. Dispos.* **24**, 842 (1996).
3. O. R. Pryakhim, V. A. Vdoviko, S. A. Pokhmelnina, V. V. Petrenko, and V. A. Golowkin, *Khim. Farm. Zh.* **15**, 93 (1981).
4. A. S. Issa, Y. A. Beltagy, M. Gabr Kassem, and H. G. Daabees, *Talanta* **32**, 209 (1985).
5. L. J. Dusci and L. P. Hackett, *J. Chromatogr.* **161**, 340 (1978).
6. L. Cotellesa, R. Riva, P. Salva, F. Marcucci, F. Mussini, and E. Mussini, *J. Chromatogr.* **192**, 441 (1980).
7. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, and E. Bravo, *J. Chromatogr., B* **708**, 249 (1998).

8. M. I. Albero, C. Sánchez-Pedreño, and M. S. García, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **13**, 113 (1995).
9. F. A. Aly, S. A. Al-Tamimi, and A. A. Alwarthan, *Anal. Chim. Acta* **416**, 87 (2000).
10. A. C. Mehta and S. G. Schulman, *Talanta* **20**, 702 (1973).
11. A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, D. González Gómez, and F. Salinas, *Talanta* **62**, 853 (2004).
12. L. F. Capitán Valley, N. Navas, M. Del Olmo, V. Consonni, and R. Todeschini, *Talanta* **52**, 1069 (2000).
13. R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **38**, 149 (1997).
14. K. S. Booksh and B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* **66**, 782A (1994).
15. R. D. Jiji and K. S. Booksh, *Anal. Chem.* **72**, 718 (2000).
16. Y. Z. Cao, Z. P. Chen, C. Y. Mo, H. L. Wu, and R. Q. Yu, *Analyst (Cambridge, U.K.)* **125**, 2303 (2000).
17. J. Saurina and R. Tauler, *Analyst (Cambridge, U.K.)* **125**, 2038 (2000).
18. J. Saurina, C. Leal, R. Compañó, M. Granados, R. Tauler, and M. D. Prat, *Anal. Chim. Acta* **409**, 237 (2000).
19. L. Moberg, G. Robertson, and B. Karlberg, *Talanta* **54**, 161 (2001).
20. J. C. G. Esteves da Silva, J. M. M. Litao, F. S. Costa, and J. L. Ribeiro, *Anal. Chim. Acta* **453**, 105 (2002).
21. Y. Z. Cao, C. Y. Mo, J. G. Long, H. Chen, H. L. Wu, and R. Q. Yu, *Anal. Sci.* **18**, 333 (2002).
22. J. A. Arancibia, A. C. Olivieri, and G. M. Escandar, *Anal. Bioanal. Chem.* **374**, 451 (2002).
23. A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, D. González-Gómez, A. C. Olivieri, and H. C. Goicochea, *Anal. Chem.* **75**, 2640 (2003).
24. M. G. Trevisan and R. J. Poppi, *Anal. Chim. Acta* **493**, 69 (2003).
25. J. A. Arancibia and G. M. Escandar, *Talanta* **60**, 1113 (2003).
26. M. J. Rodríguez-Cuesta, R. Boque, F. X. Rius, D. Picón-Zamora, M. Martínez-Galera, and A. Garrido-Frenich, *Anal. Chim. Acta* **491**, 47 (2003).
27. L. A. Hergert and G. M. Escandar, *Talanta* **60**, 235 (2003).
28. P. C. Damiani, A. J. Nepote, M. Berzotti, and A. C. Olivieri, *Anal. Chem.* **76**, 2798 (2004).
29. G. M. Escandar, D. González Gómez, and A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, and H. C. Goicochea, *Anal. Chim. Acta* **506**, 161 (2004).
30. M. C. Mahedero, N. Mora Díez, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, and D. Bohoyo Gil, *Talanta* **65**, 806 (2004).
31. E. Sánchez and B. R. Kowalski, *Anal. Chem.* **58**, 496 (1986).
32. E. Sánchez and B. R. Kowalski, *J. Chemom.* **2**, 265 (1988).
33. Z. P. Chem, H. L. Wu, Y. Li, and R. Q. Yu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **52**, 75 (2000).
34. J. Ohman, P. Geladi, and S. Wold, *J. Chemom.* **4**, 79 (1990).
35. R. Bro, *J. Chemom.* **10**, 47 (1996).
36. M. Linder and R. Sundberg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **42**, 159 (1998).
37. M. Linder and R. Sundberg, *J. Chemom.* **16**, 12 (2002).
38. A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, and A. Zamoro, *Quím. Anal. (Barcelona)* **13**, 106 (1994).
39. C. M. Andersen and R. Bro, *J. Chemom.* **17**, 200 (2003).
40. R. Bro and H. A. L. Kiers, *J. Chemom.* **17**, 274 (2003).
41. MATLAB 5.3 (The Mathworks, Inc., Natick, MA, 1999).
42. <http://www.models.kvl.dk/source/>.
43. A. Olivieri, MVC2, Universidad Nacional de Rosario, Argentina (2003).
44. T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, V. Tomás, and J. Carpena, *Talanta* **47**, 537 (1998).
45. D. M. Haaland and E. V. Thomas, *Anal. Chem.* **60**, 1193 (1998).
46. J. E. F. Reynolds, Ed., *Martindale: The Extra Pharmacopoeia* (The Pharmaceutical Press, London, 1996).
47. E. Abignente and P. Caprariis, *Analytical Profiles of Drugs Substances*, K. Florey, Ed. (Academia Press, New York, 1982), vol. 11.
48. A. G. González, M. A. Herrador, and A. G. Asuero, *Talanta* **48**, 729 (1999).

Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data

Juan A. Arancibia^a, Alejandro C. Olivieri^{a,*}, Diego Bohoyo Gil^b,
Anunciación Espinosa Mansilla^b, Isabel Durán-Merás^b, Arsenio Muñoz de la Peña^b

^a *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario, Suipacha 531, Rosario, S2002LRK, Argentina*

^b *Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Extremadura, 06071 Badajoz, Spain*

Received 18 April 2005; received in revised form 29 July 2005; accepted 2 August 2005

Available online 8 September 2005

Abstract

A new chemometric algorithm, trilinear least-squares (TLLS) coupled to residual trilinearization (RTL), developed as an extension of one of the variants of bilinear least-squares (BLLS), the so-called singular value decomposition-least-squares (SVD-LS) coupled to residual bilinearization (RBL), is described for the analysis of four-way data. Monte Carlo numerical simulations are employed to compare its performance with that of the well-known parallel factor analysis (PARAFAC) model, and also with the combination of unfolded partial least-squares (PLS) with RTL. This latter method has been developed as an extension of unfolded-PLS coupled to RBL. An experimental system based on the kinetic measurement of the evolution of the excitation-emission fluorescence matrices with time for mixtures of two anticancer drugs is also studied. The kinetic reaction is based on the oxidation of leucovorin and metotrexate with potassium permanganate to give highly fluorescent compounds. Both chemometric methodologies exploit the second-order advantage of the employed multi-way data, allowing analyte concentrations to be estimated even in the presence of uncalibrated components in the samples. The new methods herein described constitute new competitors of PARAFAC for this type of analyses, in which four-way instrumental data are used.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Trilinear least-squares; Unfolded-PLS; Residual trilinearization; Four-way data; Multi-way analysis

1. Introduction

Multi-way data analysis is a powerful tool for the development of methods of analytical determination in the presence of complex sample components [1]. The advantage of using data involving high-dimensional structured information is a higher stability towards interferents and matrix effects, in comparison with first-order methodologies. In some situations, multi-way analysis allows for a direct separation of the overall measured instrumental signal into the underlying contributions from individual analytes and

background constituents. Furthermore, instruments which easily generate multidimensional data arrays for each sample are presently available to chemists. Examples of second-order instruments are a high-performance liquid chromatograph coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) [2] or to a fast-scanning fluorescence detector [3] and a spectrofluorimeter capable of recording excitation-emission matrices (EEMs) [4]. They provide second-order arrays per sample, leading to three-way arrays when data for a group of samples are joined.

Interestingly, most of the published analytical applications of three-way data are related to the use of EEMs as the analytical signal. The reason is the easiness in obtaining two-way fluorescence data from the sample of interest, and to three-way data when taken over several samples jointly,

* Corresponding author. Tel.: +54 341 4372704; fax: +54 341 4372704.

E-mail address: aolivier@fbioyf.unr.edu.ar (A.C. Olivieri).

by exciting the sample at several different wavelengths and measuring the emitted light at several emission wavelengths. With modern fluorescence instrumentation, this can be done in a relatively short time and in an automatic manner.

In the context of fluorescence EEM measurements, several chemometric methods have been described for three-way analysis, in order to resolve mixture components, or to determine single components of interest in complex samples, even in the presence of uncalibrated interferents. For a comprehensive set of updated references accounting for the variety of analytes and samples which are being explored by this rapidly expanding analytical field see Ref. [5] and the references cited in Ref. [6]. A list of different multi-way methods used to resolve multicomponent mixture problems includes the generalized rank annihilation method (GRAM) [7], direct trilinear decomposition (DTLD) [8], parallel factor analysis (PARAFAC) [9], self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD) [10], multi-variate curve resolution coupled to alternating least-squares (MCR-ALS) [11], N-way partial least-squares (N-PLS) [12], PLS combined with residual bilinearization (RBL) [13], and the recently introduced variants of bilinear least-squares (BLLS) [14,15] coupled to RBL. Among the latter variants, the most useful involves singular value decomposition (SVD) profile estimation and least-squares prediction, giving rise to the combination SVD-LS/RBL. Especially useful is PARAFAC, particularly when the data follow the so-called trilinear model, as it is the case for EEM data [12]. This is due to the fact that three-way data are not merely a collection of two-way data sets, but that there is actually an internal relationship between each of the matrices. As a consequence, the decomposition of a three-way data array built with response matrices measured for a number of samples if often unique, allowing emission and excitation spectral profiles, as well as relative concentrations of individual sample components to be extracted directly. If the model is correctly specified with the right number of components, and the trilinear structure is approximately valid, then the PARAFAC solution will provide estimates of the underlying parameters. This property has been named the *second-order advantage* [16], and is fully exploited by PARAFAC, constituting the base of many of the analytical applications of PARAFAC calibration models. It should be noticed that the combination SVD-LS/RBL has been shown to be useful in this regard, being also able to handle the occurrence of uncalibrated interferences [17].

Four-way data provide the opportunity of introducing an additional dimension to three-way data sets, allowing for a theoretical increase in the predictive ability. Few experimental realizations of this interesting calibration scenario are known, most of them involving the analysis of the time-evolution of EEMs in cases in which a chemical reaction occurs, and the products of reaction are fluorescent species [6,18,19]. A problem for obtaining the kinetic evolution of EEMs is the time needed to record the complete EEM of a

sample. In a recently reported case [18], the degradation reactions of chlorophyll a and b were followed by recording the EEMs with a conventional fluorimeter, by interrupting the reaction at 16 different times from 0 to 570 min. In this latter case, no problem arose from the time needed to obtain the EEM, as the reaction was very slow. In a second case [19], a fluorimeter equipped with a CCD camera as detector was used to quantify adrenaline and noradrenaline. The EEMs could be recorded within a second with this laboratory constructed instrument [20–22], although an integration time of 15 s was chosen for obtaining each EEM. A total time period of 900 s (15 min) was needed to obtain 60 EEMs from each sample. In the most recent example of four-way EEM data [6], a commercial fast-scanning spectrofluorimeter was used for the acquisition of the EEM data. Each EEM was obtained in 12 s at a wavelength scanning speed of 24,000 nm/min and 10 EEM data matrices were obtained from time 0 to 10.8 min, at 72 s intervals. However, it is expected that the near future will witness an increase in this kind of analyses, as commercial fast-scanning spectrofluorimeters become widely spread.

When using higher-order data, the notion of trilinearity can be extended to quadrilinearity, etc. The basic idea remains the same: fixing the parameters in all sets but one, the model is linear in the remaining set of parameters. This holds for all parameter sets. Four-way data should in principle exhibit the same advantage as their three-way partners concerning the second-order advantage, while providing additional selectivity, and leading to improvements on the predictive model.

We describe in detail a new chemometric tool for the purpose of dealing with four-way instrumental data, based on an extension of SVD-LS coupled to RBL one further dimension, and named trilinear least-squares (TLLS) with residual trilinearization (RTL), capable of handling the problem of uncalibrated components. We also describe the combination of unfolded-PLS with RTL, as an extension of unfolded-PLS coupled to RBL on further dimension. We compare its performance with that of PARAFAC, and also with the combination of unfolded-PLS/RTL as regards a simulated example using numerical Monte Carlo calculations, and also for an experimental example involving the determination of anticancer drugs, under circumstances where the second-order advantage is mandatory. In this way, the problem of uncalibrated or unsuspected interferences is addressed using new chemometric tools.

2. Theory

2.1. PARAFAC

A brief account of PARAFAC achieving the second-order advantage is provided. Third-order data are measured for a given sample as a $J \times K \times L$ array, where J , K and L denote the number of emission wavelengths, excitation

wavelengths and time points in each of the three dimensions. For obtaining the second-order advantage, the I training arrays $\mathbf{X}_{i,\text{cal}}$ are joined with the unknown sample array \mathbf{X}_u into a four-way data array \mathbf{X} , whose dimensions are $[(I+1) \times J \times K \times L]$. Provided \mathbf{X} follows a quadrilinear PARAFAC model, it can be written in terms of four vectors for each responsive component, designated as \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n and \mathbf{d}_n , and collecting the relative concentrations $[(I+1) \times 1]$ for component n , and the profiles in the three modes ($J \times 1$), ($K \times 1$) and ($L \times 1$), respectively. The specific expression is thus [23]:

$$X_{ijkl} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} d_{ln} + E_{ijkl} \quad (1)$$

where N is the total number of responsive components, a_{in} is the relative concentration of component n in the i th sample, and b_{jn} , c_{kn} and d_{ln} are the normalized intensities at the emission wavelength j , excitation wavelength k and time l , respectively. The values of E_{ijkl} are the elements of the array \mathbf{E} , which is a residual error term of the same dimensions as \mathbf{X} . The column vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n and \mathbf{d}_n are collected into the corresponding loading matrices \mathbf{A} , \mathbf{B} , \mathbf{C} and \mathbf{D} (\mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n and \mathbf{d}_n are usually normalized to unit length).

The model described by Eq. (1) defines a decomposition of \mathbf{X} which provides access to emission (\mathbf{B}) and excitation spectral profiles (\mathbf{C}), time profiles (\mathbf{D}) and relative concentrations (\mathbf{A}) of individual components in the $(I+1)$ mixtures, whether they are chemically known or not. This constitutes the basis of the second-order advantage. The decomposition is usually accomplished through an alternating least-squares (ALS) minimization scheme [9,24].

Issues relevant to the application of the PARAFAC model for multi-way calibration of four-way data are: (1) establishing the number of responsive components, (2) identifying specific components from the information provided by the model and (3) calibrating the model in order to obtain absolute concentrations for a particular component in an unknown sample.

The number of responsive components (N) can be estimated by several methods. A useful technique is CORCONDIA, a diagnostic tool considering the PARAFAC internal parameter known as core consistency [25,26]. Identification of the chemical constituent under investigation is done with the aid of the three estimated mode profiles, emission spectrum, excitation spectrum and kinetic profile, and comparing them with those for a standard solution of the analyte of interest. This is required since the components obtained by decomposition of \mathbf{X} are sorted according to their contribution to the overall spectral variance, and this order is not necessarily maintained when the unknown sample is changed.

Absolute analyte concentrations are obtained after calibration, because the four-way array decomposition only provides relative values (\mathbf{A}). Calibration is done by means

of the set of standards with known analyte concentrations (contained in an $I \times 1$ vector \mathbf{y}), and regression of the first I elements of column \mathbf{a}_n against \mathbf{y} :

$$k = \mathbf{y}^+ \times [a_{1n}] \cdots [a_{In}] \quad (2)$$

where '+' implies taking the pseudo-inverse. Conversion of relative to absolute concentration of n in the unknown proceeds by division of the last element of column \mathbf{a}_n [$a_{(I+1)n}$] by the slope of the calibration graph k :

$$y_u = a_{(I+1)n}/k. \quad (3)$$

2.2. TLLS

Since the third-order calibration method TLLS is derived from its second-order counterpart SVD-LS, one of the variants of BLLS, it seems appropriate to briefly review the latter formulation, which is discussed in detail in the relevant references [14,15]. In contrast to three-way PARAFAC, concentration information is introduced into the calibration step (without including data for the unknown sample), in order to obtain approximations to pure-analyte matrices \mathbf{S}_n at unit concentration. They are calculated by following these steps: (1) obtainment of concentration-weighted matrices \mathbf{T}_n of size $J \times K$ (the size of the calibration data matrices), (2) calculation of the concentration product matrix \mathbf{D} of size $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$, and (3) estimation of \mathbf{S}_n from \mathbf{D} and the N_{cal} \mathbf{T}_n matrices:

$$\mathbf{T}_n = \sum_{i=1}^I Y_{in} \mathbf{X}_{i,\text{cal}} \quad (4)$$

$$\mathbf{D} = \mathbf{Y}^T \mathbf{Y} \quad (5)$$

$$\mathbf{S}_n = \sum_{n'=1}^N (\mathbf{D}^{-1})_{nn'} \mathbf{T}_{n'} \quad (6)$$

where \mathbf{Y} is an $I \times N_{\text{cal}}$ matrix collecting the nominal calibration concentrations and N_{cal} is the number of calibrated analytes.

The above $J \times K$ matrices \mathbf{S}_n (one for each of the N_{cal} analytes) allow one to estimate the calibrated analyte spectral profiles, employing the singular value decomposition (SVD) profile estimator which involves the single-component SVD of each of the \mathbf{S}_n (SVD₁) [14,15]:

$$(g_n, \mathbf{b}_n, \mathbf{c}_n) = \text{SVD}_1(\mathbf{S}_n) \quad (7)$$

where g_n is the first singular value, and \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n are the $J \times 1$ and $K \times 1$ left and right eigenvectors of \mathbf{S}_n , respectively, which constitute the profiles in both dimensions of the matrix data. The profiles for all analytes are joined into the calibration \mathbf{B}_{cal} and \mathbf{C}_{cal} loading matrices, similar to those described above for PARAFAC, except that they do not include possible unexpected components which may appear in the unknown sample. It should be noticed that the identification of calibrated components is not required in

SVD-LS, since this is automatically performed by the algorithm.

If the calibration model is exact, \mathbf{B}_{cal} and \mathbf{C}_{cal} can be employed to estimate the analyte concentrations in the unknown. A reliable least-squares predictor leads to the prediction equation [14,15]:

$$\mathbf{y}_u = \left[(\mathbf{G}\mathbf{B}_{\text{cal}})^T (\mathbf{G}\mathbf{B}_{\text{cal}})^* (\mathbf{C}_{\text{cal}}^T \mathbf{C}_{\text{cal}}) \right]^{-1} \text{Diag} \left[(\mathbf{G}\mathbf{B}_{\text{cal}})^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}} \right] \quad (8)$$

where \mathbf{y}_u is an $N_{\text{cal}} \times 1$ vector containing the predicted concentrations of the calibrated N_{cal} analytes, ‘*’ indicates the element-wise product operation, \mathbf{X}_u is the unknown data matrix, \mathbf{G} is an $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ diagonal matrix whose diagonal elements are the g_n values of decomposition (7), and ‘Diag’ converts the main diagonal of the $N_{\text{cal}} \times N_{\text{cal}}$ matrix ($\mathbf{B}_{\text{cal}}^T \mathbf{X}_u \mathbf{C}_{\text{cal}}$) into an $N_{\text{cal}} \times 1$ vector.

As recently shown [27], Eq. (8) is the result of a constrained least-squares minimization, equivalent to first computing the $JK \times N_{\text{cal}}$ \mathbf{S}_{cal} matrix from vectorized analyte profiles [notice that the notation $JK \times N_{\text{cal}}$ for the size of matrix \mathbf{S}_{cal} implies that its size is (J times K) by N_{cal}]:

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1(\mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) | g_2(\mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) | \dots | g_{N_{\text{cal}}}(\mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (9)$$

where \otimes implies the well-known Kronecker product. The analyte concentrations in the unknown sample are then simply predicted as:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (10)$$

Interestingly, the calibration step represented by Eqs. (4)–(6) is also equivalent to an unfolded classical least-squares (CLS) approximation carried out by working with vectorized data matrices. In fact, Eqs. (4)–(6) can be compactly written in the following equivalent way. First the calibration data are vectorized and grouped into a matrix \mathbf{V}_X :

$$\mathbf{V}_X = [\text{vec}(\mathbf{X}_{1,\text{cal}}) | \text{vec}(\mathbf{X}_{2,\text{cal}}) | \dots | \text{vec}(\mathbf{X}_{I,\text{cal}})] \quad (11)$$

and then a direct least-squares procedure is employed to obtain \mathbf{S}_n , analogous to classical least-squares:

$$\mathbf{V}_S = \mathbf{V}_X \mathbf{Y}^{T+} \quad (12)$$

where \mathbf{V}_S (size $JK \times N_{\text{cal}}$) contains the vectorized \mathbf{S}_n matrices:

$$\mathbf{V}_S = [\text{vec}(\mathbf{S}_1) | \text{vec}(\mathbf{S}_2) | \dots | \text{vec}(\mathbf{S}_{N_{\text{cal}}})] \quad (13)$$

This completes the idea that SVD-LS is similar to a CLS model, except that the analyte profiles needed for Eq. (9) are obtained after reshaping $\text{vec}(\mathbf{S}_n)$ [Eq. (13)] followed by SVD analysis.

It is thus understandable that extension of SVD-LS to one further dimension involves a calibration scheme similar to Eqs. (11)–(13), i.e., replacing $\text{vec}(\mathbf{X}_{i,\text{cal}})$ by $\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_{i,\text{cal}})$ in Eq. (11), and $\text{vec}(\mathbf{S}_n)$ in Eq. (13) by $\text{vec}(\underline{\mathbf{S}}_n)$. Then, the

analogy proceeds by replacing the SVD operator by a Tucker3 decomposition of each of the $\underline{\mathbf{S}}_n$ arrays:

$$(g_n, \mathbf{b}_n, \mathbf{c}_n, \mathbf{d}_n) = \text{Tucker3}(\underline{\mathbf{S}}_n) \quad (14)$$

providing the first core element g_n and the normalized profiles \mathbf{b}_n , \mathbf{c}_n and \mathbf{d}_n in the three modes for each calibrated analyte. Analogously to Eq. (9):

$$\mathbf{S}_{\text{cal}} = [g_1(\mathbf{d}_1 \otimes \mathbf{c}_1 \otimes \mathbf{b}_1) | g_2(\mathbf{d}_2 \otimes \mathbf{c}_2 \otimes \mathbf{b}_2) | \dots | g_{N_{\text{cal}}}(\mathbf{d}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{c}_{N_{\text{cal}}} \otimes \mathbf{b}_{N_{\text{cal}}})] \quad (15)$$

leading to the TLLS prediction equation:

$$\mathbf{y}_u = \mathbf{S}_{\text{cal}}^+ \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) \quad (16)$$

2.3. Second-order advantage with TLLS

When uncalibrated constituents occur in \mathbf{X}_u , then Eq. (16) is not suitable for analyte prediction. In this case, the residuals of the TLLS prediction procedure s_p , will be abnormally large in comparison with the typical instrumental noise (the latter is easily assessed by blank replication measurements):

$$\begin{aligned} s_p &= \|\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_p)\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} \\ &= \|\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) - \mathbf{S}_{\text{cal}} \mathbf{y}_u\| / (JKL - N_{\text{cal}})^{1/2} \end{aligned} \quad (17)$$

where $\|\cdot\|$ indicates the Euclidean norm. The degrees of freedom in Eq. (17) correspond to the number of variables (JKL) minus the number of adjustable parameters (the N_{cal} elements of the \mathbf{y}_u vector), which are the only parameters to be adjusted in the least-squares fit represented by Eq. (16).

If an interferent occurs in the unknown sample, the situation can be handled by a separate iterative procedure called residual trilinearization. The latter consists in estimating interferent profiles \mathbf{b}_{int} , \mathbf{c}_{int} and \mathbf{d}_{int} by a procedure which involves the minimization of the residual array $\underline{\mathbf{E}}_u$, computed while fitting the sample data to the sum of the various component contributions:

$$\underline{\mathbf{X}}_u = \sum_{n'=1}^{N_c} \underline{\mathbf{S}}_{n'} y_{n',u} + \underline{\mathbf{X}}_{\text{int}} + \underline{\mathbf{E}}_u \quad (18)$$

where $\underline{\mathbf{X}}_{\text{int}}$ is the three-way signal of the interferent reconstructed using a Tucker3 model.

During the minimization, the interferent profiles are estimated by Tucker3 analysis of the residual array $\underline{\mathbf{E}}_p$ shown in Eq. (17), using the first principal component:

$$(g_{\text{int}}, \mathbf{b}_{\text{int}}, \mathbf{c}_{\text{int}}, \mathbf{d}_{\text{int}}) = \text{Tucker3}(\underline{\mathbf{E}}_p) \quad (19)$$

The analyte concentrations are still provided by an expression similar to Eq. (16), except that \mathbf{S}_{cal} is replaced by \mathbf{S}_{exp} , an expanded version of \mathbf{S}_{cal} :

$$\mathbf{S}_{\text{exp}} = [\mathbf{S}_{\text{cal}} | g_{\text{int}}(\mathbf{d}_{\text{int}} \otimes \mathbf{c}_{\text{int}} \otimes \mathbf{b}_{\text{int}})] \quad (20)$$

The number of interferents N_i can be assessed by comparing the final residuals s_u with the instrumental noise level, where:

$$s_u = \|\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_u)\| / [JKL - (N_{\text{cal}} + N_i)]^{1/2} \quad (21)$$

where $\underline{\mathbf{E}}_u$ is from Eq. (18). Typically, a plot of s_u computed for trial number of components will show decreasing values, starting at s_p when $N_i=0$, until it stabilizes at a value compatible with the experimental noise, allowing to locate the correct number of components. Each time a new trial component is added to the model, the Tucker3 analysis shown in Eq. (19) is carried out using N_i principal components.

2.4. Unfolded-PLS/RTL

In this section a brief account of a complementary technique is provided, involving the combination of unfolded-PLS and RTL. This has been developed in analogy with the already described RBL methodology which adds the second-order advantage to PLS [13], extending it one further dimension. The calibration step in this methodology is the well-known unfolded-PLS model, in which matrices of loading vectors \mathbf{P} and weight loading vectors \mathbf{W} (both of size $JKL \times A$) are obtained from the calibration signals and concentrations, where A is the number of latent factors needed to model the calibration data. Calibration does also provide a vector \mathbf{v} (size $A \times 1$) of regression coefficients, which converts the test sample score \mathbf{t}_u into concentration for the calibrated analyte:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (22)$$

where:

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) \quad (23)$$

When the second-order advantage is required, then a RTL procedure can be applied, which is formally analogous to that discussed above in connection with TLLS, with the following changes: the residual array $\underline{\mathbf{E}}_p$ required in Eq. (19) is obtained after reshaping to a $J \times K \times L$ three-way array the vector of prediction residuals:

$$\text{vec}(\underline{\mathbf{E}}_p) = \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) - \mathbf{P}(\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u)$$

During this procedure, \mathbf{P} is kept constant at the calibration values, and \mathbf{t}_u is varied until the final residuals $\|\mathbf{e}_u\|$ is minimized, where:

$$\text{vec}(\underline{\mathbf{X}}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + g_{\text{int}}(\mathbf{d}_{\text{int}} \otimes \mathbf{c}_{\text{int}} \otimes \mathbf{b}_{\text{int}}) + \mathbf{e}_u \quad (24)$$

Once the RTL converges, the new score vector \mathbf{t}_u allows one to predict the analyte concentration by means of Eq. (22), with \mathbf{v} stemming from calibration.

3. Experimental

3.1. Apparatus

Fluorescence spectral measurements were performed on a fast-scanning Varian Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer, equipped with two Czerny–Turner monochromators and a xenon flash lamp, and connected to a PC microcomputer via an IEEE 488 (GPIB) serial interface. Excitation-emission matrices were recorded in a 10 mm quartz cell at 30 °C, by the use of a thermostatic cell holder and a Selecta thermostatic bath, scanning at 24,000 nm/min without peak shifts due to the design of the monochromator drive mechanism. The grating is moved only when the lamp is off, resulting in a go-to-flash method of taking a measurement. The wavelength does not change while measurements are being made. According to the manufacturer specifications of the instrument, the wavelength accuracy is ± 1.5 nm and the wavelength reproducibility is ± 0.2 nm.

3.2. Reagents

All experiments were performed with analytical reagent grade chemicals. Leucovorin (LV) (as the calcium salt pentahydrate) was prepared by dissolving 0.0100 g of reagent (Acros Organics) in 100 ml of ultrapure water obtained using a Water Pro PS equipment (Labconco, Kansas City, MO, USA). Metotrexate (MTX) was prepared by dissolving 0.0100 g of the compound (Sigma, St. Louis, MO, USA) in 100 ml of alkalized ultrapure-grade water. Appropriate MTX and LV solutions of different concentrations were prepared by dilution in ultrapure-grade water. A 0.1000 M KMnO_4 stock solution (standardized by titration with sodium oxalate) was prepared in doubly distilled water. A 0.065 M borax buffer of pH=9.4 was also used.

3.3. Calibration and validation sets

Two separate calibration sets were constructed, composed of five samples each. One was used for the determination of MTX, and the other one for the determination of LV. The methods were validated with a validation set of unknown samples containing different concentrations of each one of these compounds, in the presence of the other one, which acts as an interferent. This means that we have not employed the usual procedure of preparing a calibration matrix in which samples containing mixtures of the two analytes of interest in different proportions are included. On the contrary, it is intended to focus the problem by considering, first, that the analyte of interest is metotrexate. Hence, the presence of leucovorin in the samples of the validation set is simply considered as an interferent when metotrexate is determined. In a similar way, using the second calibration set, only leucovorin is determined in the

validation set of samples, and in this case metotrexate is considered as an interferent.

In the first calibration set, the standards contained five equally spaced concentration levels in the range 0.00 to 1.00 mg l⁻¹ (MTX). In the second calibration set, five equally spaced concentration levels in the range 0.00 to 0.50 mg l⁻¹ (LV) were prepared. For preparing the samples, an aliquot of 3 ml of a solution containing MTX and/or LV (adequate volumes of diluted solutions) and borax buffer of pH=9.4 (2 ml) was placed in the quartz cell, 50 µl of KMnO₄ 0.028 M were added and the mixture was mixed. The kinetic evolution of excitation-emission fluorescence matrices of these solutions was then recorded, and the obtained data were subjected to four-way analysis, as described below. Suitable wavelength ranges for the determination were: emission from 335 to 490 nm at 5 nm intervals ($J=32$ wavelengths) and excitation from 255 to 315 nm at 6 nm intervals ($K=11$ wavelengths), making a total of 352 spectral points per sample matrix. The rapid scanning instrument allows the acquisition of a complete EEM in a time as short as 12 s at a wavelength scanning speed of 24,000 nm/min, at the selected wavelength ranges. In the time dimension, the EEMs were obtained at intervals of 72 s, for a reaction time ranging from 0 to 10.8 min. Since 10 time points were collected in the latter mode, at reaction times of 0, 1.2, 2.4, 3.6, 4.8, 6.0, 7.2, 8.4, 9.6 and 10.8 min, each three-way array consisted of a total of 3520 data points.

The validation set was composed of five samples, prepared in the same form to those for calibration, but using a random design, i.e., selecting the target concentrations of both analytes at random from the calibration range for each analyte (see below for details on the composition of these samples).

In conclusion, the experimental calibration and validation sets are designed to probe the second-order advantage of the three assayed calibration methods, PARAFAC, TLLS and unfolded-PLS combined with RTL: when calibrating for MTX, for example, LV acts as an interferent, and vice versa. This allowed us to check the chemometric algorithms in their abilities for the recovery of emission and excitation spectral as well as time profiles, and for quantitation of the analyte of interest in the presence of an uncalibrated interferent.

3.4. Numerical simulations

A comprehensive comparison of the four-way PARAFAC model, and the TLLS and unfolded-PLS combined with RTL models, were carried out using Monte Carlo numerical simulations. Four-way data arrays were produced for a set of unknown samples containing two different components. The models were calibrated with two different sets of training samples: (1) both chemical components are calibrated, so that the second-order advantage is not strictly required, and (2) only one of the components is calibrated, and hence adherence to the second-order advantage is

required for successful prediction in unknowns, because the latter one contains the other component as interferent.

Data for the training samples were produced starting from noiseless pure component profiles in three dimensions, imitating the generation of time dependent excitation-emission fluorescence matrices. The employed profiles in the three dimensions (normalized to unit length) are shown in Fig. 1. The training three-way arrays were created from these profiles, by adding Gaussian distributed random noise.

Specifically, the following equation gives the elements of the training four-way array when a single component is calibrated:

$$X_{ijkl,cal} = k_1 (y_{i1} + r_{ijkl} s_{y1}) b_{j1} c_{k1} d_{l1} + r'_{ijk} s_X \quad (25)$$

where y_{i1} is the nominal calibration concentration for component 1, k_1 is the proportionality constant converting concentration to scores (in TLLS it is identical to g_1 , see above), s_X and s_y are the standard deviations in instrumental

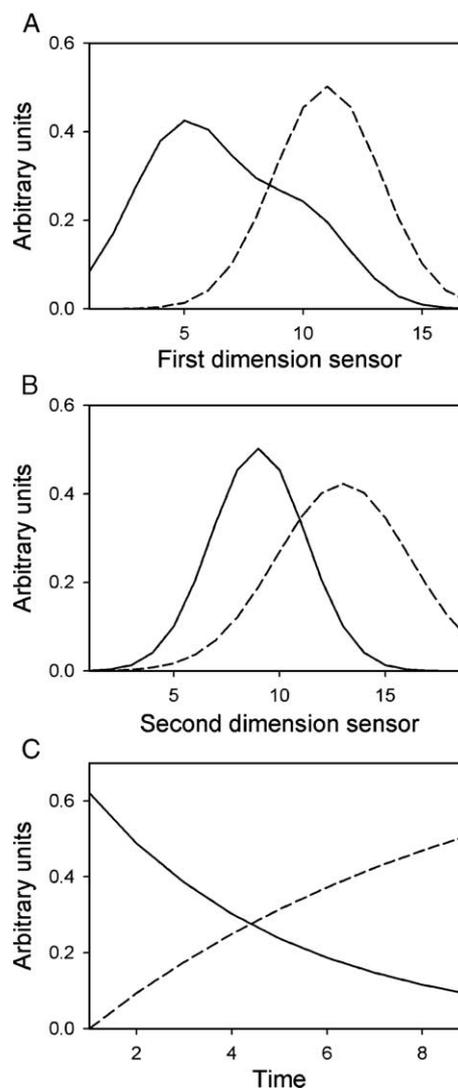


Fig. 1. Theoretical profiles in the three dimensions (A, first, B, second and C, third dimension) for the numerical simulation studies. Solid line, component 1, dashed line, component 2.

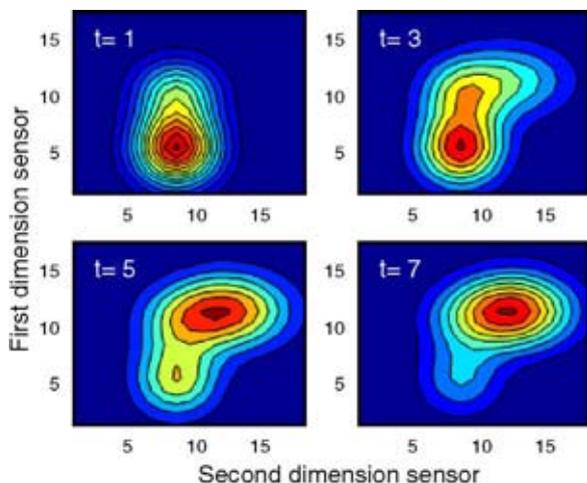


Fig. 2. Graphical representation of the three-way array for a simulated sample having unit concentrations of both components. Four contour maps are shown, at four different times selected from the range 1–9 (indicated in the top left corner of each plot). The figure shows how the peak due to analyte 2 grows in intensity, while that corresponding to analyte 1 decreases.

signal and concentration, and the different r_{ijkl} are random numbers taken from standardized Gaussian distributions having unit standard deviation and zero mean. Three concentrations were considered: 0, 1 and 1.5 units.

When both components are calibrated, the following equation applies:

$$X_{ijkl,cal} = k_1(y_{i1} + r_{ijkl}S_{y1})b_{j1}c_{k1}d_{l1} + k_2(y_{i2} + r'_{ijkl}S_{y2})b_{j2}c_{k2}d_{l2} + r''_{ijkl}S_X \quad (26)$$

where y_{i1} and $y_{i,2}$ are the nominal calibration concentrations for each component, taken from a nine-sample 3×3 full-factorial design for two components at three levels: 0, 1 and 1.5 units. In Fig. 2, a representation of the three-way data array is shown, when a simulated mixture of both components at unit concentration level is computed.

Test samples were created in a similar manner to Eq. (26), except that random noise was only added to instrumental signals, and that nominal concentrations were selected at random for five different samples, within the range 0–1.5 units:

$$X_{jkl,u} = k_1y_{1u}b_{j1}c_{k1}d_{l1} + k_2y_{2u}b_{j2}c_{k2}d_{l2} + r_{jkl}S_X \quad (27)$$

The added noise in instrumental signals was 0.005 units (ca. 4% of the maximum calibration signal and between 50% and 80% of the mean calibration signal), and 0.05 units in all calibration concentrations different than zero (6% in the mean value). In this way, the relative concentration and signal uncertainties were of comparable size.

In a second set of simulations, noise was only added in the instrumental signals for the unknown sample. Although in a real case the signals from both calibration and test samples are affected by the same uncertainty sources, Monte Carlo results from noise addition to the test samples are

useful in separating the error contributions which propagate to the predicted concentration from the sample and from the model. Sample effects, in turn, are extremely useful for assessing the model sensitivity, which can then be employed for comparison.

The calibration/prediction procedure was repeated in each case 10,000 times, and the concentration standard errors, mean root-mean square errors (RMSE) for the test set and mean prediction bias were determined.

3.5. Software

All calculations were done using MATLAB 6.0 [28]. Appropriate routines for applying PARAFAC to N th-order data, developed by Bro, are available on the Internet [29]. Routines for TLLS and unfolded-PLS/RTL are available from the authors on request.

4. Results and discussion

4.1. Numerical simulations

Numerical simulations were performed including noise in both signals and calibration concentrations, in order to mimic a real situation, in which training and unknown samples are measured under similar circumstances, and reference concentrations carry a sizable error. Concentrations employed for calibration and test samples are shown in Table 1. Two different calibration scenarios were analyzed, namely whether both components are calibrated or only component 1 is calibrated, while component 2, which is not included in the training set, acts as an interferent. In both cases, PARAFAC requires two components. TLLS and unfolded-PLS, in turn, operate by calibrating for one or two components, depending on the calibration situation, and including RTL using an extra component when only component 1 is calibrated. The results concerning prediction errors, RMSE values and average bias are collected in Table 2. They are comparable for the three methods, pointing to a very similar predicting behavior of these chemometric models. This helps to confirm that the combinations TLLS or unfolded-PLS combined with RTL are serious competitors of PARAFAC when the second-order advantage is required, a situation of paramount importance in the field of multicomponent analysis in samples of complex composition.

Table 1
Concentration design of the test set employed for Monte Carlo simulations

Test sample	Component 1	Component 2
1	0.75	0.20
2	0.23	0.44
3	0.60	0.61
4	0.48	0.79
5	0.02	0.25

Table 2

Monte Carlo results concerning prediction uncertainties and root-mean square errors when noise is added in calibration concentrations, calibration signals and unknown signals

Unknown sample	Average Monte Carlo $s(y_u)$		
	PARAFAC	TLLS	Unfolded-PLS/RTL
<i>Both components are calibrated</i>			
1	0.0133	0.0139	0.0131
2	0.0066	0.0069	0.0069
3	0.0110	0.0132	0.0111
4	0.0089	0.0103	0.0123
5	0.0048	0.0045	0.0054
Average RMSE	0.008	0.009	0.010
Average Bias	0.007	0.007	0.008
<i>Only component 1 is calibrated</i>			
1	0.0222	0.0226	0.0215
2	0.0090	0.0083	0.0084
3	0.0192	0.0162	0.0145
4	0.0143	0.0156	0.0122
5	0.0051	0.0061	0.0061
Average RMSE	0.014	0.014	0.015
Average Bias	0.010	0.011	0.010

The average RMSE and Bias were computed for an instrumental noise level of 0.005 units and a concentration noise level of 0.05 units, and averaged over the test sample set.

Another simulation study has been undertaken in which noise was added only in the test sample signals. This second simulation proves that the standard error in predicted concentration of each method was proportional to the standard deviation s_X of formula (25), and that the

proportionality constant was similar in all three methods. This indicates that the variance inflation properties and precision of all the presently studied methodologies is similar.

4.2. Experimental system

The experimental four-way data have been obtained for the kinetic monitoring of the reactions of metotrexate and leucovorin with potassium permanganate, giving rise to highly fluorescent products. This system has been previously studied by our group, giving rise to individual kinetic–fluorimetric methods of determination of metotrexate [30], leucovorin [31] and for the simultaneous determination of both compounds in mixtures [6]. The reaction is completed in about 10 min, and can be monitored by scanning successive EEMs as a function of time, as is described under the Experimental section. Fig. 3 shows a typical series of EEMs for a mixture of metotrexate and leucovorin standards, taken at different reaction times ranging from 0 to 10.8 min.

When the set of five samples of both drugs was investigated with the aid of PARAFAC, core consistency analysis required the consideration of two fluorophores, as expected from the sample composition. Increasing the number of active components did not improve the model fit, leading to poorly defined profiles for the additional constituents.

The recovered emission and excitation profiles (Fig. 4A, B, D and E) are in good agreement with the expectations

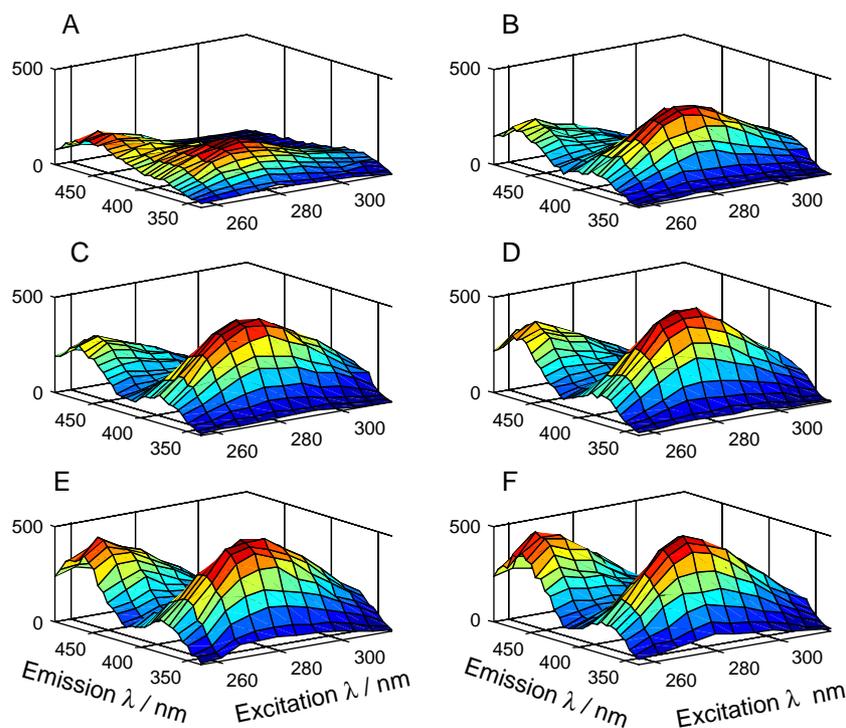


Fig. 3. Three-dimensional representation of EEM data for an aqueous solution (pH=9.4) containing metotrexate 0.60 mg l^{-1} and leucovorin 0.25 mg l^{-1} as a function of the time of permanganate oxidation. The times selected for illustrating the kinetic evolution of the EEMs are (in min): (A) 0, (B) 2.4, (C) 4.8, (D) 7.2, (E) 9.6 and (F) 10.8.

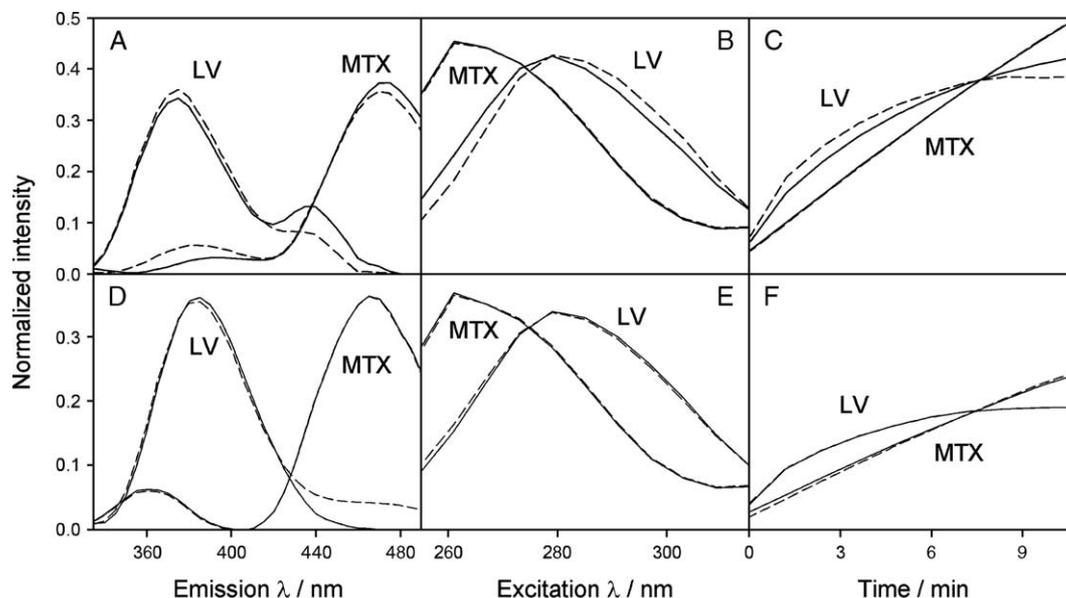


Fig. 4. (A), (B) and (C) fluorescence emission, excitation and time profiles for both components, respectively (as indicated), normalized to unit length, as found by PARAFAC (—) and by TLLS (---). The profiles were obtained after processing the first test sample using a calibration set only containing MTX. (D), (E) and (F) profiles for both components when the calibration set only containing LV is employed.

based on pure-analyte standards of both compounds. Furthermore, the kinetic analyte profiles (Fig. 4C and F) are in agreement with those previously reported [30,31]. It is apparent from Fig. 4 that the profiles recovered by both algorithms are similar, and that there is coincidence between profiles extracted in either of both calibration modes employed. Prediction results in both alternative calibration scenarios (i.e., whether MTX or LV is the calibrated analyte) are reported in Table 3, and are seen to be reasonably good, taking into account that in clinically related studies prediction errors of ca. $\pm 10\%$ are acceptable.

In applying TLLS to the test set, the study of the prediction residuals led to the conclusion that more than one component was required to improve the fit in all samples. Thus, in order to apply the RTL procedure, replication of

blank samples was performed to obtain an average instrumental noise level. In all cases, the TLLS error fit stabilized at two constituents, in agreement with the PARAFAC results. Furthermore, the emission and excitation spectral and time profiles provided by RTL are similar to those furnished by PARAFAC. This result allows one to conclude that TLLS is successful in obtaining profiles for exploiting the second-order advantage. Prediction results are collected in Table 3 for comparison, leading to the conclusion that the TLLS methodology shows a prediction ability comparable to that of PARAFAC.

In the case of the combination of unfolded-PLS with RTL, a single latent variable was employed to model the calibration data, while RTL helped to find the extra component. The recovered interferent profiles were also comparable to those furnished by TLLS. This methodology does also achieve the second-order advantage in this experimental data set, providing the analytical results which are reported in Table 3. They are similar to those given by TLLS.

Table 3
Prediction results using PARAFAC and TLLS on a set of five experimental samples containing mixtures of MTX and LV

	Sample					RMSE
	1	2	3	4	5	
<i>MTX</i>						
Nominal MTX	0.14	0.00	0.49	0.60	0.93	
PARAFAC ^a	0.18	0.06	0.61	0.68	0.96	0.08
TLLS ^a	0.19	0.06	0.62	0.70	0.95	0.09
Unfolded-PLS/RTL ^a	0.18	0.05	0.62	0.70	0.85	0.10
<i>LV</i>						
Nominal LV	0.14	0.17	0.31	0.25	0.10	
PARAFAC ^b	0.14	0.16	0.33	0.24	0.17	0.04
TLLS ^b	0.16	0.16	0.31	0.26	0.19	0.05
Unfolded-PLS/RTL ^b	0.14	0.19	0.33	0.31	0.18	0.05

All concentrations are expressed in mg l^{-1} .

^a Calibrating only for MTX and considering leucovorin as an interferent.

^b Calibrating only for LV and considering metotrexate as an interferent.

5. Conclusions

The use of higher-order data for the resolution of complex analytical problems will increase in the near future, due to the associated advantages. This calls for appropriate chemometric methods for calibrating with data structures of higher complexity. The present work presents a new algorithm, TLLS, based on an extension of SVD-LS one order further, which constitutes an alternative to four-way PARAFAC for the analysis and calibration of four-way instrumental data. An additional methodology, based on the combination of unfolded-PLS and RTL, developed as an

extension of unfolded-PLS combined with RBL, has been compared with the former two chemometric tools. The obtained results from numerical Monte Carlo simulations, as well as from real experimental data, allow one to conclude that the newly described methodologies show predictive abilities similar to PARAFAC. It has been also demonstrated that TLLS and unfolded-PLS, when coupled to RTL, are able to exploit the “second-order advantage” and to quantify the concentration of the analyte of interest in the presence of non-modeled interferents.

Acknowledgments

Financial support from CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), Universidad Nacional de Rosario and the Ministerio de Ciencia y Tecnología of Spain (Proyect BQU2002-00918) is acknowledged.

References

- [1] N.M. Faber, R. Bro, P.K. Hopke, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 65 (2003) 119–137.
- [2] K. Johnson, A. De Juan, S.C. Rutan, *J. Chemom.* 13 (1999) 331–341.
- [3] J.L. Guiteras, J. Guiteras, R. Ferrer, *Anal. Chem.* 70 (1998) 1949–1955.
- [4] C.M. Andersen, R. Bro, *J. Chemom.* 17 (2003) 200–215.
- [5] A. Smilde, R. Bro, P. Geladi, *Multi-way analysis, Applications in the Chemical Sciences*, Wiley, Chichester, 2004.
- [6] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa Mansilla, *Anal. Chem.* 76 (2004) 5657–5666.
- [7] E. Sánchez, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 58 (1986) 496–499.
- [8] E. Sánchez, B.R. Kowalski, *J. Chemom.* 2 (1988) 265–280.
- [9] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149–171.
- [10] Z.P. Chen, H.L. Wu, J.H. Jiang, Y. Li, R.Q. Yu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52 (2000) 75–86.
- [11] M. Esteban, C. Ariño, J.N. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49–61.
- [12] R. Bro, *J. Chemom.* 10 (1996) 47–61.
- [13] J. Öhman, P. Geladi, S. Wold, *J. Chemom.* 4 (1990) 79–90.
- [14] M. Linder, R. Sundberg, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42 (1998) 159–178.
- [15] M. Linder, R. Sundberg, *J. Chemom.* 16 (2002) 12–27.
- [16] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A–791A.
- [17] P.C. Damiani, A.J. Nepote, M. Bearzotti, A.C. Olivieri, *Anal. Chem.* 76 (2004) 2798–2806.
- [18] Y. Tan, J.H. Jiang, H.L. Wu, H. Cui, R.Q. Yu, *Anal. Chim. Acta* 412 (2000) 195–202.
- [19] R.P.H. Nikolajsen, K.S. Booksh, A.M. Hansen, R. Bro, *Anal. Chim. Acta* 475 (2003) 137–150.
- [20] A.R. Muroski, K.S. Booksh, M.L. Myrick, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3534.
- [21] R.D. Jiji, G.A. Cooper, K.S. Booksh, *Anal. Chim. Acta* 397 (1999) 61–72.
- [22] R.D. Jiji, G.G. Andersson, K.S. Booksh, *J. Chemom.* 14 (2000) 171–185.
- [23] S. Leurgans, R.T. Ross, *Stat. Sci.* 7 (1992) 289–319.
- [24] P. Paatero, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 223–242.
- [25] R. Bro, *Multi-way analysis in the food industry*, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- [26] R. Bro, H.A.L. Kiers, *J. Chemom.* 17 (2003) 274–286.
- [27] N.M. Faber, J. Ferré, R. Boqué, J.H. Kalivas, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 63 (2002) 107–116.
- [28] MATLAB 6.0, The MathWorks Inc., Natick, Massachusetts, USA, 2000.
- [29] <http://www.models.kvl.dk/source/>.
- [30] I. Durán Merás, A. Espinosa Mansilla, M.J. Rodríguez Gómez, F. Salinas, *Talanta* 55 (2001) 623–630.
- [31] A. Espinosa Mansilla, I. Durán-Merás, A. Zamoro Madera, L. Pedano, C. Ferreira, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 29 (2002) 851–858.

Short communication

Determination of sulphathiazole and sulphanilamide by photochemically induced fluorescence and first-derivative fluorescence

M.C. Mahedero García, N. Mora Diez*, D. Bohoyo Gil, F. Salinas López

Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

Received 20 May 2004; received in revised form 23 December 2004; accepted 24 December 2004

Available online 9 February 2005

Abstract

This manuscript reports the usefulness of the determination of sulphathiazole (ST) using photochemically induced fluorescence (RTPF) and RTPF coupling with first derivative (D¹-RTPF), and the determination of sulphanilamide (SAN) by means of first derivative of the emission spectrum. By irradiating 5 min, with intense UV radiation, sulphathiazole, in ethanol:water 20:80 (v/v) solutions at pH 4.5–5.0, show fluorescence emission at 342 nm ($\lambda_{\text{ex}} = 251$ nm). Under these conditions, a linear relation, fluorescence intensity–ST concentration, was found between 0.23 and 3.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ST. The method was applied for determining ST in a pharmaceutical drug. ST was also determined in honey by using the D¹-RTPF signal, applying the standard addition method, and measuring at 324.8 nm. Under the same experimental conditions of pH and solvent, a fluorimetric method for determining SAN in presence of ST is proposed. Calibration graphs for SAN determination were established using the amplitude of the first derivative of the emission spectrum measured at 324.4 nm, as the analytical signal. This method has been applied to determining SAN in a pharmaceutical formulation.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Photochemically induced fluorescence; First-derivative; Sulphathiazole; Sulphanilamide; Honey; Pharmaceuticals

1. Introduction

Sulfonamides constitute an important and one of the oldest groups of anti-microbial compounds. They are registered as antibacterials that are widely used in pharmaceutical preparations, especially in veterinary practice. As a consequence, residues of these drugs may remain in foods of animal origin [1–3]. Therefore, it is very important for the quality control of sulfonamide formulations and their trace determination in foods.

Sulphanilamide is one of the first anti-infective agents to be prepared by synthetic medicinal chemists, and has been in use for over four decades. Currently, this sulfa drug is used in the treatment of vulvovaginitis caused by *Candida albicans*.

Sulphathiazole is widely used in veterinary practice for the treatment of various bacterial infections, e.g., in diseases of honey bees.

For determining sulphanilamide, chromatographic methods have the leading position, by using mass spectrometric detection [4,5], being applied in biological fluids [6], pharmaceutical preparations [6–9] and foods [10,11]. Another techniques employed are spectrophotometry [6,12,13] with flow-injection analysis (FIA) [14] and fluorescence [15] with flow-injection analysis [16].

In the case of sulphathiazole, a few spectrophotometric [17–23] methods have been developed for its analysis. Also, flow-injection analysis methods have been proposed [24]. HPLC techniques with different detection types as photometry, mass spectrometry and fluorimetry have been proposed [6,25–28], and fluorimetric methods [29,30].

For weakly fluorescent and non-fluorescent analytes, derivatization to convert the analyte into a more detectable product (i.e., better fluorescing) constitutes a means of enhancing the analyte detectability. In addition to chemical reactions, an alternative approach is to use a photochemical reaction. In this case, intense UV–vis radiation converts non- or weakly fluorescent analytes of interest into highly fluorescent

* Corresponding author. Tel.: +34 924 2893 75; fax: +34 924 2893 75.
E-mail address: nielene@unex.es (N.M. Diez).

products. It is called photochemically induced fluorescence (RTPF) detection.

A few years ago, the photochemical decomposition of sulfonamides was reported and photochemically induced fluorescence was shown to be a precise, selective, and sensitive analytical method for determining sulfonamides [31].

In this work, new methods for determining ST using photochemically induced fluorescence and RTPF coupling with first derivative (D^1 -RTPF), and SAN by first derivative of the emission spectrum are proposed. They were applied in honey (ST) and pharmaceuticals (ST and SAN).

2. Experimental

All fluorescence spectral measurements were performed on a Perkin-Elmer model LS-50 B Spectrofluorimeter, interfaced with a Pentium PC microcomputer. The analysis, data manipulation, differentiation, and graphical representation of the fluorescence data was made by the software package FL WinLab V4.00 from Perkin-Elmer.

An Osram 200 W mercury lamp with an Oriel model 8500 power supply was used for the photolysis of ST.

For all experiments, analytical grade chemicals and solvents were used. Ultrapure water was obtained from a Millipore Milli-Q system.

Stock ethanolic solutions of $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ST and SAN (Sigma) were prepared, and standard solutions of ST and SAN were prepared by suitable dilutions.

Buffer solutions acetic acid/sodium acetate 0.5 M of pH 4.75 and 5.00 were prepared.

Pharmaceuticals: *Sabañotropico* (per 100 g: 0.005 g dexamethasone sodium phosphate, 5 g ST, 3.5 g menthol, 3 g tannic acid, 2.5 g basic galate of bismuth, 2 g phenol, 100 g vaseline c.s.p.); "POWDERS WILFE" (per 1 g: 0.697 g ST, 0.303 g SAN).

2.1. Procedure for determining ST in pharmaceutical formulations

A suitable amount of the formulation is accurately weighed, dissolved in ethanol until insoluble remains of vaseline (if the pharmaceutical formulation is in pomade form), filtered, washed with ethanol, and diluted to a known volume (100 mL). An aliquot of the obtained solution was placed in a 25-mL volumetric flask. Ethanol was added to obtain a final 20:80 (v/v) ethanol:water medium, 3 mL of 0.5 M acetic acid/sodium acetate buffer of pH 4.75 and MilliQ grade water to final volume were added.

Samples were irradiated for 5 min, the emission spectra were recorded by using an excitation wavelength of 251 nm, and the fluorescence signals at an emission wavelength of 342 nm were measured.

The calibration graph was obtained with ST solutions of concentration between 0.23 and $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, treated the same way than the problem sample.

2.2. Procedure for determining ST in honey samples

Ten grams of honey fortified with ST was dissolved in 100 mL of MilliQ grade water. In a 25-mL volumetric flask the volume necessary to have a final concentration of ST between 0.23 and $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ was introduced. Ethanol was added to obtain a final 20:80 (v/v) ethanol:water medium, 3 mL of 0.5 M acetic acid/sodium acetate buffer of pH 4.75 and MilliQ grade water to final volume were added.

Samples were irradiated for 5 min, the emission spectra were recorded by using an excitation wavelength of 251 nm. Their first-derivative spectra were obtained, smoothing with 10 experimental points and with a $\Delta\lambda$ of 24 nm; and ST was determined by measuring the amplitude of the first-derivative photochemically induced fluorescence signal at 324.8 nm, by the standard addition method.

2.3. Procedure for determining SAN in pharmaceutical formulations in presence of ST

The pharmaceutical formulation "POWDERS WILFE" is presented in dots, which are not water soluble. A suitable amount of formulation (around 0.1 g) is accurately weighed and dissolved in ethanol to a known volume (100 mL). A dilution of 1:100 in ethanol is made. An aliquot of the sample is placed in a 25-mL volumetric flask in order to have concentrations of SAN between 0.09 and $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$, if the concentration of ST is less than $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$; or between 0.09 and $0.60 \mu\text{g mL}^{-1}$, if ST is present between 1.00 and $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ethanol is added to obtain a final 20:80 (v/v) ethanol:water medium and 3 mL of 0.5 M acetic acid/sodium acetate buffer of pH 4.75 and deionised water to final volume are added.

Emission spectra of the samples were recorded, exciting at 262 nm. The first-derivative fluorescence spectra were obtained, smoothing with 11 experimental points and with a $\Delta\lambda$ of 25 nm, and SAN was determined by measurement of the amplitude of the first-derivative signal at 324.4 nm.

3. Results and discussion

3.1. Determination of ST by means of RTPF

The UV absorption spectra of ST in ethanol is characterized by two maxima at 260 and 290 nm, but its excited solution at these two wavelengths is not presenting fluorescence emission. Nevertheless, after irradiation, it is observed an induced fluorescence signal (Fig. 1).

The influence of irradiation time, by using different mixtures of ethanol:water, was studied. In all cases, the fluorescence intensity increases when increasing the irradiation time. For water percentages comprised between 50 and 100%, maxima fluorescence intensities were found for an irradiating time comprised between 4 and 5 min (Fig. 2). Less water percentages produce a smaller increase of the fluorescence

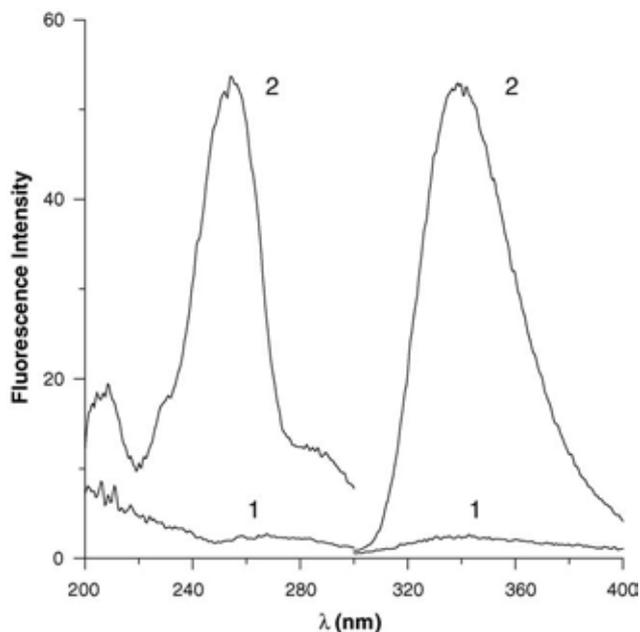


Fig. 1. Excitation and emission spectra of $5.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ST solution in ethanol:water 20:80 (v/v): (1) $t_{\text{irr}} = 0$ min; (2) $t_{\text{irr}} = 4.5$ min.

intensity. A 20:80 (v/v) ethanol:water medium and an irradiation time of 5 min were chosen as optima. Under these conditions, excitation and emission wavelengths of 251 and 342 nm, respectively, were found.

In Fig. 3, fluorescence intensity versus irradiation time, at several pH values, are shown. For strong acid and basic media, the increase of fluorescence intensity is small, but in a weakly acid medium (pH between 4.50 and 5.00), a maximum fluorescence intensity is obtained. Then, an apparent pH value of 4.75, obtained by addition of 0.5 M acetic acid/sodium acetate buffer solution, was selected. There is no influence of buffer concentration over fluorescence intensity.

The optimized selected conditions are: ethanol/water media (20:80, v/v), pH: 4.50–5.00, buffer HAc/NaAc 0.5 M, irradiation time: 5 min and $\lambda_{\text{ex}}/\lambda_{\text{em}} = 251/342$ nm.

The stability of the photoproduct was studied by measuring the fluorescence intensity of $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ of ST, after

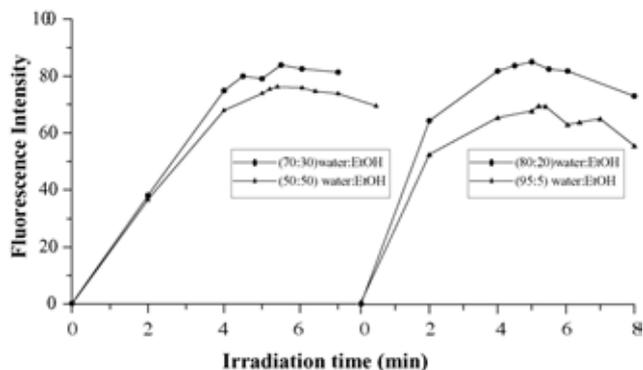


Fig. 2. Influence of irradiation time on the fluorescence intensity of $5.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ST in different mixtures of ethanol:water.

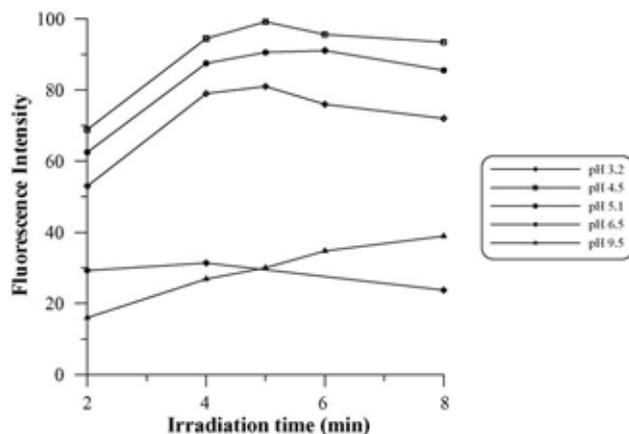


Fig. 3. Influence of irradiation time on the fluorescence intensity of ST in ethanol:water 20:80 (v/v) at several pH values; $\lambda_{\text{ex}} = 251$ nm.

irradiation of 5 min, with time. It was found that the photoproduct is stable at least 1 h. In the same way, it was found that the working solutions are stable at least 2 weeks.

Under these conditions, a linear relation fluorescence intensity–ST concentration was found. Using the fluorescence intensity after the irradiation process as the analytical signal, a calibration graph was obtained. The statistical calibration data and figures of merit of the method are: intercept \pm S.D., 1.6 ± 0.2 ; slope \pm S.D., 18.3 ± 0.1 ; analytical sensitivity (γ^{-1}), $0.03 \mu\text{g mL}^{-1}$; limits of detection: Clayton's method ($\alpha = \beta = 0.05$) [32] and Winefordner–Long's method [33] 0.08 and $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

3.1.1. Determination of ST in pharmaceutical formulations

The proposed method has been applied to the determination of ST in the pharmaceutical formulation Sabañotrópico. The procedure followed has been previously described, and the results obtained are good (Table 1) with recoveries near 100%. This pharmaceutical formulation was analysed by using an spectrophotometric reference method [20] and measuring the amplitude of the first derivative signal at 307 nm. A recovery of 95% and a relative standard deviation (R.S.D.) of 5%, were obtained.

3.2. Determination of ST by means of D^1 -RTPF

In order to determine ST in foods, which in general present an appreciable background signal, the following step was the optimization of the instrumental conditions to obtain the

Table 1
ST determination in pharmaceutical formulation

Formulation weight (g)	ST ^a present ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	% Recovery
0.1229	2.45	96
0.1095	2.19	95
0.1016	2.03	93

^a Concentrations calculated in accordance with the pharmaceutical amount indicated. Mean values ($n = 3$).

first derivative photochemically induced fluorescence emission spectra.

Taking into account the noise levels on the derivative spectra, a smoothing function, on the basis of the Savitzky–Golay method [34] was used. The zero-order spectra finally was smoothed by using 10 points.

In order to obtain the first-derivative photochemically induced fluorescence emission spectra, it was necessary to optimize the bandwidth ($\Delta\lambda$). The values assayed were between 14 and 24 nm, and a bandwidth of 24 nm was selected, because the derivative signal remains practically constant but the noise level decreases. This first derivative signal presents a maximum at 324.8 nm.

3.2.1. Determination of ST in honey

First of all, the matrix effect was studied, by preparing different samples of honey: by no addition of ST, by adding $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$; and two standard solutions of ST $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ and $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ in order to compare the results obtained. For that reason, all the samples were irradiated 5 min, their emission spectra were registered, and after that, their first derivative spectra were obtained. The honey presents a wide band in all the wavelength interval, and in the case of the $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ samples, there is no addition of the signals with an inversion of fluorescence (then, the standard of $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ presents higher fluorescence signal in comparison with this concentration of ST in honey). It means that, in presence of high concentration of ST, part of it remains in honey. This behaviour is explained by Schwaiger and Schuch [30] due to the reaction between ST and glucose of honey.

In consequence, it is not possible to determine of ST in all its concentration range, by the standard addition method. The derivative spectra of honey show almost no background signal. It was found the possibility of its determination up to $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$, then, it was obtained as a new calibration graph (by using D^1 -RTPF as the analytical signal); the statistical calibration data and figures of merit of the method are: linear calibration range, 0.23 – $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$; intercept \pm S.D., 0.2 ± 0.1 ; slope \pm S.D., 19.9 ± 0.4 ; analytical sensitivity (γ^{-1}), $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$; limits of detection: Clayton's method ($\alpha = \beta = 0.05$) and Winerfordner–Long's method 0.04 and $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

The proposed method was applied to different types of honey by using the standard addition method, and three inde-

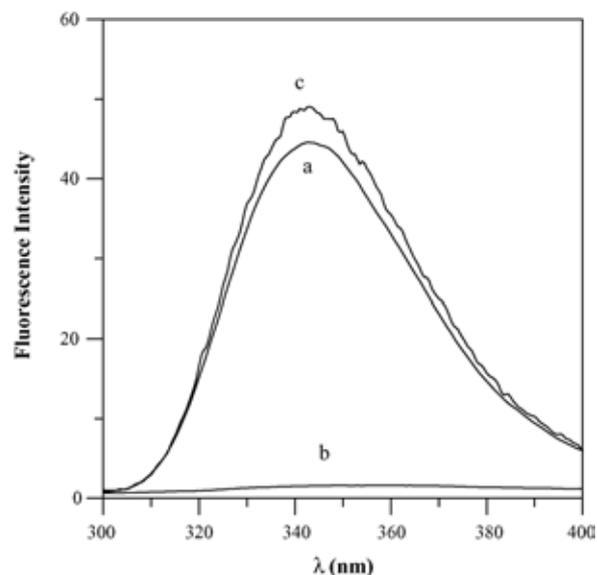


Fig. 4. Emission spectra: (a) $0.50 \mu\text{g mL}^{-1}$ SAN; (b) $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ ST; (c) mixture.

pendent determinations in each case. Good results, as summarized in Table 2, were obtained.

3.3. Determination of SAN by D^1 -fluorescence

Sulphanilamide shows a native fluorescence signal that decreases with the irradiation time, but sulphathiazole has not native fluorescence signal. Then, we try to propose a method for determining SAN in presence of ST.

The excitation and emission spectra of a SAN solution under the same experimental conditions, pH, and solvents, selected for ST is obtained. Maxima at 262 and 342 nm, respectively, were found.

A linear relationship between fluorescence intensity and SAN concentration up to $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ was found. By using synthetic samples of SAN, ST, and a mixture of both analytes, their fluorescence emission spectra were obtained. The fluorescence intensity measured at 342 nm shows a small signal of ST, but it is not possible to determine SAN in its presence (Fig. 4).

Then, the first derivative fluorescence spectra for the three samples were obtained, and it was observed that the ST signal

Table 2
Results obtained for ST determination by standard addition in honeys

ST ^{added} ($\mu\text{g/g}$)	D^1 -RTPF			
	% R ^a \pm R.S.D.	% R ^a \pm R.S.D.	% R ^b \pm R.S.D.	% R ^c \pm R.S.D.
10	112 \pm 7	111 \pm 4	112 \pm 9	111 \pm 7
30	103 \pm 4	103 \pm 6	91 \pm 4	90 \pm 4
50	91 \pm 4	90 \pm 4	91 \pm 7	89 \pm 3

^a Spanish honey.

^b Swiss honey.

^c Belgian honey.

Table 3
Results obtained for SAN determination in a pharmaceutical formulation

Formulation weight (g)	SAN present ($\mu\text{g mL}^{-1}$)*	% Recovery
0.1049	0.13	104
	0.32	97
	0.51	93
0.0949	0.12	96
	0.29	98
	0.46	94
0.1013	0.12	99
	0.31	95
	0.49	90

* Mean values ($n=3$).

is practically zero, and it is possible to determine SAN, by using the signal of the mixture.

The instrumental conditions were optimized to obtain the first derivative spectra, and it was found as optimum: smooth, 11 experimental points; $\Delta\lambda$, 25 nm; λ , 324.4 nm

A calibration graph for SAN determination was established, using the amplitude of the first-derivative fluorescence spectra measured at 324.4 nm without irradiation, as the analytical signal; the statistical calibration data and figures of merit of the method are: intercept \pm S.D., 0.8 ± 0.3 ; slope \pm S.D., 38.1 ± 0.6 ; analytical sensitivity (γ^{-1}), $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$; limits of detection: Clayton's method ($\alpha = \beta = 0.05$) and Winefordner–Long's method 0.03 and $0.02 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectively.

After that, the possibility of determining SAN when ST is present, in concentrations between 0.22 and $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, was studied. Four series of solutions containing a fixed concentration of ST with values of 1.00, 1.50, 2.00, and $3.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, and increasing concentrations of SAN between 0.09 and $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$ were prepared. After obtaining the first-derivative signals, the equations were compared with the equation obtained for SAN without presence of ST (their slopes). The results obtained show that the determination of SAN is possible between 0.09 and $0.80 \mu\text{g mL}^{-1}$, if the concentration of ST is in the range between 0.22 and $1.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ and, if ST is present between 1.00 and $2.00 \mu\text{g mL}^{-1}$, the determination of SAN is possible only in a shorter range of concentrations comprised between 0.09 and $0.60 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.1. Determination of SAN in pharmaceutical formulations in presence of ST

Before applying the proposed method for determining SAN in presence of ST, the possible matrix effect was studied. For that purpose, the standard addition method was applied and no matrix effect was found. Then, the proposed method was directly applied.

The pharmaceutical formulation analysed was "POWDERS WILFE" following the procedure described previously, and recoveries near 100% were obtained as it is shown in Table 3.

4. Conclusions

It has been proposed as a method for determining sulphathiazole in pharmaceutical formulations by using photochemically induced fluorescence; and for its determination in honey by RTPF coupling with first derivative. In this case, a very weakly fluorescent analyte has been converted into a highly fluorescent product.

Besides that, the determination of sulphanilamide in pharmaceutical formulations in presence of sulphathiazole is proposed by using the first derivative of the emission spectrum as the analytical signal.

The proposed methods are simple and inexpensive, and do not need any complex pre-treatment of samples containing these sulfonamides. In comparison with other procedures existing in literature, the proposed methods are rapid, because it is not necessarily a derivatization; and the selectivity is good, taking into account the utilization of fluorescence signal, and even more, in the cases where we employ the enhancing fluorescence signal due to the use of the photochemical reaction.

Acknowledgments

The authors acknowledge Junta de Extremadura-Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología and FEDER (Project 2PR 04A007) for the financial support of this work.

References

- [1] T. Galeano, A. Guiberteau, F. Salinas, *Anal. Lett.* 23 (1990) 607–616.
- [2] C.W. Sigel, J.L. Woole, C.A. Nichol, *J. Pharm. Sci.* 64 (1975) 973–976.
- [3] J. Unruh, E. Piotrowski, D.P. Schwartz, R. Barford, *J. Chromatogr.* 519 (1980) 179–187.
- [4] A. Kaufmann, S. Roth, B. Ryser, M. Widmer, D. Guggisberg, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 853–860.
- [5] D.N. Heller, M.A. Ngoh, D. Donoghue, L. Podhorniak, H. Righter, M.H. Thomas, *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 774 (2002) 39–52.
- [6] M.I. Evgen'ev, S.Y. Garmonov, L.S. Shakirova, F.S. Levinson, *J. Anal. Chem. (Transl. Zh. Anal. Khim.)* 55 (2000) 799–805.
- [7] R.M. Rao, Y.M. Rao, A.H. Shah, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 717–722.
- [8] L. Hall, V. Chadwick, *J. Chromatogr.* 478 (1989) 438–445.
- [9] J.W. Robinson, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68 (1985) 88–91.
- [10] G. Stoev, A. Michailova, *J. Chromatogr. A* 871 (2000) 37–42.
- [11] A.R. Long, C.R. Short, S.A. Barker, *J. Chromatogr.* 502 (1990) 87–94.
- [12] J.J. Berzas-Nevado, F. Salinas, I. De-Orbe-Paya, L.F. CapitanVallvey, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 9 (1991) 117–122.
- [13] S.S. Artemchenko, V.M. Sadvskii, V.V. Petrenko, *Farm. Zh. (Kiev)* 5 (1990) 74–75.
- [14] A. Ruiz-Medina, M.C. Cano-Garcia, A. Molina-Diaz, *Anal. Lett.* 35 (2002) 269–282.
- [15] M.C. Mahedero, F. Salinas, J.J. Aaron, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 12 (1994) 970–1101.
- [16] M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Anal. Chim. Acta* 269 (1992) 193–198.
- [17] S.G. Tiraspol'skaya, L.E. Nazarova, V.V. Skibina, *Farmatsiya (Moscow)* 33 (1984) 67–69.

- [18] Y.K. Agrawal, S.K. Menon, R. Giridhar, *Anal. Lett.* 20 (1987) 829–837.
- [19] F. Salinas, A. Espinosa-Mansilla, J.J. Berzas-Nevado, *Anal. Chim. Acta* 233 (1990) 289–294.
- [20] F. Salinas, A. Espinosa, J.J. Berzas-Nevado, *Microchem. J.* 43 (1991) 244–252.
- [21] F. Salinas, A. Espinosa, A. Zamoro, A. Muñoz de la Peña, *Anal. Lett.* 29 (1996) 2525–2540.
- [22] M.E. Ribone, A.P. Pagani, A.C. Olivieri, *Anal. Lett.* 34 (2001) 2077–2088.
- [23] P. Nagaraja, H.S. Yathirajan, K.R. Sunitha, R.A. Vasanth, *J. AOAC Int.* 85 (2002) 869–874.
- [24] M.I. Evgen'ev, S.Y. Garmonov, L.S. Shakirova, *J. Anal. Chem. (Transl. Zh. Anal. Khim.)* 57 (2002) 64–70.
- [25] B. Casetta, R. Cozzani, A.L. Cinquina, S. di-Marzio, *Rapid Commun. Mass-Spectrom.* 10 (1996) 1497–1503.
- [26] Y.M. Kao, M.H. Chang, C.C. Cheng, S.S. Chou, Yaowu Shipin Fenxi 9 (2001) 84–95.
- [27] M.Y. Haller, S.R. Mueller, C.S. Mc Ardell, A.C. Alder, M.J.-F. Suter, *J. Chromatogr. A* 952 (2002) 111–120.
- [28] K. Albert, K.L. Riter, R.L. Smallidge, *J. AOAC Int.* 86 (2003) 623–630.
- [29] E. Neidert, Z. Baraniak, A. Sauve, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1986) 641–643.
- [30] I. Schwaiger, R. Schuch, *Dtsch. Lebensm. Rundsch.* 96 (2000) 93–98.
- [31] M.C. Mahedero, T. Galeano, S. Galán, *Talanta* 57 (2002) 1–6.
- [32] C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506–2514.
- [33] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55A (1983) 712–724.
- [34] A. Savitzky, M.J.E. Golay, *Anal. Chem.* 36 (1964) 1627–1639.

Short communication

Improvements in europium sensitized fluorimetric determination of demeclocycline and methacycline

M.C. Mahedero*, D. Bohoyo, F. Salinas, T. Ardila, D. Airado, B. Roldán

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

Received 16 May 2004; received in revised form 10 October 2004; accepted 13 October 2004

Available online 6 January 2005

Abstract

Demeclocycline (DM) and methacycline (MT) have been determined by europium-sensitized fluorescence, using EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant. The methods have been developed in slightly alkaline solutions, with the formation of a new chelate where the lanthanide ion is bound to the beta-diketone group. Calibration graphs between 0.01 and 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ have been obtained for DM and MT determination. Both methods have been applied to the determination of these tetracyclines in serum samples with satisfactory recovery results.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Demeclocycline; Methacycline; Europium-sensitized fluorescence; Serum determination

1. Introduction

Tetracyclines (TCs) are an important antibiotic group used in medical and veterinary practice. The native fluorescence of TCs is well known and this property has been used for its determination [1–5].

Most of the proposed methods for DM and MT analysis are HPLC separation methods [6–14]. The intramolecular energy transfer from TCs to the Eu(III) ion has been described for TC detection by Hirschy et al. [15] and used as a detection system in HPLC and FIA methods [16].

The effect of several micellar systems on the enhancement of the emission fluorescence of various TC complexes with Eu(III) and Tb(III) has been previously described [17–22]. Thus, Georges and Ghazarian [17] proposed the use of Triton X-100. Enhancement of the fluorescence of the TCs–Eu(III) complex by DNA has been also used to determine DNA [18,19]. Thenoyltrifluoroacetone [20,21]

and cetylpyridinium chloride [22] considerably enhanced the Eu(III)-sensitized luminescence of tetracyclines. Methods for the individual determination of tetracycline, oxytetracycline, chlortetracycline and doxycycline have been reported, based on the Eu(III)-sensitized fluorescence, using cetyltrimethylammonium chloride as surfactant and EDTA as co-ligand [23]. However, no study has been previously described to determine demeclocycline or methacycline.

While chromatographic methods allow the separation and quantification of several tetracyclines, other analytical methods reported for their determination cannot distinguish between the different tetracyclines. In spite of this limitation, the availability of fast screening methods which allow the individual control of these antibiotics in human biological fluids is desirable.

In this paper, as an extension of the previous reports on this subject, several micellar media, including cetyltrimethylammonium chloride, cetylpyridinium monohydrate and sodium dodecylsulfate, have been examined for the study of the complexes of demeclocycline and methacycline with Eu(III), in the presence of EDTA as co-ligand.

* Corresponding author. Fax: +34 924 289375.

E-mail address: mahedero@unex.es (M.C. Mahedero).

2. Experimental

2.1. Instrumentation

Fluorescence spectral measurements were performed on a Fluorescence Spectrophotometer Varian Model Cary Eclipse. The instrument consists of two Czerny-Turner monochromators (excitation and emission), a xenon light source, a range of fixed width selectable slits, selectable filters, attenuators and two photomultiplier tubes as detectors. The fluorimeter is connected to a PC microcomputer via an IEE serial interface. The Cary Eclipse Version 1.0 software was used for data acquisition, data interpretation and graphical display.

2.2. Chemicals and reagents

For all experiments analytical grade chemicals and solvents were used. Stock solutions of demeclocycline (DM) (Sigma) and methacycline (MT) (Sigma) 2×10^{-4} M were prepared from their hydrochlorides in deionized water and stored at 4 °C. A 1.25×10^{-3} M europium(III) solution was prepared by dissolving the appropriate amount of europium nitrate (Sigma). Also, 0.1 M Tris/hydrochloride buffer solutions of different pH and 2.5×10^{-4} M EDTA (Panreac) were prepared. Aqueous solutions of cetyltrimethylammonium chloride (CTACl) (Sigma), cetylpyridinium monohydrate (CPC) (Sigma) and sodium dodecylsulfate solutions (SDS) (Sigma) (1%, v/v) were prepared.

2.3. Recommended procedure for DM and MT determination

2.3.1. DM and MT determination

An aliquot of DM or MT samples was placed in a 25 mL volumetric flask, 1 mL of 1% CTACl, 2 mL of pH 8.5 Tris-HCl 0.1 M buffer, 1 mL of 2.5×10^{-4} M EDTA and 0.2 mL of 1.25×10^{-3} M Eu(III) solution were added, followed by dilution with water to the mark.

Emission spectra of the samples were recorded, with an excitation wavelength of 396 nm, and the fluorescence signals were measured at an emission wavelength of 615 nm. Calibration graphs were obtained in the range of DM and MT concentrations between 0.01 and $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.3.2. Analysis of serum samples

An aliquot of 0.5 mL of serum, previously fortified with DM or MT, was placed in a test-tube; each serum sample was treated with 1 mL of acetonitrile to remove proteins. The suspension was centrifuged at 2000 rpm for 10 min, and 1 mL of the supernatant was placed in a 25 mL volumetric flask. In this volumetric flask, 1 mL of 1% CTACl, 2 mL of pH 8.5 Tris-HCl 0.1 M buffer, 1 mL of 2.5×10^{-4} M EDTA and 0.2 mL of 1.25×10^{-3} M Eu(III) solution were added, followed by dilution with water.

In these conditions, emission spectra of the samples were recorded with an excitation wavelength of 396 nm, and the

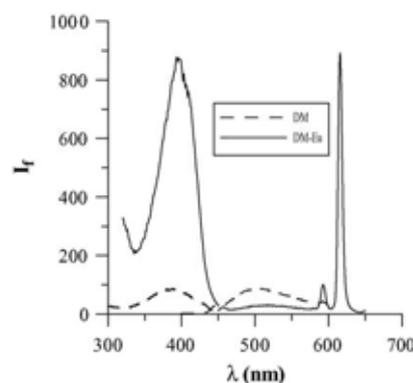


Fig. 1. Excitation and emission spectra of DM and DM-Eu(III) complex, pH 8.5, [Eu(III)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M, 0.04% CTACl.

fluorescence signals at an emission wavelength of 615 nm were measured.

3. Results and discussion

3.1. Optimization of experimental variables

The Eu(III) ion has the suitable energy level to allow intramolecular energy transfer from the lowest triplet level of the complex to a 4f level of the lanthanide ion, producing a fluorescence emission characteristic of the lanthanide ion.

The aqueous solutions of Eu(III) excited at 394 nm show a narrow emission band at 618 nm, and a less intense one at 594 nm. However, the fluorescence of the TCs-Eu(III) complexes is more intense than the Eu(III) fluorescence.

DM and MT show fluorescence emission in a basic pH and in presence of EDTA. Fig. 1 shows the excitation and emission spectra of the DM-Eu complex and DM alone. For both complexes; excitation at 396 nm and emission maxima at 615 nm were found.

The presence of EDTA allows the formation of a new complex where the Eu(III) ion is bound to the β -diketone group [15] giving an enhancement of the fluorescence. A 10^{-5} M EDTA concentration was fixed for the study of the complexes. In Fig. 2, the emission spectra of the MT complex in the absence and presence of EDTA are shown. For the DM complex a similar enhancement was found.

The effect of pH on the emission intensity is shown in Fig. 3. For the DM and MT complexes, the fluorescence emission increased with the pH value and the greatest fluorescence was found between pH 8 and 9. For higher pH values the fluorescence decreased. A pH value of 8.5 was chosen for the determination. This pH was fixed by addition of 2 mL of Tris/HCl 0.1 M buffer solution of pH 8.5, in a final volume of 25 mL.

For both complexes, the effect of the presence of several micellar media, CPC, CTACl and SDS was examined (Fig. 4). In all cases, the presence of a micellar medium enhances the

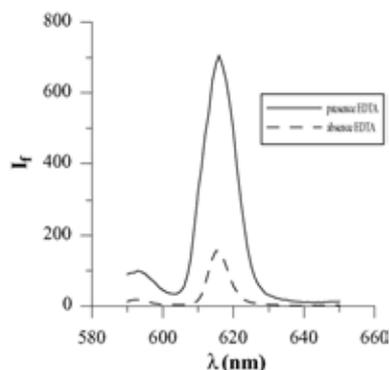


Fig. 2. Influence of the presence of EDTA in the sensitized fluorescence intensity of the MT–Eu(III) complex, pH 8.5, [Eu(III)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M, 0.04% CTACl.

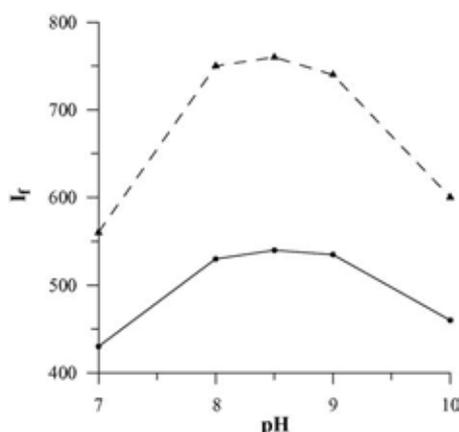


Fig. 3. Influence of pH on the sensitized fluorescence intensity of the DM–Eu(III) (---) and TM–Eu(III) (—) complexes, [Eu(III)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M, 0.04% CTACl.

fluorescence signal at 615 nm. The higher enhancement was found for CTACl. A concentration of 0.04% of CTACl was fixed for both complexes.

The influence of Eu(III) concentration shows that the fluorescence increased with the concentration of lanthanide ion. The intensity was maximum for an Eu/TC ratio comprised

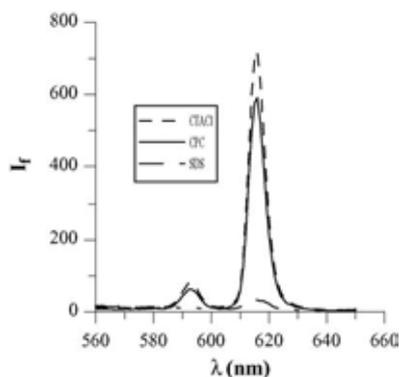


Fig. 4. Emission spectra of the DM–Eu(III) complexes in function of the nature of the surfactants employed, [Eu(III)] = 10^{-5} M, [EDTA] = 10^{-5} M, 0.04% surfactant.

between 3 and 4, for the DM complex, and between 2 and 4 for the MT complex. In both cases, for higher Eu(III) concentration a decrease of the fluorescence was observed. A 10^{-5} M Eu(III) concentration was chosen and a 1:1 stoichiometry was found for both complexes.

Under these conditions linear calibration graphs were obtained for DM and MT determination, in the range between 0.01 and $0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$. The calibration graphs were constructed, with three replicates per point, by measuring the intensity of luminescence at 615 nm, exciting at 396 nm. In order to test the presence of outlier points, the least median of squares regression method was applied [24]. No outliers were detected.

The proposed methods were evaluated by statistical analysis of the experimental data by fitting the overall least squares line according to $y = a + bx$ ($y = 2.5 + 779x$, standard deviations, $s_a = 0.4$ and $s_b = 7$ for demeclocycline, and $y = 4.1 + 853x$, $s_a = 0.4$ and $s_b = 7$, for methacycline). According to the residual distribution obtained, it can be assumed that both calibration lines comply with homocedasticity criteria. In order to test the linearity of the overall least squares regression, the ANOVA test was performed by comparing the variation of set means about the line (lack of fit) with the variation within line (pure error). The precision of the method was established by testing the analytical signal corresponding to a tetracycline concentration of $0.06 \mu\text{g mL}^{-1}$. For a series of 10 measurements, the relative error was 2.3% for the intra-days and 2.9% for the inter-days analysis (95% confidence level) for demeclocycline, and of 2.4 and 3.0% for methacycline, respectively.

The limit of detection (LOD) values found for both tetracyclines, were $0.002 \mu\text{g mL}^{-1}$, according to Long and Winefordner [25], and $0.003 \mu\text{g mL}^{-1}$, according to Clayton et al. [26], taking into account false positive and false negative error types ($\alpha = \beta = 0.05$), and the limit of quantification (LOQ) $0.01 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.2. Applications

The proposed methods have been applied to determine the selected tetracyclines in serum samples. The therapeutic levels for DM and MT are between 1 and $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ in serum. Urine samples were not tested with the proposed method, as the therapeutic levels of these drugs in urine are very high ($300\text{--}500 \mu\text{g mL}^{-1}$) and a 1:1000 dilution of the urine was necessary to perform the determination.

Samples belonged to different volunteer individuals, and collected in different days at the “Residencia Sanitaria Infanta Cristina” Hospital (Badajoz, Sapin), were used for the determination of DM and MT in serum. The serum samples were deproteinized with acetonitrile. The suspension was centrifuged and 1 mL of the supernatant was taken to be treated following the procedure above mentioned. The recoveries found for four different serum samples are summarized in Table 1.

Table 1

Recovery results for the sensitized-luminescence determination of demeclocycline and methacycline in fortified serum samples^a

Sample	Added ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Demeclocycline		Methacycline	
		Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)	Found ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Recovery (%)
Serum 1	2.9	3.00 \pm 0.06	103	3.09 \pm 0.09	106
	3.8	3.87 \pm 0.03	102	3.58 \pm 0.02	94
	4.8	4.89 \pm 0.07	102	4.70 \pm 0.05	98
Serum 2	2.9	2.79 \pm 0.09	96	2.8 \pm 0.1	96
	3.8	3.99 \pm 0.05	105	3.8 \pm 0.1	100
	4.8	4.70 \pm 0.07	98	4.98 \pm 0.09	104
Serum 3	2.9	2.84 \pm 0.04	98	3.04 \pm 0.07	105
	3.8	3.68 \pm 0.02	97	3.65 \pm 0.07	96
	4.8	4.99 \pm 0.07	104	4.70 \pm 0.05	98
Serum 4	2.9	3.09 \pm 0.08	106	2.80 \pm 0.08	97
	3.8	3.70 \pm 0.09	97	4.07 \pm 0.07	107
	4.8	5.08 \pm 0.03	106	4.60 \pm 0.07	96

^a Average of five determinations.

4. Conclusions

This paper presents a suitable method for routine analysis, in which the use of sensitized europium luminescence is extended to the determination of DM and MT in serum samples. In cases in which is necessary the individual determination of the tetracyclines studied in this work, it is of interest to dispose, as an alternative, a method of analysis simpler than a chromatographic method. EDTA was used simultaneously with europium, in order to prevent the formation of europium hydroxides in alkaline solutions, and acting as a co-ligand to exclude water molecules from the coordination sphere of the lanthanide. The use of micellar systems, particularly CTACl, providing an environment characterized by lower polarity and higher viscosity than the bulk aqueous phase, provides a simple means of enhancing the Eu(III)-sensitized luminescence from tetracyclines, and hence detection limits. In addition, the performed study may be interested as a preliminary study to develop a chromatographic method for tetracycline derivatives screening, using europium-sensitized luminescence as a detection system.

Acknowledgements

The authors acknowledge Junta de Extremadura-Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología and FEDER (project 2PR 04A007) for the financial support of this work.

References

- [1] M.A. Elsayed, M.H. Barary, H. Mahgoub, *Talanta* 32 (1985) 1153–1155.
- [2] W.B. Chang, Y.B. Zhao, Y.X. Ci, L.Y. Hu, *Analyst* 117 (1992) 1377–1378.
- [3] S. Croubels, C. Van Peteghem, W. Baeyens, *Analyst* 119 (1994) 2713–2716.
- [4] H.C. Goicoechea, A.C. Olivieri, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4361–4368.
- [5] R. Fernández-González, M.S. García-Falcón, J. Simal-Gandara, *Anal. Chim. Acta* 455 (2002) 143–148.
- [6] N. Weng, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 7 (1989) 1691–1703.
- [7] G. Stubbings, J.A. Tarbin, G. Shearer, *J. Chromatogr. B* 679 (1996) 137–145.
- [8] S. Tanase, H. Tsuchiya, J. Yao, S. Ohmoto, N. Takagi, S. Yoshida, *J. Chromatogr. B* 706 (1998) 279–285.
- [9] A.G. Kazemifard, D.E. Moore, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997) 689–696.
- [10] A.D. Cooper, G.W.F. Stubbings, M. Kelly, J.A. Tarbin, W.H.H. Farrington, G. Shearer, *J. Chromatogr. A* 812 (1998) 321–326.
- [11] F. Kondo, S. Morikawa, S. Tateyama, *J. Food. Prot.* 52 (1989) 41–44.
- [12] W. Naidong, K. Verresen, E. Roets, J. Hoogmartens, *J. Chromatogr.* 586 (1991) 61–66.
- [13] A.G. Kazemifard, D.E. Moore, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 16 (1997) 689–696.
- [14] L. Monser, F. Darghouth, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 23 (2000) 353–362.
- [15] L.M. Hirschy, E.V. Dose, J.D. Winefordner, *Anal. Chim. Acta* 147 (1983) 311–316.
- [16] T.J. Wenzel, L.M. Collete, D.T. Dahlen, S.M. Hendrickson, L.W. Yarmaloff, *J. Chromatogr. Biomed. Appl.* 77 (1998) 149–158.
- [17] J. Georges, S. Ghazarian, *Anal. Chim. Acta* 276 (1993) 401–409.
- [18] Y.X. Ci, Y.Z. Li, X.J. Liu, *Anal. Chem.* 67 (1995) 1785–1788.
- [19] X.J. Liu, Y.Z. Li, Y.X. Ci, *Anal. Chim. Acta* 345 (1997) 213–217.
- [20] P. Izquierdo, A. Gomez-Hens, D. Perez-Bendito, *Anal. Chim. Acta* 292 (1994) 133–139.
- [21] B. Gala, A. Hens-Gomez, D. Perez-Bendito, *Talanta* 44 (1997) 1883–1889.
- [22] R.D. Jee, *Analyst* 120 (1995) 2864–2872.
- [23] N. Arnaud, J. Georges, *Analyst* 126 (2001) 694–697.
- [24] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust Regression and Outlier Detection*, Wiley, New York, 1987.
- [25] G.L. Long, J.D. Winefordner, *Anal. Chem.* 55 (1983) 712A–724A.
- [26] C.A. Clayton, J.W. Hines, P.D. Elkins, *Anal. Chem.* 59 (1987) 2506–2514.

Strategies for solving matrix effects in the analysis of sulfathiazole in honey samples using three-way photochemically induced fluorescence data

M.C. Mahedero, N. Mora Díaz, A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, D. Bohoyo Gil*

Department of Analytical Chemistry, University of Extremadura, 06071 Badajoz, Spain

Received 21 April 2004; received in revised form 23 July 2004; accepted 11 August 2004

Available online 18 October 2004

Abstract

A widely employed compound for honey treatment, sulfathiazole (ST), was determined in commercial honey samples, employing a combination of photochemically induced fluorescence excitation–emission matrices (EEMs) and chemometric processing of the recorded second-order data. Parallel Factor Analysis (PARAFAC) and Self-Weighted Alternating Trilinear Decomposition (SWATLD) methods were used for calibration. An appropriately designed calibration with a set of standards composed of 18 samples, coupled to the use of the second-order advantage offered by the applied chemometric techniques, allowed quantitation of sulfathiazole in spiked commercial honey samples. No previous separation or sample pretreatment steps were required. The results were compared with other calibration methods such as N-PLS and PLS-1 that produced good results on synthetic samples but not on the investigated commercial honey samples.

© 2004 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Honey; Sulfathiazole; Photochemically induced fluorescence; Pararell factor analysis (PARAFAC); Self-weighted alternating trilinear decomposition (SWATLD)

1. Introduction

Sulfonamides constitute a group of drugs which are widely used in veterinary and medical practice. Thus, residues of these drugs may remain in food of animal origin. Different methods of analysis of these drugs in foods and feeds have been reported [1,2]. In this context, the most investigated foods have been milk, honey, meat, fish and eggs [3–6]. The main part of the proposed methods are based on liquid chromatography with UV [6–8] or fluorimetric [3,9] detection. Spectrofluorimetric [10] and capillar electrophoresis [11] methods have been also established. For the determination of sulfonamides in honey HPLC [9,12,13] methods have been mainly proposed and only one photometric method has

been established [14]. The European Legislation does not fix Maximum Residue Limits (LRM) for antibiotics in honey.

Sulfathiazole (ST), 4-amine-*N*-(2-tiazolil) benzenesulfonamide is used for the treatment of honey and the analysis of its residues is of interest. Total ST has been determined after acid hydrolysis and fluorimetric detection coupled to HPLC was performed by derivatization with fluoescamine [4–16]. Sulfathiazole such as the *N*-1-substituted sulfonamides, are weakly fluorescent compounds, but fluorescence emission of these drugs can be photoinduced by UV irradiation [10,17]. Because sulfonamides are polar compounds, severe matrix influences usually occur resulting in complicated clean-up procedures and low recoveries in food analysis.

Multivariate calibration is gaining acceptance for the determination of analytes in complex mixtures. Full-spectrum multivariate calibration methods offer the advantage of speed in the determination of the components of interest, avoiding separation steps in the analytical procedure. Partial

* Corresponding author. Tel.: +34 924289375; fax: +34 924289375.
E-mail address: dbohoyo@unex.es (D. Bohoyo Gil).

least-squares (PLS) has become the usual first-order multivariate tool because of the quality of the obtained calibration models, the ease of implementation and the availability of software. An interesting characteristic of PLS is that calibration can be performed by ignoring the concentrations of all other components except the analyte of interest. However, all first-order methods, including PLS, are sensitive to the presence of unmodeled interferents. This situation is encountered when dealing with natural samples of complex composition, such as the presently studied honey samples.

A good alternative to the problem of unexpected interferents is to move to second-order data [18]. Examples of bilinear second-order data are LC–UV, GC–MS and excitation–emission fluorescence matrices (EEMs). Interestingly, the decomposition of a three-way data array (obtained when second-order data for a set of samples are grouped) is often unique, allowing relative concentrations and spectral profiles of individual sample components to be extracted directly. This permits correction for uncalibrated sample constituents, a property which has been named the “second-order advantage” [19]. It is fully exploited by the parallel factor analysis PARAFAC [20] and self-weighted alternating trilinear decomposition SWATLD [21] models, which operate in a three-step mode: (1) trilinear decomposition of the spectral cube formed by stacking the calibration matrices together with that of the unknown sample, (2) calibration of the concentration scale by linear regression and (3) prediction by inter or extrapolation of the unknown in the pseudo univariate graph. The PARAFAC algorithm is based on a least-squares minimization, whereas SWATLD uses a procedure known as alternating trilinear decomposition. EEMs have been used in combination with these chemometric methods for quantitative analysis of biological compounds. In this context, quantification of chlorophylls and pheopigments [22], antitumoral [23], anti-inflammatory [3] and anticonvulsant [23] drugs and antibiotics [4,24] have been proposed. On the other hand, the PARAFAC application to food samples has been scarce [5,6].

In this paper, PARAFAC and SWATLD methods have been applied to determine ST in honey using, for the first time, photochemically induced fluorescence excitation–emission matrices (PIF-EEMs). The results were compared with three-way matrix calibration data analysed by N -way partial least-squares regression (N-PLS), and two-way calibration data analysed by partial least-squares regression (PLS-1). The method allows to obtain ST concentration in complex honey sample matrices without interference from the matrix components.

2. Theory

2.1. Three-way trilinear data theory

When a sample produces a $J \times K$ data matrix as it is the case of PIF-EEMs (J = number of excitation wavelengths and K = number of emission wavelengths) the obtained set

stacking the training matrices is a cube. For I samples the cube dimensions are $I \times J \times K$. Provided the data follow a trilinear model, the cube can be written as a sum of tensor products of three vectors for each fluorescent component. When \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n collect the relative concentration ($I \times I$), excitation ($J \times I$) and emission ($K \times I$) profiles for component n , respectively, the data cube \mathbf{F} can be written as [25,26]

$$\mathbf{F} = \sum_{n=1}^N \mathbf{a}_n \otimes \mathbf{b}_n \otimes \mathbf{c}_n + \mathbf{E}$$

In this expression \otimes indicates the tensor product, \mathbf{E} is a residual error term with the same dimensions as \mathbf{F} and N is the total number of responsive components. The column vectors \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n and \mathbf{c}_n are collected into the three loading matrices \mathbf{A} , \mathbf{B} and \mathbf{C} . An interesting characteristic of \mathbf{F} is that it can be decomposed giving access to spectral profiles \mathbf{B} and \mathbf{C} , and relative concentration \mathbf{A} , of individual components in the I samples whether there are chemically known or not. In theory this characteristic should allow to obtain the concentration of calibrated components in the presence of any number of uncalibrated components.

We have used underlined bold capital letter for cubes; bold capital letter for matrices; bold lowercase for vectors and italics for scalars.

We have applied PARAFAC and SWATLD to obtain ST concentration in the presence of the uncalibrated components of the honey matrix. These two methods are becoming more and more employed by chemometricians for analyzing three-way data, and the software required for its implementation is easily available on the Internet [27]. Issues relevant to the application of the models are: (i) how to establish the number of components, (ii) how to identify specific components from the information provided by the array decomposition and (iii) how to calibrate the model in order to obtain absolute concentrations for a particular component in an unknown sample.

Bro [20] suggested obtaining the number of responsive components (N) by consideration of the internal parameter known as core consistency, which is a measure of how well a given model is able to reproduce the so-called Tucker core of a cube of data [28]. The core consistency is calculated as a function of a trial number of components. It remains near a value of 100 when the number is less than or equal to the optimum; for higher component numbers it drops below 50%.

Identification of the chemical constituent under investigation is done with the aid of the profiles \mathbf{B} and \mathbf{C} , as extracted by PARAFAC and SWATLD, and comparing them with those of a standard solution of the analyte of interest.

Absolute analyte concentrations are obtained after proper calibration, since only relative values (\mathbf{A}) are provided by decomposing the three-way data array. Experimentally, this is done by using the information for the set of standards of known composition. The calibration procedure involves decomposing an array formed by joining the matrices for the I training samples with that for the unknown.

2.2. Figures of merit

Figures of merit furnished are the sensitivity (SEN), selectivity (SEL) and analytical sensitivity (γ). For an analyte SEN is defined as the net signal at unit concentration; SEL is the ratio between SEN and the total signal, as suggested by Kalivas and co-workers [29]. The analytical sensitivity (γ), as in univariate calibration, is the ratio between SEN and the spectral noise which is calculated by replicate blank measurements. The inverse (γ^{-1}) establishes the minimum concentration difference that can be appreciated by the method, regardless of the specific technique, equipment and scale employed [30]. The limit of detection (LOD) [31,24] is calculated as $LOD = 3.3 S(o)$, where $S(o)$ is the standard deviation in the concentration estimated for different blank samples.

2.3. Software

All calculations were done using MATLAB 5.3 [32]. A routine for PLS-1 was used following a previously known algorithm [24]. Those for N-PLS and PARAFAC are available on the Internet [27] although a useful MATLAB graphical interface was developed for easy data manipulation and graphics presentation [24]. This interface provides a simple mean of loading the data matrices into the MATLAB working space before running PARAFAC, SWATLD and N-PLS.

The calculated excitation and emission profiles provided by the former two are separately plotted, in order to allow users to identify the analyte of interest. The pseudo-univariate calibration graph [33] corresponding to this particular component is then displayed. Once this is done, the results are conveniently shown in terms of predicted concentration and analytical figures of merit.

3. Experimental

3.1. Apparatus and reagents

Fluorescence measurements were carried out on an Aminco Bowman Series 2 spectrofluorophotometer equipped with a 150 W Xe lamp, connected to a PC Pentium III microcomputer running under Windows 98 (through a GPIB IEEE-488 interface). Data acquisition and analysis were performed by the use of AB2 software. In all cases, 1.00 cm quartz cells were used.

An Osram 200 W HBO high pressure mercury lamp with an Oriel model 8500 power supply was used for irradiating ST solutions. The photochemical set-up included a light-box consisting of a fan, a mercury lamp and a quartz lens. A standard Hellma 1.00 cm quartz fluorescence cuvette was placed on an optical bench at 30 cm from the mercury lamp. The solutions were magnetically stirred during the UV irradiation.

Sulfathiazole is a non-fluorescent sulfonamide. The UV irradiation of its solutions induced a fluorescent emission (PIF)

at 342 nm, when exciting at 251 nm. The emission signal is maximum in an ethanol:water (20:80)(v/v) and weakly acid medium. The pH is fixed with acetic/acetate buffer solution of pH 4.75, and the optimal irradiation time is 5 min. Under these conditions a linear relation PIF-ST concentration is found between 0.30 and 3.00 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

The photochemically induced fluorescence excitation–emission matrices (PIF-EEMs) were measured every 5 nm in the excitation range comprised between 200 and 300 nm and every 1 nm in the emission range comprised between 300 and 400 nm. The ST photochemically induced fluorescence (PIF) emission spectrum was recorded between 300 and 400 nm, exciting at 251 nm.

All experiments were performed with analytical-reagent grade chemicals. Stock solutions consisted of 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ of ST (Sigma). Standard solutions of ST were obtained by suitable dilutions. Buffer solutions consisted of acetic acid/sodium acetate 0.5 M of pH 4.75.

Five honey samples from different countries were used: Spain, Germany, Belgium, Canada and Switzerland.

3.2. Recommended procedure for ST determination in honey

3.2.1. Honey samples

Honey of 10 g were weighed, and then contaminated by spiking known volumes of a concentrated ST aqueous solution. The samples were left at room temperature during 20 min and then diluted with deionised water to 100 mL in a volumetric flask. A suitable volume of this solution was placed in a 25 mL volumetric flask, and 3 mL of 0.5 M buffer solution, 5 mL of ethanol and deionised water were added to final volume.

3.2.2. Calibration and test sets

For calibration, six samples by triplicate set, making a total of 18 samples, was built (Cal1–Cal18). Sulfathiazole concentrations were comprised between 0 and 3 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A suitable volume of this solution was placed in a 25 mL volumetric flask, and 3 mL of 0.5 M buffer solution, 5 mL of ethanol and deionised water were added to final volume. Honey and calibration samples were irradiated for 5 min. Additionally, six samples (Val1–Val6) were built with analyte concentrations different from those employed for calibration but within their corresponding calibration range. Table 1 summarize the used

Table 1
Calibration and test sets

Sample	Sulfathiazole (mg L^{-1})	Sample	Sulfathiazole (mg L^{-1})
Cal1	0.0	Val1	0.4
Cal2	0.5	Val2	0.8
Cal3	1.0	Val3	1.6
Cal4	2.0	Val4	1.8
Cal5	2.5	Val5	2.2
Cal6	3.0	Val6	2.6

concentration in calibration and test set. Emission spectra and EEMs were measured in random order.

4. Results and discussion

Fig. 1 shows the PIF-EEMs corresponding to a standard ST sample in wide spectral emission and excitation ranges, showing the presence of Rayleigh scattering. To avoid the presence of signals that are uncorrelated with the target concentrations of the studied analyte, EEMs were in all cases recorded in the sensible excitation and emission ranges shown in Fig. 2A and B, where only the analyte contributes to the overall fluorescence intensity, that is, emission from 300 to 400 nm at 1 nm intervals and excitation from 210 to 290 nm at 5 nm intervals. It can be observed that the fluorescent components of honey show signal overlapping with the ST signal. Thus, if the second-order advantage is not used the analysis is not possible. In this context, PARAFAC and SWATLD methodologies have been applied to obtain higher spectral information and a greater spectral differentiation between the honey components and the analyte.

4.1. Test set results

Unidimensional fluorescence emission data recorded for the calibration samples (at the compromise excitation wavelength of 251 nm) were first analyzed using the PLS-1 method. Leave one out cross-validation was applied to the

set of calibration samples leading to an optimum number of factors equals to 2, as estimated according to Haaland's criterium [34]. Prediction on the six test samples using this PLS-1 model led to good recoveries. Three-way EEM data for the test set of six samples were also analyzed by N-PLS, PARAFAC and SWATLD. Specific details on the implementation of PARAFAC and SWATLD methods will be given below in connection with the study of honey samples. Indeed, these models give comparably good results, for the set of artificial samples, composed of only sulfathiazole, as summarized in Table 2.

4.2. Honey samples results

The results obtained for honey samples contaminated with ST clearly illustrate the meaning and usefulness of the second-order advantage. On the basis of models trained with the calibration samples Cal1–Cal18, neither PLS-1, nor N-PLS (modelled with unidimensional emission spectra and EEMs, respectively) was able to produce acceptable results on honey samples. Specifically, relative errors of prediction (REP) were unacceptably large in all cases. The results obtained with N-PLS and PLS-1 are collected in Table 3. This is due to the presence of fluorescent honey components whose influence has not been taken into account in the calibration set. These components not only exhibit emission intensities that overlap with the fluorescence signal from the analyte (Fig. 2A) but are also intrinsically variable and,

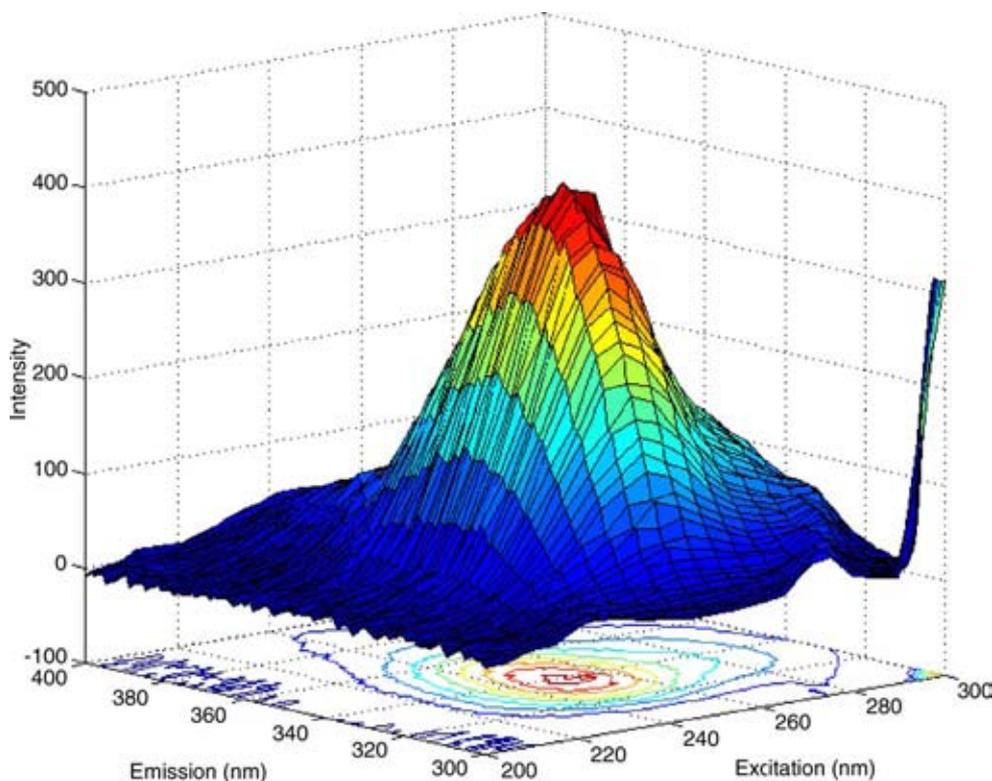


Fig. 1. Three-dimensional plot of the EEM for standard sample of ST, showing the presence of Rayleigh scattering.

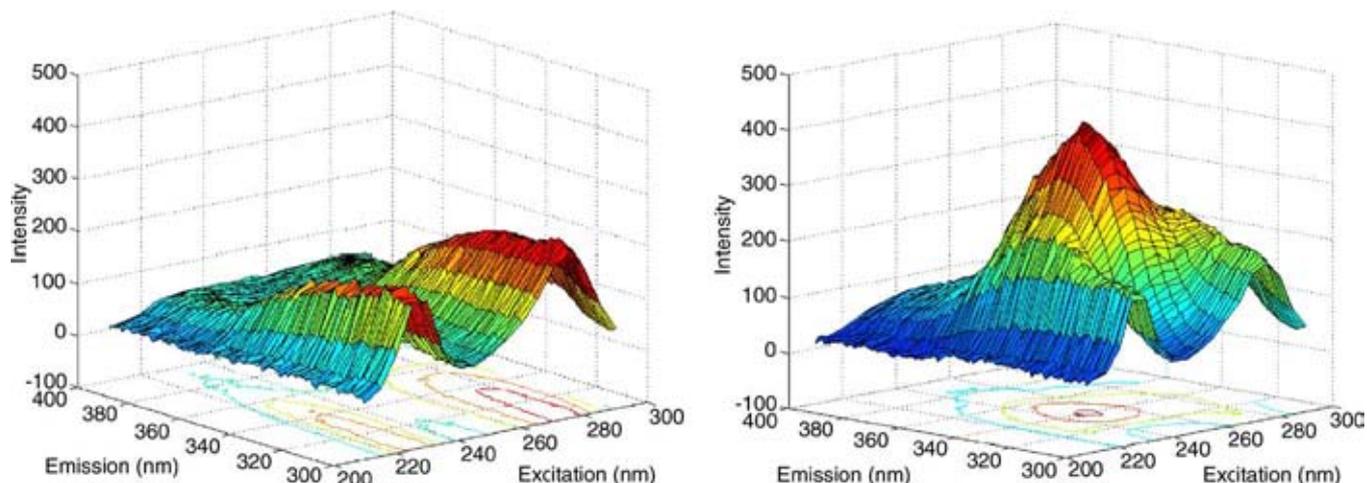


Fig. 2. Three-dimensional plot of the EEM for honey sample recorded in restricted excitation and emission wavelength ranges. EEM (A) for an uncontaminated sample and (B) for a contaminated sample.

Table 2
Predictions in artificial samples applying different calibration methods

Component	Method							
	PLS-1		N-PLS		PARAFAC		SWATLD	
	REP (%)	%R ^a						
Sulfathiazole	2.8	104 (2)	3.0	104 (2)	2.8	103 (2)	2.6	103 (2)

REP (%): relative error of prediction; %R: average recovery.

^a Values between parentheses correspond to the standard deviations computed for the recoveries of the six test samples.

thus, difficult to model if the second-order advantage is not employed.

Although N-PLS is an efficient way of handling three-way data such as those presently employed, this regression model cannot be trained by including the unknown sample into the calibration data cube, since concentration information is unavailable for unknowns. For reasons explained above, N-PLS do not allow obtaining information on uncalibrated interfering agents, such as honey.

PARAFAC and SWATLD were applied, separately for each type of honey, to data cubes formed by PIF-EEMs for

Table 3
Results obtained when applying PLS-1 and N-PLS analysis to honey samples contaminated with sulfathiazole

Added	Predicted (PLS-1/N-PLS) ^a				
	Spain	Germany	Belgium	Canada	Switzerland
–	0.20/0.90	0.10/0.51	0.30/1.39	0.09/0.50	0.43/1.22
0.10	0.60/0.96	0.21/0.60	0.58/1.49	0.20/0.62	0.48/1.33
0.30	0.95/1.28	0.70/0.95	0.75/1.70	0.50/0.70	0.75/1.60
0.70	1.15/1.48	0.90/1.25	1.02/1.95	0.8/1.10	1.18/1.87
1.70	2.06/2.26	1.85/2.14	1.86/2.60	1.80/2.09	1.92/2.66
RMSEP	0.2/06				
REP (%)	26.8/73.5				

RMSEP: root-mean-square error of prediction; REP (%): relative error of prediction.

^a Sulfathiazole concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) predicted. In all cases, the number of spectral components is 2.

six calibration samples, prepared by triplicate (Cal1–Cal18), together with a honey sample. The concentrations of these samples are comprised into the range of linearity above mentioned in the PIF method.

For selecting the number of spectral components for each honey sample the core consistency analysis has been applied [28]. Fig. 3 shows the value obtained for the 18-sample cube when studying the honey sample from Spain. As can be seen, the core consistency drops to a very low value when using

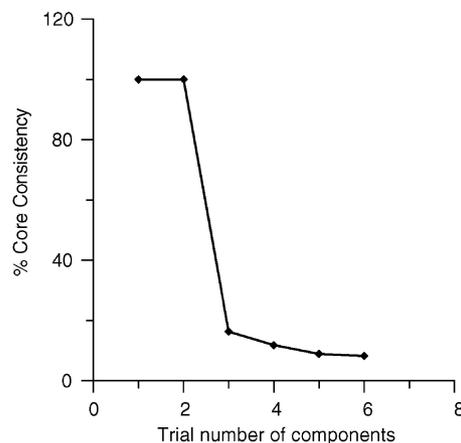


Fig. 3. Plot of the PARAFAC core consistency values as a function of the trial number of components, for the cube composed of the EEM for the sample of honey from Spain, and the 18 calibration EEMs.

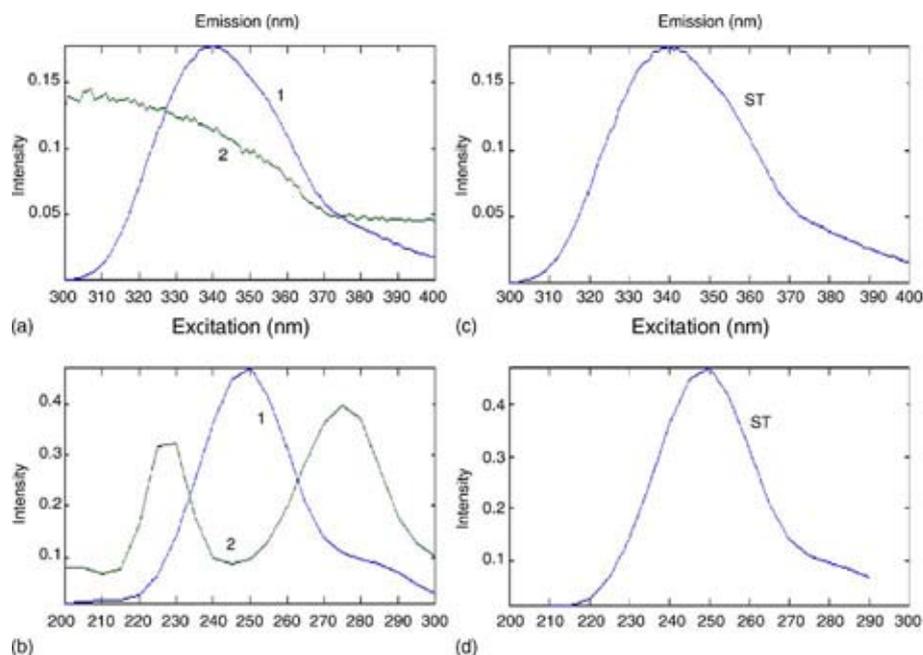


Fig. 4. (a) Emission profiles provided by a two components PARAFAC model (**B** matrix) used to process the cube formed by sample honey from Spain and the 18 calibration samples. The components are labeled according to the contribution of the overall variance. (b) Excitation profiles (**C** matrix). (c) Normalized experimental emission spectra for the one studied analyte, using $\lambda_{\text{exc}} = 250$ nm. (d) Normalized experimental excitation spectra ($\lambda_{\text{em}} = 340$ nm).

three spectral components to model the cube, suggesting that $N = 2$ is a sensible choice. The same number of factors was also found for the remaining honey samples, showing that although the calibration samples were built starting from the one pure analyte, the presence of honey adds new fluorescent components to the data cube, collectively considered as a single extra component by PARAFAC and SWATLD.

Fig. 4 shows the plot of loading matrices provided by PARAFAC when processing the honey sample from Spain, together with the calibration set, excitation and emission spectral profiles **B** and **C** (Fig. 4a and b). The components have been labelled with the order assigned by the model. In this case, analyte appears in the first place because it is the origin of the main fluorescence intensity. PIF-emission and PIF-excitation experimental spectra of pure standard ST (Fig. 4c and d), have been compared allowing to assign component 1 to ST and component 2 to matrix honey.

The prediction results for the honey samples are listed in Tables 4 and 5. Honey samples contaminated with 10, 30, 70 and 170 $\mu\text{g ST g}^{-1}$ of honey that are equivalent, according to the sample procedure, to ST concentrations of 0.10, 0.30, 0.70 and 1.70 $\mu\text{g mL}^{-1}$ into the 25 mL volumetric flasks, respectively, were used. The statistical analysis shows mean prediction errors for sulfathiazole determination that are comparable to those found in the artificial samples.

4.3. Figures of merit

The study based on PARAFAC and SWATLD pseudo-univariate calibration also furnishes figures of merit. The standard errors in predicted concentrations have been reported in Tables 4 and 5. The root-mean-square error of prediction, $\text{RMSEP} = [1/(I - 1) \sum_1^I (C_{\text{act}} - C_{\text{pred}})^2]^{1/2}$, where

Table 4
Results obtained when applying PARAFAC analysis to honey samples contaminated with sulfathiazole

Added	Predicted				
	Spain ^a	Germany ^a	Belgium ^a	Canada ^a	Switzerland ^a
–	0.001 (0.01)	–	0.002 (0.01)	–	–
0.10	0.091 (0.01)	0.089 (0.01)	0.089 (0.006)	0.088 (0.007)	0.09 (0.01)
0.30	0.29 (0.01)	0.28 (0.01)	0.29 (0.01)	0.28 (0.01)	0.28 (0.01)
0.70	0.65 (0.02)	0.70 (0.02)	0.69 (0.01)	0.64 (0.01)	0.72 (0.02)
1.70	1.56 (0.06)	1.69 (0.06)	1.65 (0.06)	1.58 (0.07)	1.57 (0.06)
RMSEP	0.03				
REP (%)	4.2				

RMSEP: root-mean-square error of prediction; REP (%): relative error of prediction.

^a Sulfathiazole concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) predicted. Standard deviation in parentheses. In all cases, the number of spectral components is 2.

Table 5
Results obtained when applying SWATLD analysis to honey samples contaminated with sulfathiazole

Added	Predicted				
	Spain ^a	Germany ^a	Belgium ^a	Canada ^a	Switzerland ^a
–	–	–	–	–	–
0.10	0.10 (0.01)	0.10 (0.01)	0.09 (0.01)	0.089 (0.007)	0.09 (0.01)
0.30	0.29 (0.01)	0.29 (0.01)	0.30 (0.01)	0.28 (0.01)	0.28 (0.01)
0.70	0.66 (0.02)	0.70 (0.02)	0.69 (0.01)	0.64 (0.01)	0.72 (0.02)
1.70	1.58 (0.05)	1.70 (0.06)	1.67 (0.06)	1.58 (0.05)	1.55 (0.06)
RMSEP	0.02				
REP (%)	2.8				

RMSEP: root-mean-square error of prediction; REP (%): relative error of prediction.

^a Sulfathiazole concentration ($\mu\text{g mL}^{-1}$) predicted. Standard deviation in parentheses. In all cases, the number of spectral components is 2.

Table 6
Analytical figures of merit

	PARAFAC	SWATLD
Sensitivity (SEN), FU (L mg^{-1})	1.77	1.72
Selectivity (SEL)	0.85	0.86
γ^{-1} ($\text{L}^{-1} \text{mg}$)	0.005	0.005
LOD (mg L^{-1})	0.02	0.02

FU: fluorescence units (arbitrary).

I is the number of prediction samples, C_{act} and C_{pred} are the actual and predicted concentrations, respectively; and relative error of prediction $\text{REP}(\%) = (100/\bar{c}) \times \text{RMSEP}$, where \bar{c} is the average component concentration, are included.

The standard deviation in the concentration ($S(o)$) was estimated for nine different blank samples. The analytical figures of merit for both methods are collected in Table 6.

In order to gain further insight into the accuracy of these methods, linear regression analysis of nominal versus found concentration values was applied for each procedure. The estimated intercept and slope (\hat{a} and \hat{b} , respectively) were compared with their ideal values of 0 and 1 using the elliptical joint confidence region (EJCR) test [35]. Fig. 5 shows the

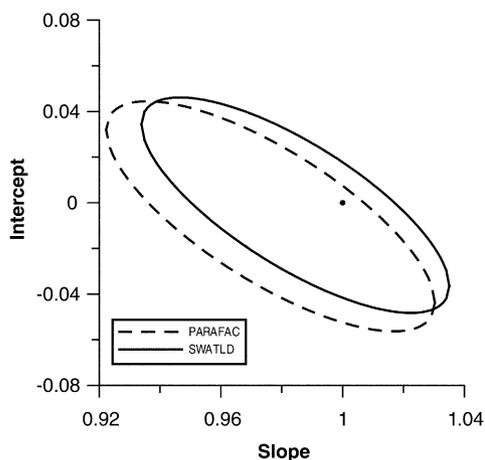


Fig. 5. EJCRs for the slope and intercept corresponding to regressions of predicted vs. added concentrations of sulfathiazole applying PARAFAC and SWATLD. The black circle mark the theoretical ($a = 0, b = 1$) point.

EJCRs for the two employed modes when either PARAFAC or SWATLD are applied. As can be seen, the ellipses contain the theoretical ($a = 0, b = 1$) point, but the elliptic size corresponding to the PARAFAC algorithm mode is significantly larger. From the inspection of Fig. 5 it can be concluded on improvement in the predictive ability of SWATLD compared to PARAFAC.

5. Conclusions

The fluorimetric determination of sulfathiazole (ST) using second-order multivariate calibration techniques is demonstrated to be feasible. A photoinduced previous process drastically increases the native ST fluorescence. The application of the second-order advantage by using the three-dimensional excitation–emission matrices, allows the ST determination in the presence of unknown interferences in ST spiked honey samples. Slightly better results in the honey samples analysis are obtained by application of SWATLD calibration compared to PARAFAC. Adequate recovery values are obtained in all cases when several honeys from different countries are analyzed. The proposed methodology has demonstrated to be adequate for routine analysis in the control of contamination of sulfathiazole in honey.

Acknowledgements

Financial support was provided by DGI-MCYT of Spain (Projet BQU2002-00918). Diego Bohoyo Gil is grateful to the Consejería de Educación, Ciencia y Tecnología de la Junta de Extremadura for a fellowship (DOE 21/06/01).

References

- [1] W. Horwitz, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (1981) 104.
- [2] W. Horwitz, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 64 (1981) 814.
- [3] G. Stoev, A. Michailova, J. Chromatogr. A 871 (2000) 37.
- [4] D.H. Kim, J.O. Choi, J. Kim, D.W. Lee, J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol. 26 (2003) 1149.

- [5] N.J. Lee, C.K. Holtzapple, M.T. Muldoon, S.S. Deshpande, L.H. Stanker, *Food Agric. Immunol.* 13 (2001) 5.
- [6] B. Roudant, M. Garnier, *Food Addit. Contam.* 19 (2002) 373.
- [7] Y. Ito, H. Oka, Y. Ikai, H. Matsumoto, Y. Miyazaki, H.J. Nagase, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 95.
- [8] N. Furusawa, *Anal. Chim. Acta* 481 (2003) 255.
- [9] G.F. Pang, Y.Z. Cao, C.L. Fan, J.J. Zhang, X.M. Li, Z.Y. Li, G.O. Jia, *Anal. Bioanal. Chem.* 376 (2003) 534.
- [10] M. Sanchez-Peña, F. Salinas, M.C. Mahedero, J.J. Aarón, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 10 (1992) 805.
- [11] M.E.P. Hows, D. Perrett, J. Kay, *J. Chromatogr. A* 768 (1997) 97.
- [12] L. Verzeznassi, M.C. Savog-Perround, R.H. Stadler, *J. Chromatogr. A* 977 (2002) 77.
- [13] R.D. Caballero, J.R. Torres-Lapasio, J.J. Baezo-Baeza, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 24 (2001) 117.
- [14] F. Salinas, A. Espinosa-Mansilla, J.J. Berzas-Nevado, *Anal. Chim. Acta* 233 (1990) 289.
- [15] E. Neidert, Z. Baraniak, A. Sauve, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 69 (1986) 641.
- [16] A.C. Martel, S. Zeggane, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 26 (2003) 953.
- [17] M.C. Mahedero, J.J. Aaron, *Analisis* 20 (1992) 53.
- [18] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38 (1997) 149.
- [19] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Anal. Chem.* 66 (1994) 782A.
- [20] R. Bro, *Chemom. Intell. Lab.* 38 (1997) 149.
- [21] Z.P. Chen, H.L. Wu, J.H. Jiang, Y. Li, R.O. Yu, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52 (2000) 75.
- [22] L. Moberg, G. Robertsson, B. Karlberg, *Talanta* 54 (2001) 161.
- [23] J.A. Arancibia, G.M. Escandar, *Talanta* 60 (2003) 1113.
- [24] A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa Mansilla, D. González Gómez, A.C. Olivieri, H. Goicoechea, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2640.
- [25] G.W. Ewing, *Instrumental Methods of Chemical Analysis*, McGraw-Hill, New York, 1985.
- [26] S. Leurgans, R. Ross, *T. Stat. Sci.* 7 (1992) 289.
- [27] <http://www.models.kvl.dk/source/>.
- [28] R. Bro, *Multi-way analysis in the food industry*, Doctoral Thesis, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- [29] N.J. Messick, J.H. Kalivas, P.M. Lang, *Anal. Chem.* 68 (1996) 1572.
- [30] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares, M. Román Ceba, *Anal. Lett.* 26 (1993) 1243.
- [31] R. Boqué, J. Ferré, N.M. Faber, F.X. Rius, *Anal. Chim. Acta* 451 (2002) 313.
- [32] MATLAB 5.3, The Math Works Inc, Natick, Massachusetts, USA, 1999.
- [33] N.M. Faber, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 50 (2000) 107.
- [34] D.M. Haaland, E.V. Thomas, *Anal. Chem.* 60 (1998) 1193.
- [35] A.G. González, M.A. Herrador, A.G. Asuero, *Talanta* 52 (1999) 727.