



Universidad Nacional de Rosario



Facultad de Ciencias
Bioquímicas y Farmacéuticas

Tesis de Doctorado en Ciencias Químicas

***“Desarrollo de métodos analíticos luminiscentes en
combinación con métodos quimiométricos. Aplicaciones
alimenticias y biomédicas”***

Presentada por Valeria Antonella Lozano

Director: Dr. Alejandro C. Olivieri
Co-Directora: Dra. Gabriela A. Ibañez

Rosario, Argentina

- 2010 -

***“Desarrollo de métodos analíticos luminiscentes en combinación
con métodos quimiométricos. Aplicaciones alimenticias y
biomédicas”***

Valeria Antonella Lozano

Licenciada en Química

Universidad Nacional de La Pampa

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el Instituto de Química Rosario, en el Departamento de Química Analítica, dependiente de la Facultad de Cs. Bioquímicas y Farmacéuticas, durante el período comprendido entre Abril de 2007 y Noviembre de 2010, bajo la dirección del Dr. Alejandro C. Olivieri y la co-dirección de la Dra. Gabriela A. Ibañez.

AGRADECIMIENTOS

Deseo mostrar mi más sincero agradecimiento a las personas sin las cuales, este trabajo no habría visto la luz:

- Mi Director, Dr. Alejandro Olivieri. Para mi es un honor haber realizado este trabajo bajo su dirección y le estaré siempre muy agradecida porque ha dedicado su valioso tiempo a ello.

- Mi Co-Directora, Dra. Gabriela Ibañez. Por todo lo que me ha enseñado, por su constante y paciente seguimiento durante el transcurso de la tesis.

También quiero hacer llegar mis agradecimientos a:

- Mis padres Juan Alberto y Silvia, a mi abuela Elsa, a mis hermanos Fernanda y Ramiro, porque a pesar de la distancia, el ánimo, apoyo y alegría que me brindan me dan la fortaleza necesaria para seguir adelante.

- Martín, por su amor incondicional y estímulo permanente.

- Ivana, Agostina y Carina, por su amistad que existe más allá del tiempo y la distancia.

- Mis compañeros, en especial a Soledad Belluzo, por los momentos compartidos y sobre todo, por su valiosa amistad.

- La MSc. María Susana Boeris, por todas las enseñanzas y por ser la persona que me mostró el inicio de este camino.

En general quisiera agradecer a todas y cada una de las personas que han vivido conmigo la realización de esta tesis doctoral. Desde lo más profundo de mi corazón les agradezco el haberme brindado todo el apoyo, colaboración, ánimo y sobre todo cariño y amistad.

El presente trabajo de tesis dio lugar a las siguientes publicaciones científicas:

- LOZANO V. A., IBAÑEZ G. A., OLIVIERI A. C. (2008) Three-way partial least-squares/residual bilinearization study of second-order lanthanide-sensitized luminescence excitation-time decay data. Analysis of benzoic acid en beverage samples. *Anal. Chim. Acta* 610, 186-195.

- CULZONI M. J., GOICOECHEA H. C., IBAÑEZ G. A., LOZANO V. A., MARSILI N. R., OLIVIERI A. C., PAGANI A. P. (2008) Second-order advantage from kinetic-spectroscopic data matrices in the presence of extreme spectral overlapping. A multivariate curve resolution - Alternating least-squares approach. *Anal. Chim. Acta* 614, 46-57.

- LOZANO V.A., TAULER R., IBAÑEZ G.A., OLIVIERI A.C. (2009) Standard addition analysis of fluoroquinolones in human serum in the presence of the interferent salicylate using lanthanide-sensitized excitation-time decay luminescence data, multivariate curve resolution. *Talanta* 77, 1715-1723.

- LOZANO V.A., IBAÑEZ G.A., OLIVIERI A.C. (2009) A novel second-order standard addition analytical method based on data processing with multidimensional partial least squares and residual bilinearization. *Anal. Chim. Acta* 651, 165-172.

- LOZANO V.A., IBAÑEZ G.A., OLIVIERI A.C. (2010) Second-order analyte quantitation under identical profiles in one data dimension. A dependency-adapted partial least squares/residual bilinearization method. *Anal. Chem.* 82, 4510-4519.

También se presentó en los siguientes congresos científicos:

- García-Reiriz A., Olivieri A., Ibañez G., Damiani P., Lozano V. Cuadrados mínimos parciales multidimensionales en sistemas luminiscentes con N-linealización residual. 14º Encuentro Nacional de Química Analítica. Joao Pessoa, Brasil. Noviembre de 2007.

- Olivieri A., Lozano V., Ibañez G., Tauler R. Análisis of lanthanide-sensitized excitation-time decay luminescence data matrices for the determination of fluoroquinolones in human serum. Standard addition method and achievement of the second-order advantage. XIII International Symposium on Luminescence Spectrometry. Bologna, Italia. Septiembre de 2008.

- Lozano V., Pagani A., Ibañez G., Olivieri A. Aplicación de resolución multivariada de curvas-cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS) a la resolución de problemas analíticos con datos matriciales con solapamiento extremo en una dimensión. V Congreso Argentino de Química Analítica. Bahía Blanca, Buenos Aires, Argentina. Noviembre de 2009.

- Olivieri A., Lozano V., Ibañez G., Muñoz de la Peña A. New second-order luminescent signals for analyte quantitation in the presence of interferents: time-decay sensitized lanthanide excitation and time-evolving chemiluminescence. XIV International Symposium on Luminescence Spectrometry. Praga, República Checa. Julio de 2010.

ÍNDICE

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS	VI
LENGUAJE ESPECIAL	VIII
INTRODUCCIÓN	
La calibración multivariada.....	1
Conceptos básicos.....	1
Datos trilineales y no-trilineales.....	3
Adición de patrón.....	8
Métodos luminiscentes.....	10
Fluorescencia y fosforescencia.....	11
Diagramas de niveles de energía para procesos fotoluminiscentes.....	12
Quimioluminiscencia.....	15
Mecanismos de las reacciones de quimioluminiscencia.....	15
Requisitos de la emisión de quimioluminiscencia.....	17
Factores que influyen en la emisión de quimioluminiscencia.....	17
Características de la quimioluminiscencia como técnica analítica.....	18
Reacciones de quimioluminiscencia en fase líquida.....	19
Oxidaciones directas.....	19
Tris (2,2'-bipiridil) dicloro-rutenio (II).....	19
Instrumentación básica.....	20
Luminiscencia sensibilizada de lantánidos.....	21
Factores que afectan a la intensidad de luminiscencia sensibilizada de lantánidos.....	23
Analitos químicos estudiados.....	25
Ácido benzoico.....	25
Sacarina.....	25
Levodopa y carbidopa.....	26
Ácido salicílico.....	27
Naproxeno.....	27

Fluoroquinolonas.....	28
-----------------------	----

OBJETIVOS

Objetivos generales.....	30
Objetivos particulares.....	30

MATERIALES Y METODOS

Equipamiento analítico.....	32
Reactivos.....	32
Metodología.....	34
Determinación de ácido benzoico en presencia de sacarina en jugos de frutas.....	34
Condiciones de optimización de la señal luminiscente.....	35
Muestras de calibración, validación y reales.....	36
Procedimiento analítico para HPLC.....	37
Sistema modelo de datos de segundo orden con solapamiento extremo en una de las dimensiones. Determinación de carbidopa en presencia de levodopa.....	38
Datos simulados.....	38
Datos experimentales.....	40
Muestras de calibración y validación.....	40
Sistemas modelo de datos de segundo orden que requieren de adición de patrón. Evaluación de diferentes algoritmos.....	41
Datos simulados.....	41
Datos experimentales.....	43
Determinación de salicilato en presencia de naproxeno en suero.....	43
Determinación de danofloxacina en presencia de salicilato en suero.....	44

Aplicación de algoritmos de segundo orden a datos que requieren de adición de patrón y presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones. Determinación de fluoroquinolonas en suero en presencia de salicilato como interferente.....	45
Datos simulados.....	45
Datos experimentales.....	46
Optimización de la señal luminiscente.....	47
Muestras de suero.....	47
Un nuevo procedimiento de RBL para datos con dependencia lineal. Determinación de ciprofloxacina en orina y suero.....	49
Datos simulados.....	49
Datos experimentales.....	51
Determinación de ciprofloxacina en orina a partir de señales quimioluminiscentes.....	51
Selección del sistema quimioluminiscente.....	51
Muestras de orina.....	52
Determinación de ciprofloxacina en suero a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos.....	53
Algoritmos quimiométricos.....	53
Análisis paralelo de factores (PARAFAC).....	53
PARAFAC para sistemas con dependencia lineal (PARALIND).....	55
Cuadrados mínimos parciales desdoblados acoplados a la bilinealización residual (U-PLS/RBL).....	56
Cuadrados mínimos parciales multidimensional acoplados a la bilinealización residual (N-PLS/RBL).....	58
Resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS).....	59
U-PLS/RBL modificado para incluir dependencia lineal (U-PLS/RBL-LD).....	62
RBL-LD usando MCR-ALS.....	62
RBL-LD usando PARALIND.....	66
Algoritmos de segundo orden con adición de patrón.....	67
Software.....	70

RESULTADOS

Resumen de los sistemas estudiados.....	71
Resultados y discusión de los sistemas estudiados.....	73
Determinación de ácido benzoico en presencia de sacarina en jugos de frutas.....	73
Condiciones de optimización de la señal luminiscente.....	73
Perfiles espectrales y tiempos de decaimiento.....	74
Análisis multivariado de segundo orden.....	77
Muestras de calibración y validación.....	77
Muestras reales.....	83
Sistema modelo de datos de segundo orden con solapamiento extremo en una de las dimensiones. Determinación de carbidopa en presencia de levodopa.....	85
Datos simulados.....	86
Datos experimentales.....	88
Sistemas modelo de datos de segundo orden que requieren de adición de patrón. Evaluación de diferentes algoritmos.....	92
Datos simulados.....	92
Datos experimentales.....	97
Determinación de salicilato en presencia de naproxeno en suero.....	97
Determinación de danofloxacina en presencia de salicilato en suero.....	100
Aplicación de algoritmos de segundo orden a datos que requieren de adición de patrón y presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones. Determinación de fluoroquinolonas en suero en presencia de salicilato como interferente	103
Datos simulados.....	104
Análisis de rango.....	104
Resultados de predicción.....	106
Datos experimentales.....	108
Optimización de la señal luminiscente.....	108

La necesidad de la adición de patrón.....	109
Perfiles espectrales y tiempos de decaimiento.....	110
Resultados de predicción.....	112
Un nuevo procedimiento de RBL para datos con dependencia lineal. Determinación de ciprofloxacina en orina y suero.....	119
Datos simulados.....	120
Datos experimentales.....	123
Determinación de ciprofloxacina en orina a partir de señales quimioluminiscentes.....	123
Selección del sistema quimioluminiscente.....	124
Perfiles espectrales y tiempos de reacción.....	125
Resultados de predicción.....	126
Determinación de ciprofloxacina en suero a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos.....	130
CONCLUSIONES.....	135
RESUMEN.....	137
BIBLIOGRAFÍA.....	142

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

ALS: cuadrados mínimos alternantes

APTLD: descomposición trilineal alternante penalizada

ATLD: descomposición trilineal alternante

BLLS: cuadrados mínimos bilineales

DTLD: descomposición trilineal directa

EJCR: elipse de confianza conjunta

GRAM: aniquilación generalizada de rango

GSAM: método generalizado de adición de patrón

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

LSETD: luminiscencia sensibilizada de lantánidos en función de la excitación y los tiempos de decaimiento

MCR: resolución multivariada de curvas

MKL parámetro de selectividad definido por Messick, Kalivas y Lang

MVC1: calibración multivariada de primer orden

MVC2: calibración multivariada de segundo orden

N-PLS: cuadrados mínimos parciales multi-vía

PARAFAC: análisis paralelo de factores

PARAFAC2: PARAFAC que permite variaciones de perfiles

PARALIND: PARAFAC para sistemas con dependencia lineal

PCA: análisis de componentes principales

PCs: componentes principales

PRESS: sumatoria de errores cuadrados de la predicción

RBL: bilinealización residual

RBL-LD: RBL para sistemas con dependencia lineal

REP%: error relativo de predicción

RMSE: raíz cuadrada del error medio

RSSE: sumatoria de los errores residuales al cuadrado

RTL: variante tridimensional de RBL

S₁₂: grado de solapamiento espectral entre los componentes 1 y 2

SDS: dodecil sulfato de sodio

SVD: descomposición de valores singulares

SWATLD: descomposición trilineal alternante auto-ponderada

TOPO: óxido de trioctilfosfina

TRIS: tris (hidroximetil) amino metano

UA: unidades arbitrarias

U-PLS: cuadrados mínimos parciales desdoblados

LENGUAJE ESPECIAL

Box and Whisker: caja y bigotes

Core consistency: consistencia del núcleo

Delay time: tiempo de espera

Gate time: tiempo de adquisición

Kernel: núcleo

Loadings: vectores de carga

Outliers: valores atípicos

Purest: variables más puras

Scores: puntuaciones

INTRODUCCIÓN

CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

CONCEPTOS BÁSICOS

En química analítica se pueden utilizar datos de diferentes estructuras dimensionales para realizar una calibración (Figura 1), es decir datos puntuales o de orden cero, datos vectoriales o de orden uno y datos matriciales o de orden dos. Existen muy pocos trabajos que emplean datos de orden superior a dos, que no serán discutidos en esta Tesis.

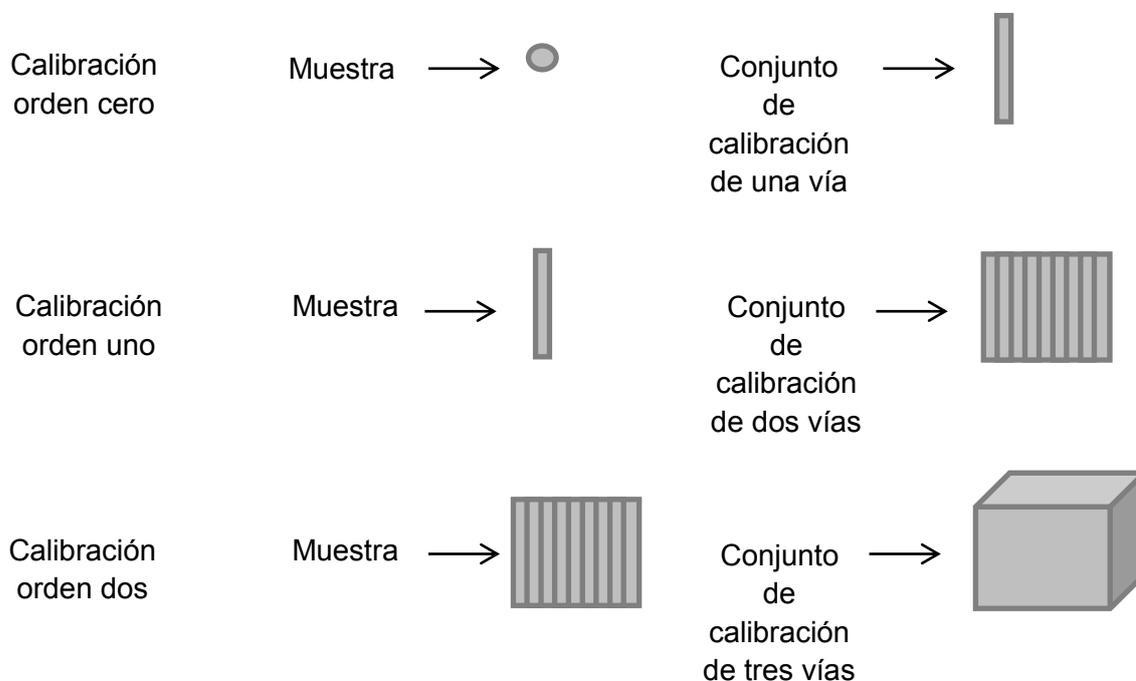


Figura 1. Representación esquemática de la estructura de los datos de la muestra y del conjunto de calibración según el orden.

Cuando se utilizan datos de orden cero, sólo se puede determinar un analito. En cambio, al utilizar datos de orden uno, se pueden determinar varios analitos a la vez. Además, con este tipo de datos es posible detectar la presencia de interferentes no modelados en la calibración y clasificar a la muestra como un *outliers*, esto es lo que se conoce como ventaja de primer orden; aunque en estas condiciones no es posible realizar una cuantificación. Al emplear datos de orden dos, se obtiene la denominada ventaja de segundo orden, que permite la

cuantificación del analito en presencia de interferentes presentes en la muestra y que no han sido modelados en la etapa de calibración.¹

La calibración multivariada de segundo orden consta de dos etapas. En la primera se analizan los datos experimentales, separando las señales de los diferentes analitos y las de los interferentes gracias a la ventaja de segundo orden; de esta manera se obtiene información acerca de las concentraciones, que usualmente queda incluida en el llamado vector de *scores*. Luego, en la etapa de calibración, los *scores* obtenidos anteriormente se relacionan con las concentraciones nominales de los analitos de las muestras de calibración, esto permite la predicción de las concentraciones de los analitos en la muestra incógnita. Para procesar datos de segundo orden se puede utilizar una gran variedad de algoritmos.²⁻⁴ Los algoritmos que presentan la ventaja de segundo orden se pueden clasificar, dependiendo de su fundamento, de la siguiente manera:

1) Modelos basados en un ajuste por cuadrados mínimos alternantes (ALS): análisis paralelo de factores (PARAFAC),⁵ así como algunas de sus variantes tales como PARAFAC2 (que permite variaciones de perfiles en una de las dimensiones entre muestra y muestra)⁶ y PARALIND (PARAFAC para sistemas con dependencia lineal);⁷ varias versiones de la descomposición trilineal alternante (ATLD)⁸ tales como ATLD auto-ponderada (SWATLD)⁹ y ATLD alternante penalizada (APTLT);¹⁰ y la resolución multivariada de curvas acoplada a ALS (MCR-ALS).¹¹

2) Modelos basados en cuadrados mínimos directos, como la regresión en cuadrados mínimos bilineales (BLLS) combinada con bilinealización residual (RBL)^{12,13} y su extensión a sistemas con dependencia lineal.¹⁴

3) Modelos de autovectores y autovalores: la aniquilación generalizada de rango (GRAM)¹⁵ y la descomposición trilineal directa (DTLD).¹⁶

4) Modelos basados en el uso de variables latentes para el calibrado, como la regresión en cuadrados mínimos parciales desdoblados (U-PLS),¹⁷ multi-vía (N-PLS)¹⁸ y no-lineales (*kernel*-PLS);¹⁹ y las redes neuronales artificiales.²⁰ En estos casos la ventaja de segundo orden se obtiene siempre y cuando se los combine con RBL.²¹⁻²⁵

DATOS TRILINEALES Y NO-TRILINEALES

Cuando se procesan datos de segundo orden para un conjunto de muestras, es importante determinar si el arreglo tridimensional formado por dichos datos cumple o no con la llamada condición de trilinealidad, es decir que los analitos presenten comportamiento lineal y espectros pocos solapados en todas las dimensiones.

Cuando los datos son trilineales, pueden aplicarse los modelos trilineales PARAFAC, ATLD, GRAM y DTLD. Estos modelos son muy convenientes porque con frecuencia poseen la propiedad de unicidad, la cual implica que conducen al conocimiento de los perfiles espectrales, temporales o de otra naturaleza para cada componente puro de la muestra. Habitualmente estos perfiles son físicamente interpretables, ya que corresponden a espectros, cromatogramas o cinéticas de componentes puros, dependiendo del tipo de datos de segundo orden que se registren. Una vez descompuesto el arreglo multidimensional de datos, los valores de los *scores* se emplean para la predicción de la concentración del analito de interés mediante una recta de calibrado pseudo-univariada, seleccionando aquellos *scores* que son específicos para un dado analito. Esto permite aislar matemáticamente la contribución de dicho analito a la señal total, y por lo tanto lograr la ventaja de segundo orden.

Cuando el conjunto de datos se desvía de la condición de trilinealidad, deben emplearse algoritmos alternativos a los trilineales. La selección del algoritmo adecuado depende, a su vez, de la causa que provoca la pérdida de la trilinealidad. Se enumeran a continuación posibles causas de desvío de la trilinealidad:

- 1) Existe una relación no lineal entre la señal medida y la concentración del analito.
- 2) La estructura intrínseca de los datos no es trilineal.
- 3) Los perfiles de pH o tiempo de los componentes son poco reproducibles entre muestra y muestra.
- 4) En espectroscopía de luminiscencia se presenta el fenómeno de filtro interno.
- 5) Hay dependencia lineal entre perfiles.

6) Existe un solapamiento total (o muy alto) en una de las dimensiones de los datos.

A continuación se presentará una breve discusión de estos casos, con énfasis particular en el ítem número 6), que es el estudiado en profundidad en esta tesis.

Cuando la relación entre señal medida y concentración del analito es no-lineal, existen varios procedimientos posibles. Uno de ellos consiste en aplicar PARAFAC o alguna de sus variantes, lo que llevará a una curva de calibrado no-lineal (debido a que la no-linealidad se transmitirá a la relación entre *scores* y concentración, que es la que da lugar a la curva de calibrado). Si se puede encontrar una expresión no-lineal apropiada, por ejemplo, un polinomio, para modelar esta última relación, puede calibrarse y predecirse la concentración del analito mediante la curva de calibración ajustada con dicha expresión. Este recurso fue empleado, por ejemplo, para la determinación de malonaldehído en aceites de oliva, en presencia de la señal de fondo del propio aceite, procesando datos de tercer orden (evolución temporal de matrices de excitación-emisión de fluorescencia durante la reacción del analito con dimetilamina).²⁶ La curva de calibrado de *scores* de PARAFAC en función de la concentración de malonaldehído pudo modelarse apropiadamente mediante un polinomio de segundo grado. Estos datos también se procesaron a través de redes neuronales artificiales acopladas a RTL (variante tridimensional de RBL), con resultados analíticos similares.²⁶ Finalmente, datos de segundo orden para la misma reacción (en forma de matrices de excitación-emisión a tiempo fijo) se procesaron recientemente mediante un modelo de PLS no lineal (*kernel*-PLS) combinado con RBL.²⁵ Los modelos basados en redes neuronales o en proyecciones de tipo *kernel* son más flexibles que los que emplean expresiones simples para ajustar la curva de respuesta-concentración. Estos constituyen aproximadores universales no-lineales, útiles cuando no es posible encontrar una ecuación que modele la no-linealidad presente en el sistema.

Otra causa común de desvío de la trilinealidad es la violación del requerimiento de iguales perfiles en ambas dimensiones y en todas las muestras para un dado componente. Esta situación se da en los puntos 2), 3) y 4) listados anteriormente, y se discutirán a continuación. Datos con estructura intrínseca no trilineal son, por ejemplo, las matrices de espectrometría de masa bidimensional,

conocidas como matrices MS-MS. La causa de este fenómeno es que los espectros de masa de los fragmentos (obtenidos en la segunda de las dimensiones MS) dependen de la posición del fragmento en el espectro de masa del compuesto original (obtenido en la primera dimensión). De esta manera, un dado componente posee varios perfiles diferentes en una de las dimensiones, violando el principio expresado anteriormente. Para procesar este tipo de datos se requieren algoritmos con estructura más flexible que la trilineal, tales como U-PLS o N-PLS. Un ejemplo apropiado es la determinación simultánea de los tres isómeros 2-, 3- y 4-etil piridina mediante datos MS-MS procesados con U-PLS y N-PLS.²⁷ En cuanto a la obtención de la ventaja de segundo orden, no parece haber antecedentes en la literatura respecto del empleo de RBL combinada con U- o N-PLS para procesar este tipo de datos.

En experimentos en los que una de las dimensiones es un gradiente de pH o el tiempo de reacción de una cinética, los perfiles de pH o temporales pueden variar de muestra en muestra debido a una variedad de razones: irreproducibilidad en la generación de gradientes de pH, variaciones de temperatura entre muestras, etc. Esto conduce a la pérdida de la trilinealidad, que puede en principio modelarse mediante algoritmos que permiten que un componente dado posea perfiles distintos en una de las dimensiones en diferentes muestras, tales como MCR-ALS y PARAFAC2.

Una causa similar de pérdida de trilinealidad puede presentarse en datos de cromatografía líquida con detección a múltiples longitudes de onda (ya sea con un detector de arreglo de diodos o un espectrofluorímetro de barrido rápido). La falta de reproducibilidad en los tiempos de retención de los analitos es la causa de dicha pérdida. En este caso, también puede solucionarse el problema analítico aplicando MCR-ALS o PARAFAC2.²⁸ Una alternativa para el procesamiento de datos bidimensionales de origen cromatográfico es alinear previamente los cromatogramas en la dimensión temporal, restaurando la trilinealidad perdida, y aplicar luego algoritmos trilineales o variantes de PLS/RBL.²⁹

En la espectroscopía de luminiscencia puede presentarse el fenómeno de filtro interno cuando un componente de la muestra absorbe de manera significativa radiación de la fuente del espectrofluorímetro o de la emisión de otros compuestos presente en la muestra. En estos casos, pueden producirse variaciones en la forma de los espectros de excitación y/o emisión, además de

cambios en la intensidad de emisión. Cuando dichos cambios tienen lugar en ambas dimensiones, un conjunto tridimensional de matrices de excitación-emisión de luminiscencia dejará de ser trilineal. En estos casos MCR-ALS no puede aplicarse, ya que este último algoritmo únicamente puede tener en cuenta cambios de los perfiles en sólo una de las dimensiones. En estas situaciones solamente U-PLS (y presumiblemente también N-PLS) puede aplicarse, como ha sido demostrado recientemente frente a mezclas de hidrocarburos policíclicos aromáticos.³⁰

La dependencia lineal entre perfiles plantea desafíos especiales a los algoritmos trilineales, y en ocasiones se considera como una causa adicional de pérdida de la trilinealidad. Esta se da cuando dos o más componentes de una muestra obedecen a una relación de clausura en una muestra, lo que implica que están correlacionados entre sí. Por ejemplo, si dos especies son componentes de un par ácido-base conjugado, o son el reactivo y producto de una reacción química, la suma de sus concentraciones será constante en la dimensión correspondiente (pH o tiempo respectivamente). Estos perfiles correlacionados se conocen como linealmente dependientes. En estos casos, cada uno de los componentes por separado cumple con la condición de trilinealidad, pero se pierde la propiedad de unicidad del modelo trilineal. Como resultado, PARAFAC (y eventualmente otros modelos trilineales) presentan el problema de multiplicidad en los mínimos del ajuste de cuadrados mínimos (algunas soluciones no tendrán significado físico). Para resolver este inconveniente, PARAFAC debe someterse a las siguientes restricciones: 1) inicializar el algoritmo con valores lo más próximos posibles al mínimo global y 2) forzar los elementos de los *scores* y *loadings* a cumplir condiciones de no-negatividad (si se trata de perfiles que deben ser no-negativos). Otra alternativa es el empleo de la variante PARALIND, que opera de un modo similar a PARAFAC, pero incorporando en el modelo la dependencia lineal entre perfiles. También puede aplicarse en estos casos el modelo MCR-ALS, que normalmente incorpora condiciones de inicialización y restricciones del tipo discutido. Los modelos flexibles basados en PLS/RBL son aún más convenientes, ya que pueden aplicarse sin modificaciones al algoritmo original. Ejemplos apropiados son las determinaciones de antibióticos en muestras de orina, en las que se logró la ventaja de segundo orden en presencia de la señal

fluorescente de fondo del fluido biológico, procesando mediante U-PLS/RBL datos cinéticos³¹ y de gradiente de pH.³²

Finalmente, el problema ocasionado por el alto (o total) solapamiento de perfiles en una de las dimensiones es el analizado en detalle en la presente Tesis Doctoral. Este es un caso especial de dependencia lineal, en el que los perfiles espectrales o temporales de dos o más componentes son prácticamente idénticos en todas las muestras, haciendo que la selectividad en la dimensión afectada por el fenómeno descienda a prácticamente cero. Experimentalmente, esta situación puede presentarse cuando se utiliza una reacción química para generar un único producto que da señal a partir de varios analitos. Si bien las cinéticas de reacción pueden diferir de un analito a otro, los espectros del producto común serán idénticos. Otro caso importante a considerar es el de las señales de luminiscencia de iones complejos formados por un ión lantánido y diversos componentes de la muestra. Dado que la emisión de radiación proviene del lantánido, los espectros de excitación pueden ser diferentes, ya que dependen del componente complejado, pero los de emisión serán idénticos, y los tiempos de decaimiento serán, en general, muy similares.

Vale la pena distinguir dos casos principales de este tipo de solapamiento extremo en una dimensión: 1) cuando se da entre analitos calibrados, y 2) cuando se presenta entre un analito calibrado y un interferente. El primero de estos casos puede ser resuelto convenientemente por los algoritmos U-PLS/RBL y N-PLS/RBL, aprovechando la selectividad en una de las dimensiones de los datos para distinguir entre analitos. Sin embargo, en el segundo caso PLS/RBL fallará, dado que la técnica RBL es incapaz de distinguir entre analito e interferente. Este segundo caso es, sin embargo, el más interesante desde el punto de vista analítico, ya que constituye el campo de acción de la ventaja de segundo orden, uno de los objetivos centrales de esta Tesis. Entre los algoritmos capaces de lograr la ventaja de segundo orden, los dos únicos que pueden resolver este interesante problema son MCR-ALS y PARALIND. El modelo MCR-ALS lo consigue descomponiendo una matriz de datos aumentada en lugar de las matrices originales. La matriz aumentada se construye ubicando matrices de diferentes muestras en forma adyacente una a otra, de modo que la dimensión de aumento sea la afectada por la dependencia lineal. El resultado es que la selectividad nula o casi nula en la dimensión afectada se recupera en la

dimensión de aumento. En el modelo PARALIND, la dependencia lineal está incorporada dentro de la estructura de PARAFAC, permitiendo que algunos componentes tengan perfiles idénticos en una dimensión pero diferentes en otra.

Todas las causas anteriores de desvío de la trilinealidad y las correspondientes soluciones se resumen en la Tabla 1. Hasta el momento, el único caso que según lo informado en la literatura no podría ser apropiadamente resuelto por U-PLS/RBL es la última causa de la Tabla 1, es decir perfiles idénticos del analito y del interferente. Sin embargo, en esta Tesis se presentará un modelo U-PLS/RBL modificado, en el que el procedimiento de RBL se aplica basándose en PARALIND o en MCR-ALS, pudiendo ser empleados como alternativa para la resolución de estos casos complejos.

Tabla 1. Causas de desvío de la trilinealidad y alternativas para el procesamiento de los datos.

Causa	Algoritmos trilineales	Algoritmos no trilineales
Falta de reproducibilidad en tiempos de retención cromatográficos	Aplicables luego de alinear los tiempos con algoritmos adecuados	MCR-ALS PARAFAC2 PLS/RBL
Dependencia lineal entre perfiles de los componentes	Aplicable con inicialización y restricciones adecuadas	MCR-ALS PARALIND PLS/RBL
Filtro interno en espectroscopía de luminiscencia	No aplicable	PLS/RBL
Perfiles idénticos para el analito y el interferente	No aplicable	MCR-ALS PARALIND

ADICIÓN DE PATRÓN

La calibración con adición de patrón se utiliza para compensar los efectos de fondo de una muestra, que usualmente producen cambios en la respuesta del analito ocasionados por interacciones con él, por ejemplo, un cambio en la pendiente de la relación de la señal univariada con la concentración. La adición de patrón univariada está diseñada para corregir este fenómeno.³³ Sin embargo,

comúnmente una señal interferente del fondo puede solaparse con la del analito. Este problema se resuelve con adición de patrón univariada sólo cuando la respuesta del fondo surge de los tratamientos químicos realizados a la muestra y no de la muestra en si misma. Este inconveniente se puede corregir adecuadamente, por ejemplo, llevando a cabo dos adiciones de patrón sobre diferentes cantidades de muestra o combinando adición de patrón con la calibración de Youden.³⁴ No obstante, estos dos últimos tipos de calibración no son los más habitualmente usados y no incluyen el análisis de muestras naturales o biológicas que contienen componentes que dan señales o respuestas diferentes a la del analito. La señal de fondo que proviene de las respuestas de componentes diferentes a la del analito constituye una interferencia en el análisis univariado que no puede ser corregida por medio de adición de patrón.

En el campo de la calibración multivariada de primer orden está disponible el método generalizado de adición de patrón (GSAM),^{35,36} el cual implica mediciones de datos de primer orden, por ejemplo, espectros para varios analitos solapados, en presencia de la respuesta del fondo de la muestra. La adición de patrón generalizada no sólo demanda del conocimiento del número y de la identidad de los analitos, sino que también que los patrones de cada uno de ellos estén disponibles, de manera de poder agregarlos en concentraciones perfectamente conocidas a cada muestra. Las limitaciones de este método respecto de la señal de fondo son análogas a las del método de adición de patrón univariada.

La presencia de una matriz que presenta señal y que también afecta a la respuesta del analito en la muestra (por ejemplo, a través de efectos de filtro interno o por interacciones entre el analito y el fondo, tales como formación de complejos o asociaciones con proteínas) requiere de adición de patrón de segundo orden para cuantificar al analito.² Este problema analítico puede ser también resuelto con calibración externa de segundo orden en presencia de la matriz, lo que es posible agregando el analito a esta última.²³ Sin embargo, este procedimiento no es siempre factible experimentalmente.

En la literatura sólo existen unas pocas referencias sobre este interesante campo de la adición de patrón multivariada.^{7,37-39} El algoritmo frecuentemente elegido para obtener la ventaja de segundo orden a partir de datos de adición de patrón es PARAFAC,⁵ aunque en una publicación reciente se recomienda el uso

de PARALIND.⁷ Cuando aparece más de un interferente en la muestra incógnita, se produce dependencia lineal en los datos de adición de patrón. En situaciones donde se presentan serios solapamientos en una de las dimensiones de los datos, PARAFAC con adición de patrón no puede ser utilizado; en tal caso se puede aplicar MCR-ALS⁴⁰ para obtener resultados satisfactorios. La dependencia lineal es un fenómeno general, que no sólo está presente en los datos de adición de patrón sino también en experimentos de gradientes de pH⁴⁰ o de espectros modulados cinéticamente, como fue mencionado anteriormente.^{41,42}

Recientemente se ha puesto atención sobre algoritmos de calibración multivariada de segundo orden basados en poderosas metodologías de estructuras latentes, que pueden también obtener la ventaja de segundo orden. Entre ellos podemos mencionar U-PLS/RBL²² y N-PLS/RBL. A pesar de que los métodos de PLS son más flexibles y proveen mejores cifras de méritos que los demás algoritmos,^{23,30,31,43,44} estos no pueden ser aplicados directamente en el modo de adición de patrón, debido a que PLS incluye un paso de calibración en el cual se requieren las concentraciones nominales del analito, las que no están disponibles ni para la muestra incógnita ni para las obtenidas después de adicionar el patrón. Sin embargo, en esta Tesis se describirá una metodología que permite aplicar U-PLS/RBL y N-PLS/RBL a datos obtenidos mediante adición de patrón.

MÉTODOS LUMINISCENTES

Se conocen diversos métodos luminiscentes, entre los que sobresalen, por su interés analítico, fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia. En todos ellos, las moléculas de analito son excitadas, dando una especie cuyo espectro de emisión suministra información para el análisis cualitativo y cuantitativo.

La medida de la intensidad luminiscente permite la determinación cuantitativa de una variedad importante de especies inorgánicas y orgánicas a nivel de vestigios. Actualmente, el número de métodos fluorimétricos es significativamente mayor que el número de aplicaciones basadas en fosforescencia y de quimioluminiscencia.

Uno de los aspectos más atractivos de la luminiscencia es su sensibilidad, con límites de detección que son a menudo tres órdenes de magnitud más pequeños que los encontrados en espectroscopía de absorción, del orden de partes por billón. Finalmente, la selectividad de los procedimientos de luminiscencia es a menudo mejor que la de los métodos de absorción. Sin embargo, los métodos de luminiscencia son menos aplicables que los de absorción debido al número relativamente limitado de sistemas químicos que pueden producir luminiscencia.⁴⁵

Recientemente se ha puesto interés en una técnica luminiscente que implica el uso de iones lantánidos (III). Estos iones forman quelatos con propiedades luminiscentes especiales en solución, como resultado de un proceso de transferencia de energía del estado triplete excitado del ligando al nivel de emisión de los iones lantánidos (III). Este tipo de luminiscencia sensibilizada de lantánidos es un proceso rápido que no es controlado por difusión, debido a que el ión lantánido (III) se combina con el ligando (donor) a través de un proceso de coordinación.⁴⁶

FLUORESCENCIA Y FOSFORESCENCIA

La fluorescencia y la fosforescencia tienen en común que la excitación tiene lugar por absorción de fotones. En consecuencia, los dos fenómenos a menudo se conocen por el término más general de fotoluminiscencia.

El principio de exclusión de Pauli postula que en un átomo no puede haber dos electrones con los cuatro números cuánticos iguales. De esta manera, no puede haber más de dos electrones en un orbital y éstos deben estar apareados, es decir, tener sus espines opuestos. Un estado electrónico molecular en el cual todos los espines de los electrones están apareados se llama estado singlete, y se simboliza por S. Cuando uno de los electrones de una molécula es excitado a un nivel de energía superior, se forma un nuevo estado singlete excitado (en donde el espín del electrón continúa apareado con el electrón no excitado). Luego puede ocurrir una transición que supone un cambio en el estado electrónico, llevando a que los espines de los dos electrones estén desapareados. Esta transición se llama singlete-triplete, ya que el estado final triplete (T) que se

obtiene tiene tres orientaciones en un campo magnético. La transición singlete/triplete es un hecho significativamente menos probable que la correspondiente transición singlete/singlete.

La fluorescencia difiere de la fosforescencia en que las transiciones electrónicas responsables de la fluorescencia no implican un cambio en el espín del electrón. Como consecuencia, la fluorescencia tiene una vida más corta, cesando la luminiscencia casi inmediatamente (10^{-8} - 10^{-5} s). Por el contrario, las emisiones de fosforescencia están acompañadas por un cambio en el espín del electrón, lo cual hace que la radiación tarde un tiempo fácilmente detectable después de haber acabado la irradiación, a menudo desde 10^{-4} hasta varios segundos o más. En la mayoría de los casos, tanto si se trata de fluorescencia como de fosforescencia, la emisión ocurre a una longitud de onda más larga que la de la radiación utilizada para la excitación.⁴⁵

Diagramas de niveles de energía para procesos fotoluminiscentes

En la Figura 2 se observa el diagrama de niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente característica. En este diagrama, la línea horizontal más baja representa el nivel de menor energía (S_0). Las líneas superiores, S_1 , S_2 y T_1 , representan el primer y segundo estado excitado singlete y triplete, respectivamente. La energía de un estado triplete es menor que la del correspondiente singlete excitado: $E_{T1} < E_{S1}$. Para que se produzca absorción de radiación, la energía del fotón excitante debe igualar a la diferencia de energía entre el estado fundamental y uno de los estados excitados singlete de la molécula absorbente.

Aunque el proceso de absorción de radiación es extremadamente rápido (en torno a 10^{-15} s), la secuencia de los procesos de desactivación suele ser más lenta. Así, el retorno al estado fundamental vía emisión luminiscente es uno de los procesos más lentos que se van a producir desde el estado electrónico excitado, requiriendo un tiempo de entre 10^{-9} - 10^{-2} s. Sin embargo, el equilibrio térmico se alcanza rápidamente y como consecuencia los electrones se encontrarán en el estado vibracional de mínima energía dentro del correspondiente estado

electrónico excitado. Por consiguiente, tanto la fluorescencia como la fosforescencia se producirán desde el estado vibracional más bajo del estado electrónico excitado, siendo éste un singlete para el primer fenómeno y un triplete para el segundo.^{47,48}

Una molécula excitada puede volver a su estado fundamental mediante una combinación de varias etapas mecánicas. Así, junto con las etapas fotoluminiscentes de desactivación que tienen lugar mediante la emisión de un fotón de radiación, pueden tener lugar diversos procesos que compiten con la desactivación por radiación. El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que minimiza el tiempo de vida media del estado excitado. Por ello, si la desactivación por fotoluminiscencia es más rápida que los procesos no radiantes, se observará tal emisión. Por el contrario, si la desactivación no radiante tiene una constante de velocidad más favorable, el fenómeno fotoluminiscente no se producirá o será poco intenso. Por lo tanto, resulta necesario conocer los caminos de desactivación no radiantes para intentar buscar aquellas condiciones en que éstos se lentifiquen hasta el punto en que la emisión luminiscente pueda competir cinéticamente con ellos. A continuación se describen brevemente los mecanismos de desactivación no radiante.

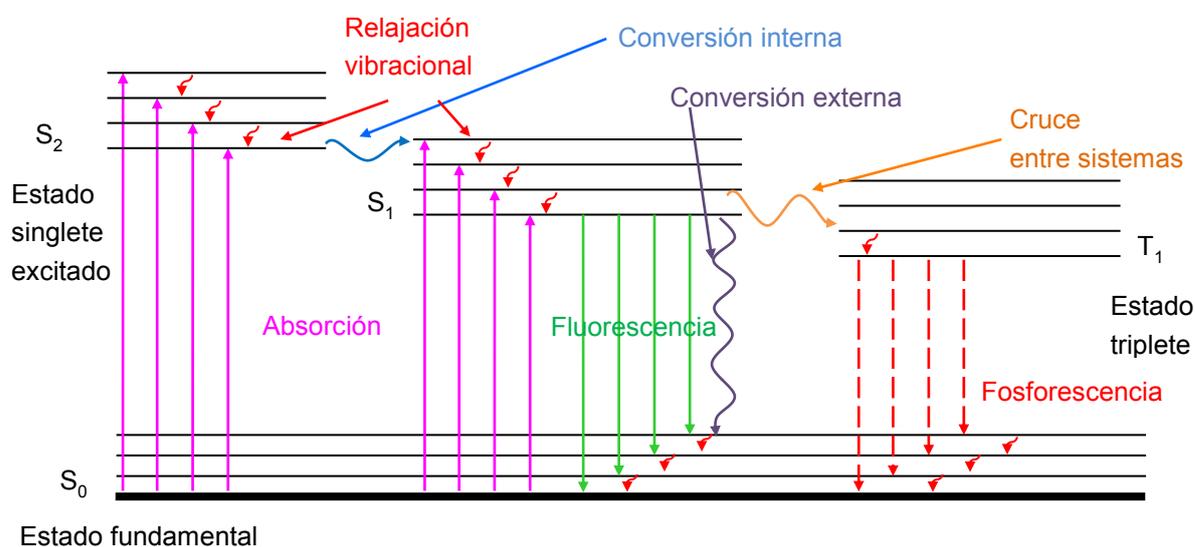


Figura 2. Diagrama de niveles de energía para procesos de fotoluminiscencia.

➤ **Relajación vibracional:** tiene lugar durante las colisiones entre moléculas excitadas y las moléculas del solvente. Durante estas colisiones, el exceso de

energía vibracional se transfiere a las moléculas del solvente y provoca un ligero aumento de la temperatura del entorno. La eficacia de este mecanismo es alta (10^{-15} s)⁴⁷ lo que hace que la luminiscencia siempre ocurra desde el estado vibracional más bajo del primer estado electrónico excitado.

➤ Conversión interna: transición entre estados electrónicos de la misma multiplicidad por acoplamiento vibracional. Como consecuencia, la molécula pasa de un estado electrónico superior S_2 a otro inmediatamente inferior, S_1 o bien de éste al estado electrónico fundamental S_0 . Es también un proceso muy eficaz (del orden de 10^{-12} s), especialmente cuando dos niveles de energía electrónicos están lo suficientemente cercanos para que se solapen los niveles de energía vibracional.⁴⁷

➤ Conversión externa: proceso de desactivación no radiante que se produce debido a la interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el solvente u otros solutos. Las transiciones no radiantes al estado fundamental desde estados excitados singlete y triplete más bajos incluyen, probablemente, conversiones internas al igual que conversiones externas.⁴⁵

➤ Cruce entre sistemas: transición desde el primer estado singlete excitado al primer triplete excitado ($S_1 \rightarrow T_1$) por cambio de multiplicidad debido a un acoplamiento vibracional. Es un proceso relativamente lento (10^{-8} - 10^{-7} s), y está prohibido por las reglas de la selección de la mecánica cuántica. Esto supone una probabilidad muy baja de ocurrencia, aunque no nula. El cruce entre sistemas se favorece cuando la diferencia de energía entre S_1 y T_1 es pequeña, cuando hay acoplamiento vibracional entre S_1 y T_1 y cuando hay átomos pesados en la molécula.

➤ Transferencia de energía: consiste en una transferencia de energía electrónica desde un estado excitado de un donador hasta un aceptor, por ejemplo apagado colisional, el cual es ocasionado por transferencia de energía entre donador y aceptor por colisión entre ambos o por la colisión entre moléculas excitadas. En ciertas ocasiones el aceptor puede producir luminiscencia, como es el caso de la luminiscencia sensibilizada, en la que un ligando excitado (donor) transfiere su energía a un ión metálico aceptor (por lo general un ión lantánido). Este tipo especial de luminiscencia será explicado con más detalles a continuación.

Ya que la fosforescencia constituye un proceso de emisión termodinámicamente prohibido por las reglas de selección, será un proceso con baja probabilidad, mucho más lento que la fluorescencia (donde no hay cambios de multiplicidad). De esta manera, los tiempos de vida en fosforescencia oscilan de μs a varios segundos. Además, las conversiones internas y externas compiten con tanto éxito con la fosforescencia que este tipo de emisión se observa normalmente sólo a bajas temperaturas,⁴⁵ en ausencia de oxígeno, medios altamente viscosos, presencia de átomos pesados⁴⁹ o en moléculas que están retenidas sobre superficies sólidas o en microentornos protectores (ciclodextrinas, micelas, etc.) donde los procesos no radiantes están minimizados o desactivados.

QUIMIOLUMINISCENCIA

La quimioluminiscencia es otro fenómeno luminiscente, que se define como la emisión de radiación electromagnética de una especie excitada que se forma en el curso de una reacción química.⁴⁵ Cuando esta emisión proviene de organismos vivos o sistemas derivados de ellos, se denomina bioluminiscencia.

Como la intensidad de emisión es función de la concentración de las especies químicas implicadas en la reacción de quimioluminiscencia, las medidas de la intensidad de emisión pueden emplearse con fines analíticos. Una ventaja de las técnicas quimioluminiscentes es que permiten emplear una instrumentación básica bastante sencilla, ya que el sistema óptico no requiere fuente externa de excitación; el flash de luz emitido es la señal que se produce tras la mezcla de los reactivos, alcanza un máximo y después cae hasta la línea de base. Este perfil de emisión frente al tiempo puede variar ampliamente en diferentes sistemas quimioluminiscentes, por lo que hay que extremar el cuidado para detectar la señal en este tipo de sistemas, midiendo en periodos de tiempo bien definidos.⁵⁰

Mecanismos de las reacciones de quimioluminiscencia

Una reacción quimioluminiscente puede generarse básicamente mediante dos mecanismos (Figura 3). En una reacción directa, dos reactivos, normalmente un sustrato y un oxidante en presencia de cofactores, reaccionan para formar un

producto o intermediario de la reacción, algunas veces en presencia de un catalizador. Después, parte del producto o intermediario pasa a un estado electrónicamente excitado, que puede a continuación relajarse hasta el estado fundamental con emisión de un fotón. La quimioluminiscencia indirecta o sensibilizada se basa en un proceso de transferencia de energía de la especie excitada a una sustancia fluorescente. En el caso de moléculas que no pueden emitir directamente quimioluminiscencia, este proceso permite transferir su exceso de energía a la sustancia fluorescente que a su vez es excitada, volviendo a su estado fundamental con la emisión de un fotón.

El catalizador, enzima o ión metálico reduce la energía de activación y proporciona el ambiente adecuado para lograr un aumento de la eficiencia del proceso. Los cofactores son necesarios, en ocasiones, para convertir uno o más de los sustratos en una forma capaz de reaccionar e interactuar con el catalizador, o para proporcionar un grupo saliente eficaz cuando se requiere producir el emisor excitado.⁵⁰

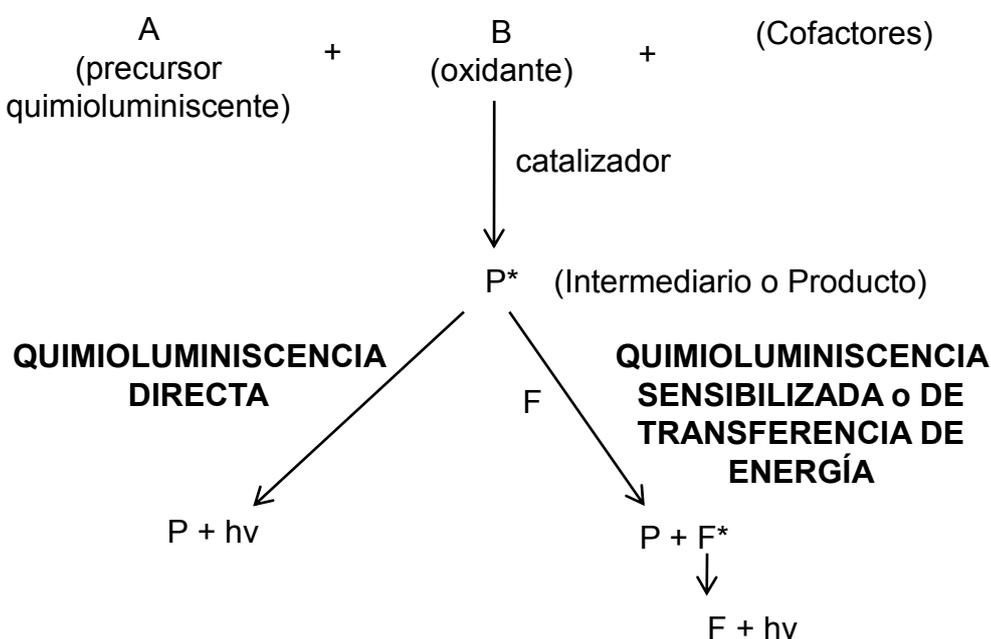


Figura 3. Tipos de reacciones en quimioluminiscencia (P: producto; F: sustancia fluorescente).

Requisitos de la emisión de quimioluminiscencia

Para que una reacción química emita luz, debe reunir algunos requisitos básicos:

- a) La reacción debe ser exotérmica y producir la suficiente energía para formar el estado electrónicamente excitado.
- b) El camino de reacción debe ser favorable a canalizar la energía hacia la formación de un estado electrónicamente excitado. En el caso de que la energía química se disipe en forma de calor, mediante vibraciones o rotaciones moleculares, la reacción no será quimioluminiscente.
- c) La emisión de un fotón debe ser un proceso de desactivación del producto excitado favorable en relación a otros procesos no radiantes que pueden aparecer en pequeña proporción, como disociación molecular, reacciones químicas con otras especies, transferencia de energía intra o intermolecular, isomerización o atenuación física.^{50,51}

Factores que influyen en la emisión de quimioluminiscencia

Las medidas de quimioluminiscencia están fuertemente influenciadas por aquellos factores experimentales que afectan al rendimiento cuántico y a la velocidad de reacción, como son:⁵⁰

- La estructura química del precursor quimioluminiscente, no solamente la parte que contiene al grupo excitado electrónicamente, sino también las cadenas laterales.
- La naturaleza y concentración de otras sustancias que afectan el proceso de quimioluminiscencia y que favorecen otros procesos competitivos no radiantes.
- El catalizador seleccionado.
- La presencia de iones metálicos, especialmente metales de transición implicados en el proceso de oxidación.
- La temperatura.
- pH y fuerza iónica.
- El carácter hidrofóbico del solvente y la composición de la disolución.
- La presencia de aceptores de la energía transferida.

Características de la quimioluminiscencia como técnica analítica

Como la velocidad de la reacción es función de las concentraciones de reactivos, la quimioluminiscencia es una técnica adecuada para el análisis cuantitativo. La utilidad de los sistemas quimioluminiscentes en química analítica se basa en algunas características especiales:

- a) La técnica comprende simultáneamente características cinéticas y luminiscentes, por lo que proporciona una alta sensibilidad y un amplio rango dinámico.
- b) Comparada con los procesos de fotoluminiscencia, como ya ha sido mencionado, no se requiere fuente de excitación externa, lo que ofrece algunas ventajas, como la ausencia de dispersión y señales fotoluminiscentes de fondo, la desaparición de problemas relacionados con la inestabilidad de la fuente externa y reducción de interferencias debidas a procesos de excitación no selectivos.
- c) La selectividad y la linealidad son más dependientes de la reacción y de las condiciones de reacción elegidas. Como ocurre con los procesos fotoluminiscentes, la absorción o emisión de radiación por el analito, producto o cofactores, pueden causar pérdida de linealidad o interferencias espectrales.
- d) Dependiendo de la naturaleza del analito y de la reacción quimioluminiscente, el incremento o disminución de la intensidad de quimioluminiscencia estará directamente relacionada con la concentración del analito.
- e) Las reacciones quimioluminiscentes pueden acoplarse fácilmente como método de detección en cromatografía, electroforesis capilar o inmunoensayo, proporcionando información cualitativa o cuantitativa sobre una gran variedad de especies en las fases gaseosa y líquida.

Como regla empírica, es probable que un compuesto exhiba quimioluminiscencia cuando él o su producto derivado muestren propiedades fluorescentes. Es posible que la oxidación de tal especie produzca quimioluminiscencia, aunque hay muchas excepciones a esta regla general.⁵²

Reacciones de quimioluminiscencia en fase líquida

Oxidaciones directas

En los últimos años, se han desarrollado diversas reacciones quimioluminiscentes por reacción entre un analito con oxidantes fuertes, tales como MnO_4^- (en medio ácido y alcalino), ClO^- , cerio (IV), H_2O_2 , IO_4^- , Br_2 o N-bromosuccinimida, y con reductores en diferentes condiciones químicas.⁵³ Normalmente, si la oxidación de la molécula conduce a un producto fluorescente o si el analito en sí mismo tiene una estructura que permita la emisión fluorescente, hay posibilidad de que su oxidación produzca emisión de quimioluminiscencia. Se ha publicado un gran número de reacciones de este tipo, principalmente en el análisis de fármacos.⁵⁴

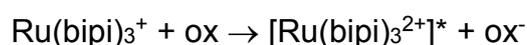
Tris (2,2'-bipiridil) dicloro-rutenio (II)

Un reactivo usado frecuentemente en quimioluminiscencia es el complejo tris (2,2'-bipiridil) dicloro-rutenio (II) [el catión es $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$], cuyo estado excitado $[\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]^*$ produce una emisión naranja a 610 nm. El estado excitado de este ion puede conseguirse por diversas reacciones que implican la transferencia de un electrón y regeneración de la especie $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}$:

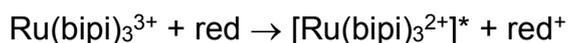
Por reacción de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ y $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$:



Por reacción de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^+$ con oxidantes:



Por reacción de $\text{Ru}(\text{bipi})_3^{3+}$ con reductores:



Para estas reacciones, la intensidad de quimioluminiscencia es linealmente proporcional a la concentración de cualquiera de los reactivos, lo que permite su determinación ajustando adecuadamente la concentración de los restantes reactivos que intervienen en ella.⁵⁰

Instrumentación básica

La intensidad de luz emitida es un indicador de la cantidad de analito presente y al instrumento básico que es capaz de realizar estas medidas se le llama luminómetro, pudiéndose utilizar un fluorómetro simplemente con la fuente de excitación apagada. Esta instrumentación incluye como componentes principales: una celda de reacción, un compartimiento cerrado a la luz, un dispositivo de inyección y mezcla de reactivos y/o de muestra, un detector de luz y un sistema de adquisición y procesador de señal.

Una vez mezclados los reactivos y la muestra que contiene al analito comienza la reacción quimioluminiscente y la intensidad de la emisión que se está produciendo, disminuye una vez que los reactivos se han agotado. Esto supone que el carácter de la emisión quimioluminiscente es transitorio, y que la escala de tiempo depende de la reacción en cuestión, que va de un corto flash a una emisión continua. Este hecho es crucial para la selección del sistema más conveniente para la incorporación de los reactivos.⁵²

Dependiendo de la configuración del dispositivo y del método de introducción de muestra y reactivos, los sistemas pueden clasificarse en: estáticos (introducción de cantidades discretas de reactivos y muestra en un recipiente) o en flujo.

En los sistemas estáticos, pequeñas porciones de muestra y reactivo quimioluminiscente se mezclan rápidamente en la cubeta de reacción, frecuentemente a temperatura controlada. Normalmente el reactivo final que inicia la reacción se adiciona con una jeringa o usando un inyector automático para conseguir una velocidad y volumen de inyección más reproducibles y una mejor sincronización de la adquisición de datos desde el inicio de la reacción. La mezcla

de los reactivos y la muestra se produce por la fuerza de la inyección, aunque a veces se puede utilizar un agitador magnético. En estos casos, se registra la curva completa de intensidad de emisión de quimioluminiscencia en función del tiempo de reacción. Dependiendo de la situación, la señal analítica puede ser tomada como la intensidad máxima de quimioluminiscencia (altura máxima del pico), la señal después de un tiempo fijado desde el momento de la mezcla, la integral de la señal en un determinado periodo de tiempo o la integral del pico completo (el área completa). En cualquiera de los casos, las medidas estarán relacionadas de manera lineal con la concentración de analito.

En los sistemas de quimioluminiscencia en flujo continuo la muestra y los reactivos son continuamente bombeados y mezclados a través de un conector; el sitio donde se produce la mezcla está muy próximo a la celda en donde se realiza la detección. La señal se observa cuando la celda está totalmente llena con la mezcla de reacción, a un tiempo predeterminado después de la mezcla. En estos casos, es posible obtener una señal constante y reproducible muy fácil de medir, y que representa la emisión total de la mezcla de reacción durante el tiempo que está en la celda. El óptimo de sensibilidad se consigue ajustando la velocidad de flujo y el volumen entre el punto de mezcla y el punto de observación con objeto de conseguir el perfil máximo de intensidad de quimioluminiscencia en función del tiempo. Como desventajas de esta técnica destacan el alto consumo de reactivo, el hecho de que no se obtenga ninguna información cinética, y que solamente una pequeña porción de la intensidad de quimioluminiscencia total es la que se mide cuando las reacciones son lentas.⁵⁰

LUMINISCENCIA SENSIBILIZADA DE LANTÁNIDOS

El fenómeno de transferencia de energía entre salicilato y terbio (III) fue observado por primera vez por Weissman en 1942. La primera aplicación analítica de luminiscencia se reporta en 1985, para la detección de un cromóforo en cromatografía líquida.⁵⁵

En la Figura 4 se muestra el diagrama teórico de la transferencia de energía. El ligando orgánico (donor) absorbe energía y es llevado hasta un estado de singlete excitado (S1), el electrón excitado sufre un cruce entre sistemas hacia

el estado triplete excitado (T_1) y la energía asociada es transferida hacia el ión lantánido (aceptor), el cual es excitado y subsecuentemente emite su radiación característica al volver al estado fundamental.⁵⁶

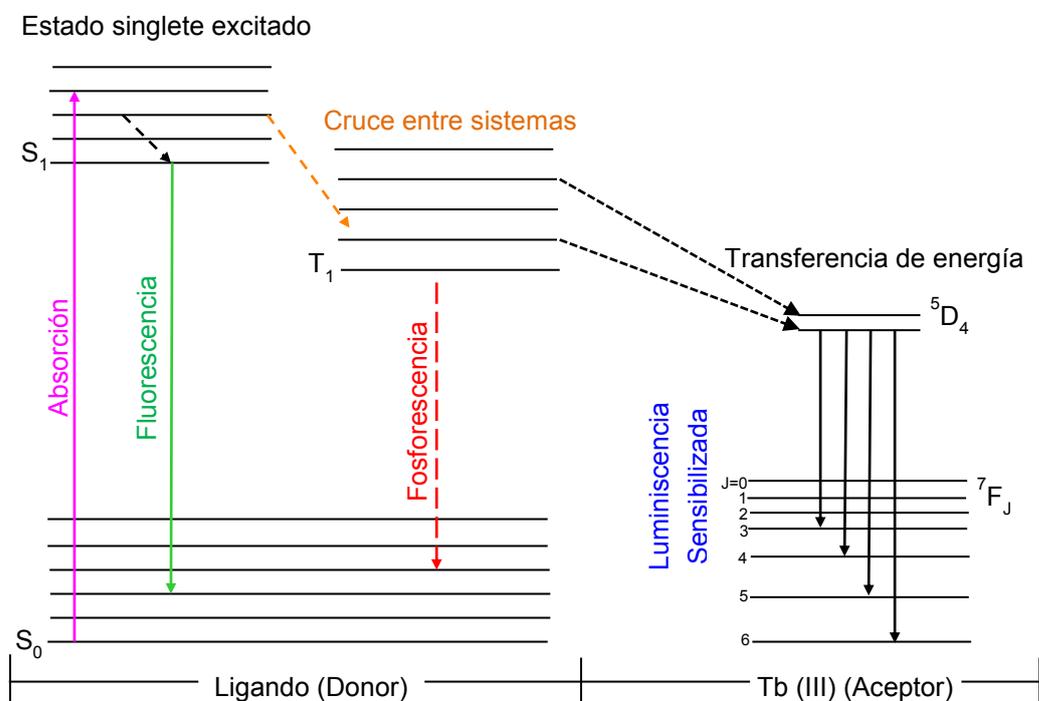


Figura 4. Mecanismo de transferencia de energía en la luminiscencia sensibilizada de terbio (III).

Los lantánidos son los 14 elementos que siguen al lantano en la tabla periódica. Tienen como propiedad los orbitales 4f incompletos; 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.⁵⁷ El espectro de emisión obtenido está formado por bandas estrechas; el número y la intensidad de los picos dependen del estado de coordinación del ión (naturaleza del medio). Los lantánidos más usados en aplicaciones analíticas son el terbio (III) y el europio (III), ya que presentan tiempos de decaimiento de la señal luminiscente más largos que la fluorescencia, del orden de los 400-2000 μs ^{58,59} y altas intensidades de luminiscencia.⁵⁷ En el caso del terbio (III), estas bandas de emisión aparecen a 490, 545, 585 y 620 nm, con una intensidad que es proporcional a la concentración del analito. La sensibilidad más elevada la presenta la transición hipersensible $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$ (490

nm). La intensidad luminiscente 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.

Como sistema de detección, la luminiscencia sensibilizada de lantánidos es una alternativa muy atractiva en comparación con las técnicas de detección UV o a otras técnicas luminiscentes. Se utiliza para la determinación de fármacos, principios activos, ácidos nucleicos, nucleótidos, proteínas y otros compuestos orgánicos, debido a que presenta características favorables, como estrechas bandas de emisión, grandes desplazamientos de Stokes y emisiones de vida media largas.⁵⁷ Se sabe que ciertos compuestos pueden ser detectados con bajos valores de límites de detección usando luminiscencia sensibilizada de lantánidos, tanto en soportes sólidos como en soluciones micelares.⁶⁰⁻⁶⁶

Factores que afectan a la intensidad de luminiscencia sensibilizada de lantánidos

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

➤ Ligandos con grupos donores de electrones: estos ligandos forman quelatos estables. El terbio (III) tiene número de coordinación 9; para sensibilizar su luminiscencia se puede utilizar, por ejemplo, el ácido dipicolínico (DPA) o el ácido 2,6-piridinadicarboxílico. El DPA tiene dos grupos donores de electrones fuertes (-COO⁻) y un grupo donador débil, el N piridínico. Los grupos donores débiles (que contienen N u O neutros), sólo coordinan cuando están en ligandos multidentados que contienen al menos 1 ó 2 grupos donores con átomos de O cargados negativamente.

➤ Agentes sinérgicos: se los emplea para remover moléculas de agua de la esfera de coordinación del ión lantánido. La sensibilidad puede ser incrementada si se incluye un ligando sinérgico que forme un complejo ternario, tal como el

óxido de trioctilfosfina (TOPO), que tiene propiedades de coordinación y puede llenar los lugares vacíos de la esfera de coordinación. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), además de usarse como ligando con propiedades sinérgicas, se suele usar para prevenir la hidrólisis del terbio (III) en soluciones alcalinas. Otros agentes sinérgicos que pueden utilizarse son: difenil guanidina (DPG), tenoiltrifluoroacetona (TTA), α - α -bipiridina (BP), benzoilacetona (BA), fenantrolina (Phen) o ácido trimésico (ácido benceno-1,3,5-tricorboxílico) (TMA).

➤ Surfactantes: forman un entorno micelar que protege al quelato lantánido-analito de la desactivación por procesos no radiantes, contribuyendo al aumento de la señal luminiscente.^{46,61,62} Algunos surfactantes comúnmente usados son: Triton X-100 (no iónico), dodecil sulfato de sodio (SDS) (aniónico), cloruro de cetiltrimetilamonio (CTACl) o bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) (catiónicos). Estos también contribuyen a aumentar la señal de luminiscencia.

➤ pH: la intensidad luminiscente del ión lantánido se ve favorecida a pHs neutros o alcalinos, ya que a estos valores de pH se favorece la ionización de las moléculas ligandos, permitiendo la formación de quelatos estables. Hay que tener en cuenta que a pHs muy alcalinos se produce la precipitación de hidróxidos de lantánidos.

➤ 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 involucra una transferencia de energía de luminiscencia sensibilizada inter-quelato, cuya eficiencia puede incrementarse fuertemente empleando un surfactante.

➤ Átomos pesados: pueden aumentar el acoplamiento espín-órbita y por lo tanto la probabilidad del cruce entre sistemas, una de las etapas involucradas en el proceso de luminiscencia sensibilizada de lantánidos.

Comercialmente, las sales de lantánidos son cloruros o nitratos. Los cloruros se utilizan con mayor frecuencia porque son solubles en agua y compatibles con la mayoría de solventes orgánicos.

ANALITOS ESTUDIADOS

ÁCIDO BENZOICO

El ácido benzoico es un ácido carboxílico aromático que tiene un grupo carboxilo unido a un anillo bencénico (Figura 5).

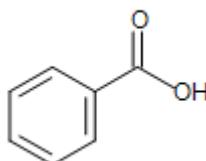


Figura 5. Estructura del ácido benzoico.

Es un conservante utilizado tanto como ácido como en forma de sus sales de sodio, de potasio o de calcio. El ácido benzoico y sus derivados sólo se pueden emplear para conservar alimentos con pH ácido. Actúa protegiendo principalmente contra el moho (incluidas también las variantes que producen las aflatoxinas) y las fermentaciones no deseadas. Su principal inconveniente es que presenta cierta toxicidad, por lo que se utiliza cada vez menos y solamente en productos de consumo ocasional. Su acumulación en el organismo puede incrementar riesgos de cáncer. Puede además producir alergias, asma y urticarias si se ingiere conjuntamente con determinados colorantes.

Debido a lo mencionado anteriormente y teniendo en cuenta que el Código Alimentario Argentino (CCA) establece que los jugos de frutas podrán contener como máximo 1,00 g/L de ácido benzoico, resulta de gran importancia su control en dichos productos alimenticios.

SACARINA

La sacarina (*o*-sulfobenzimida) (Figura 6) es uno de los edulcorantes más antiguos, se lo utiliza desde principios del siglo XX.

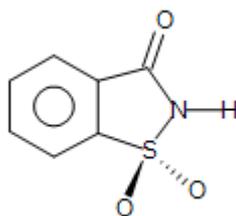


Figura 6. Estructura de la sacarina.

Se emplea en la elaboración de bebidas refrescantes, en yogures edulcorados y en productos dietéticos para diabéticos. Actualmente se obtiene mediante síntesis química a partir de tolueno o de otros derivados del petróleo. La forma más utilizada es la sal sódica, ya que en la forma ácida es muy poco soluble en agua. En los años setenta varios grupos de investigadores indicaron que dosis altas de sacarina (5% del peso total de la dieta) eran capaces de inducir la aparición de cáncer de vejiga en ratas. La sacarina está sometida a normas de etiquetado estrictas con frases del tipo: “este producto contiene sacarina”, no obstante, el uso de la sacarina está prohibido en algunos países como Canadá y Estados Unidos.

LEVODOPA Y CARBIDOPA

La levodopa (Figura 7A) es un fármaco precursor de la dopamina convirtiéndose en esta última por medio de la enzima dopa descarboxilasa a nivel sistémico y del sistema nervioso central en un solo paso. La levodopa es utilizada generalmente en el tratamiento de trastornos degenerativos del sistema nervioso central, principalmente de neuronas dopaminérgicas, como la enfermedad de Parkinson, Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. La levodopa suele administrarse conjuntamente con la carbidopa (Figura 7B), que actúa inhibiendo la enzima dopa descarboxilasa periférica, permitiendo que la levodopa llegue al sistema nervioso central en la mayor concentración posible. Esta administración conjunta puede reducir la dosis de levodopa en un 75% aproximadamente, consiguiendo una mayor eficacia clínica, que se manifiesta en una acción más rápida y en un mayor número de enfermos beneficiados.

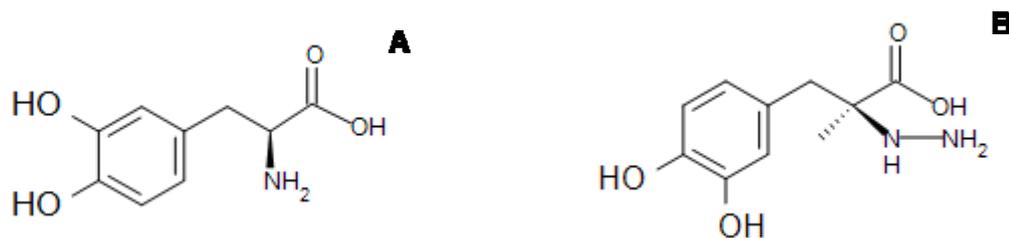


Figura 7. Estructura de (A) levodopa y (B) carbidopa.

ÁCIDO SALICÍLICO

El ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico) (Figura 8) recibe su nombre de *salix*, la denominación latina del sauce, de cuya corteza fue aislado por primera vez. Es un ácido orgánico débil con características antiinflamatorias, que debido a que provoca irritaciones estomacales no se aplica como tal sino en forma de sus derivados, siendo los más conocidos el ácido acetilsalicílico (aspirina) y el salicilato de metilo, usado en soluciones para vaporizadores y como tópico (cremas o pomadas) para aliviar los dolores musculares y articulares.⁶⁷

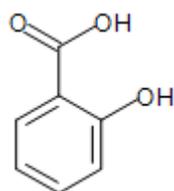


Figura 8. Estructura del ácido salicílico.

NAPROXENO

El naproxeno es un derivado del ácido propiónico (Figura 9) que se utiliza como antiinflamatorio no esteroideo de uso general. Es empleado en el tratamiento del dolor leve a moderado, la fiebre, la inflamación y la rigidez provocadas por afecciones como la osteoartritis, la artritis reumatoidea, la artritis psoriásica, la espondilitis anquilosante, diversas lesiones tales como la tendinitis y

la bursitis, y en el tratamiento de la dismenorrea primaria y los calambres menstruales. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, pero su mecanismo exacto de acción es desconocido. Está disponible como sal sódica, el naproxeno sódico, que se absorbe más rápidamente en el tracto gastrointestinal.

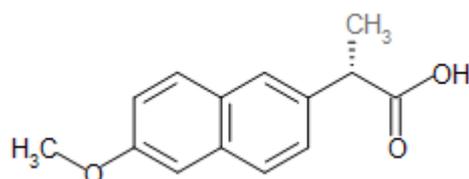


Figura 9. Estructura del naproxeno.

FLUOROQUINOLONAS

Los agentes antibacterianos quinolónicos son los antibióticos sintéticos más importantes en medicina humana y veterinaria, debido a su actividad de amplio espectro y a su buena absorción oral. La mayoría de las quinolonas usadas en la clínica son del grupo de las fluoroquinolonas, que se caracterizan por tener un átomo de flúor como sustituyente en el anillo central, normalmente en la posición 6. Las quinolonas, por su efecto antimicrobiano, se clasifican en cuatro generaciones.^{68,69} Las quinolonas de primera generación se utilizan exclusivamente como antisépticos urinarios, porque no alcanzan niveles séricos suficientes, y se eliminan por orina en forma activa. Las quinolonas de segunda generación son las propiamente llamadas fluoroquinolonas, entre ellas se encuentran la ciprofloxacina y la norfloxacina (Figuras 10A y 10B). Estas tienen acción a nivel sistémico y urinario. Las quinolonas de tercera generación surgieron ante la necesidad clínica de un mayor espectro antibacteriano, encontrándose en este grupo la danofloxacina (Figura 10C). Finalmente, las quinolonas de cuarta generación son nuevas drogas sintetizadas para aumentar el espectro antibacteriano, preservando a su vez el espectro previo de las quinolonas de la tercera generación.⁶⁷

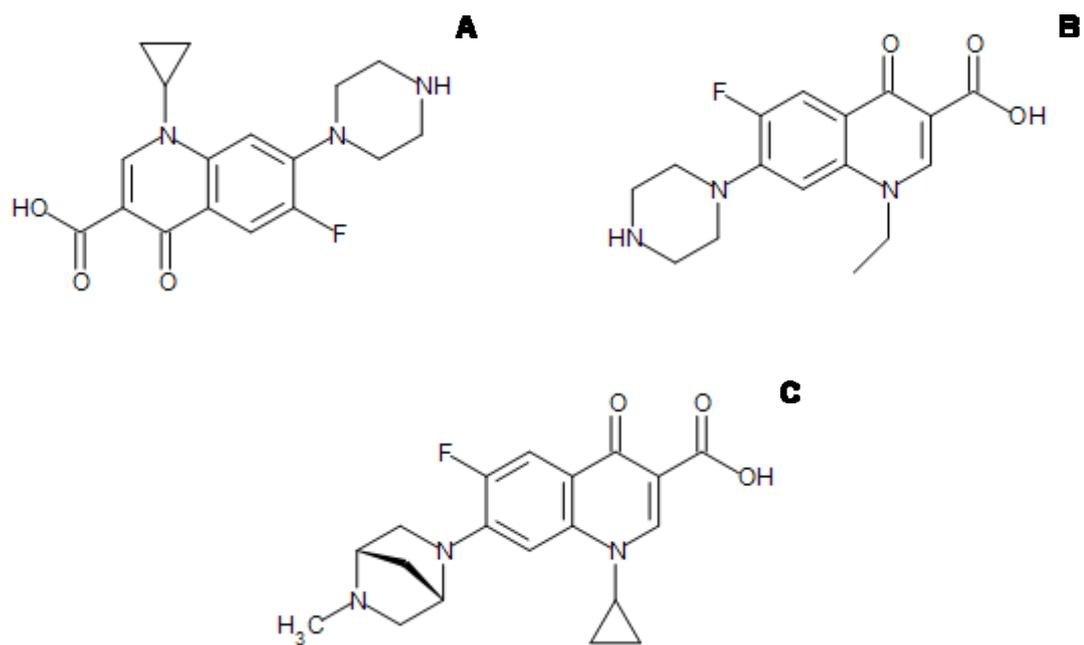


Figura 10. Estructura de las fluoroquinolonas. (A) Ciprofloxacin. (B) Norfloxacin. (C) Danofloxacin.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES

➤ Desarrollar estrategias que permitan, a partir del uso de técnicas luminiscentes en combinación con métodos de calibración multivariada, mejorar la calidad de la evaluación cuali-cuantitativa de especies químicas de interés que forman parte de muestras complejas.

➤ Aplicar los resultados obtenidos al desarrollo de nuevos métodos de cuantificación que posean características analíticas similares o superiores a la metodología ya existente. En muestras complejas y/o altamente interferentes, se plantea combinar las señales luminiscentes provenientes de los sistemas desarrollados con técnicas quimiométricas de primer y segundo orden.

OBJETIVOS PARTICULARES

➤ Desarrollar un método de luminiscencia sensibilizada de lantánidos combinado con métodos quimiométricos que permitan aplicar la ventaja de segundo orden, para la determinación del ácido benzoico en presencia de una interferencia, la sacarina, en muestras alimenticias complejas, como los jugos de frutas.

➤ Evaluar algoritmos quimiométricos empleando un sistema modelo de datos de segundo orden con solapamiento espectral extremo en una de las dimensiones entre el analito y el interferente.

➤ Evaluar diferentes algoritmos quimiométricos para el análisis de sistemas de datos de segundo orden que requieren de adición de patrón.

➤ Evaluar la aplicación de MCR-ALS a datos de segundo orden con solapamiento extremo en una de las dimensiones que requieren de adición de patrón. Aplicación del mismo a datos de segundo orden de luminiscencia sensibilizada de lantánidos, para la determinación de antibióticos fluoroquinolónicos en presencia de una interferencia, el salicilato, en muestras biológicas de suero humano.

➤ Evaluar un nuevo procedimiento RBL acoplado a U-PLS que incluye dependencia lineal. Aplicación del mismo a datos de segundo orden empleando

señales luminiscentes, que requieren de adición de patrón y presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones, para la determinación de ciprofloxacina en muestras humanas de orina y suero.

MATERIALES y MÉTODOS

EQUIPAMIENTO ANALÍTICO

Los equipos utilizados para realizar el trabajo experimental fueron los siguientes:

- Espectrofluorómetro Aminco Bowman Serie 2 (Urbana, IL, Estados Unidos), provisto de una lámpara de xenón y conectado a un baño termostatzado Cole-Parmer (Niles, IL, Estados Unidos). La adquisición y análisis de los datos se llevó a cabo con el software AB2, implementado con el sistema operativo Windows.
- Espectrofluorómetro luminiscente Varian Cary Eclipse (Varian, Mulgrave, Australia) equipado con una lámpara pulsada de xenón, conectado a un microprocesador y a un baño termostatzado RM 6 Lauda (Lauda, Lauda-Königshofen, Alemania).
- Espectrofluorómetro luminiscente Perkin Elmer LS 55 (BUCKS, Reino Unido), equipado con una lámpara de pulsada de xenón, y conectado a un microprocesador.
- Cromatógrafo líquido de alto rendimiento Waters (Milford, Massachusetts, Estados Unidos) equipado con una bomba de alta presión Waters 515, un inyector Rheodyne, una columna Zorbax SB C18 y un detector UV-Visible de longitud de onda variable.
- pHmetro Metrohm 713 (Herisau, Suiza) equipado con un electrodo combinado de vidrio.

REACTIVOS

Todos los reactivos químicos usados fueron de grado analítico.

En las distintas etapas del trabajo experimental se emplearon soluciones madre de los analitos en estudio que se describen a continuación:

- Soluciones madre de compuestos (analitos e interferentes).

Las soluciones madre de ácido benzoico 1000 mg L⁻¹ (Carlo Erba, Buenos Aires, Argentina), sacarina sódica 1000 mg L⁻¹ (Merck, Hohenbrunn, Alemania), sorbato de potasio 1000 mg L⁻¹ (Supelco, Bellefonte, Estados Unidos), salicilato de sodio 1000 mg L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania), naproxenato de sodio 1000

mg L⁻¹ (Sigma, st. Louis, MO, Estados Unidos) se prepararon pesando la cantidad exacta del correspondiente compuesto y disolviéndolo en agua destilada.

Las soluciones madre de levodopa 650 mg L⁻¹ (Laboratorio Klonal, Buenos Aires, Argentina) y carbidopa 500 mg L⁻¹ (Laboratorio Klonal, Buenos Aires, Argentina) se prepararon pesando la cantidad exacta del correspondiente compuesto y disolviéndolo en agua destilada después de adicionarle 8 gotas de H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹. Ambas soluciones se prepararon diariamente.

Las soluciones madre de ciprofloxacina 100 mg L⁻¹ (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), norfloxacina 50 mg L⁻¹ (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), danofloxacina 100 mg L⁻¹ (Riedel-de Haën, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) se prepararon pesando la cantidad exacta del correspondiente compuesto y disolviéndolo en ácido acético glacial 50 mmol L⁻¹ (Merck, Buenos Aires, Argentina).

También se preparó una solución madre de ciprofloxacina 1000 mg L⁻¹ (Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania) pesando la cantidad exacta del compuesto y disolviendo en H₂SO₄ 0,01 mol L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania) para las mediciones de quimioluminiscencia.

➤ Soluciones de reactivos auxiliares:

La solución de terbio (III) 2,00x10⁻² mol L⁻¹ (Fluka, Buchs, Suiza) se preparó disolviendo la cantidad apropiada de cloruro de terbio hexahidratado en agua destilada.

La solución de TOPO 6,00x10⁻² mol L⁻¹ (Aldrich, Gillingham, Dorset, Inglaterra) se preparó en etanol-agua destilada (50:50 v/v).

Las soluciones de Triton X-100 1% (J. T. Baker, Estados Unidos), deca etilen glicol monododecil éter (C₁₂E₁₀) 1x10⁻² mol L⁻¹ (Sigma, st. Louis, MO, Estados Unidos), polioxi etilen (23) dodecanol (Brij35) 1x10⁻² mol L⁻¹ (Sigma, st. Louis, MO, Estados Unidos), SDS 1,20x10⁻¹ mol L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania) y sulfito de sodio 7,50x10⁻² mol L⁻¹ (Merck, Darmstadt, Alemania) se prepararon en agua destilada.

Las soluciones de cerio (IV) se prepararon pesando la cantidad adecuada de sulfato de cerio (IV) tetrahidratado (Merck, Darmstadt, Alemania) y disolviéndola en H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ en el caso de la solución 1,00x10⁻³ mol L⁻¹ (empleada para las reacciones de oxidación) y en H₂SO₄ 10 mol L⁻¹ a la solución 6,00x10⁻² mol L⁻¹ (empleada para la reacción de quimioluminiscencia).

La solución de tris (2, 2'-bipiridil) dicloro-rutenio(II) hexahidratada $4,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, Estados Unidos), se preparó disolviendo la cantidad adecuada en agua bidestilada. Debido a su baja estabilidad esta solución debió ser preparada diariamente.⁷⁰

Las soluciones de H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹ y de NH₃ 0,1 mol L⁻¹ se prepararon a partir de H₂SO₄ y NH₃ concentrados (Merck, Darmstadt, Alemania).

➤ Soluciones reguladoras:

Solución reguladora de imidazol (Merck, Darmstadt, Alemania) 0,20 mol L⁻¹ de pH 6,2.

Soluciones reguladoras de acetato de sodio/ácido acético (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) $2,20 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ de pH 4,20; 1,00 mol L⁻¹ de pH 4,00; 1,00 mol L⁻¹ de pH 6,50 y 0,2 mol L⁻¹ de pH 6,0.

Solución reguladora tris (hidroximetil) amino metano (TRIS) (Merck, Darmstadt, Alemania) 0,05 mol L⁻¹ de pH 6,0.

Solución reguladora de fosfato (Merck, Darmstadt, Alemania) 0,2 mol L⁻¹ de pH 6,0.

METODOLOGÍA

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO BENZOICO EN PRESENCIA DE SACARINA EN JUGOS DE FRUTAS

Las medidas de luminiscencia se realizaron con el espectrofluorómetro Aminco Bowman. Los parámetros instrumentales empleados fueron: *delay time* de 225 μs, *gate time* de 900 μs, mínimo periodo flash de 5 ms, detector enmascarado, anchos de ranuras de 8 nm y sensibilidad del fotomultiplicador de 480 mV. La temperatura de las soluciones y del compartimiento de la celda se mantuvo constante a 25°C por medio de circulación de agua destilada desde un baño termostatzado.

Los espectros de emisión se obtuvieron a la longitud de onda de excitación de 260 nm y los de excitación a la longitud de onda de emisión de 545 nm. Para las mediciones de los tiempos de decaimiento, las longitudes de onda de emisión

y excitación fueron 260 y 545 nm respectivamente, y los tiempos del *gate* variaron desde 225 hasta 900 μ s en periodos de 25 μ s.

Las matrices de luminiscencia sensibilizada de lantánidos en función de la excitación y los tiempos de decaimiento (LSETD) se recolectaron entre 210 y 330 nm cada 5 nm (25 puntos), con la longitud de onda de emisión fija en 545 nm. Los tiempos de decaimiento se evaluaron desde 225 hasta 900 μ s cada 25 μ s (28 puntos). De este modo, las matrices de excitación-tiempo de decaimiento fueron de tamaño 25x28. Estas matrices se guardaron en formato ASCII y se transfirieron a una PC Sempron AMD para realizar las distintas operaciones con el programa de calibración multivariada de segundo orden (MVC2).

La técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se llevó a cabo operando a flujo de 1 mL/min, con el detector UV-visible midiendo a 234 nm. Se utilizó una válvula Rheodyne con un rulo de 200 μ L para inyectar las muestras en una columna Zorbax SB C18 (de 5 μ m de tamaño medio de partícula, 150 mm de largo y 4,6 mm de diámetro interno).

Condiciones óptimas para la señal luminiscente

Para seleccionar las condiciones experimentales que permitan obtener una óptima señal luminiscente se tomaron como punto de partida datos de la literatura.⁷¹ Para corroborarlas, se llevaron a cabo diferentes ensayos, estas mediciones puntuales se realizaron a longitudes de onda de excitación y emisión fijas en 260 nm y 545 nm, respectivamente. Se estudió si la presencia de TOPO $2,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ como ligando sinérgico produce una mejora en la señal luminiscente. Se evaluó las siguientes soluciones reguladoras: ácido acético/acetato $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de pH 6,0; TRIS $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de pH 6,0; fosfato $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de pH 6,0 e imidazol $1,2 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de pH 6,2. También se estudió el uso de diferentes surfactantes no-iónicos, como triton X-100 1%, C₁₂E₁₀ $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ y Brij35 $1,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. Por último, se realizó una optimización univariada de la concentración de terbio (III) entre 5×10^{-4} y 3×10^{-3} mol L⁻¹.

Muestras de calibración, validación y reales

Se construyó un conjunto de calibración con nueve muestras por duplicado (dieciocho muestras en total) en el rango de concentraciones de ácido benzoico 0,00-5,00 mg L⁻¹. Se preparó además un conjunto de once muestras de validación siguiendo un diseño al azar, con concentraciones de ácido benzoico (analito) desde 0,00 hasta 5,00 mg L⁻¹ y de sacarina (interferente) desde 0,00 hasta 6,00 mg L⁻¹.

Las soluciones de calibración y validación se prepararon de la siguiente manera: se tomaron las alícuotas apropiadas de las soluciones madre de ácido benzoico y sacarina y se introdujeron en un matraz volumétrico de 2,00 mL. Luego se agregaron las cantidades necesarias de las soluciones madre para obtener las concentraciones óptimas de terbio (III), TOPO y solución reguladora de imidazol, y finalmente se llevó a volumen con agua destilada.

Las muestras comerciales estudiadas fueron las siguientes:

- 1) jugo líquido concentrado de ananá (Asunción)
- 2) jugo líquido concentrado de pomelo rosado (Trechel)
- 3) bebida finamente gasificada de manzana verde (Magna)
- 4) jugo deshidratado en polvo de limón (Tang), el cual no contenía ácido benzoico
- 5) jugo líquido concentrado de manzana (Mocoreta)
- 6) jugo líquido concentrado de naranja (Mocoreta)
- 7) jugo líquido concentrado de pomelo (Aruba)
- 8) jugo líquido concentrado de naranja (Miju)

Todas ellas están disponibles en los supermercados locales.

Antes de someterlas al análisis, a las muestras de jugos líquidos se les realizaron las diluciones adecuadas, tomando 7,14 µL de muestra y llevándola a volumen final de 5,00 mL (1:700), o tomando 10,00 µL en un volumen final de 10,00 mL (1:1000), dependiendo de la muestra. Las muestras se procesaron de la siguiente manera: un volumen adecuado de jugo se transfirió al matraz volumétrico requerido, de acuerdo con la dilución seleccionada, y luego de adicionar cantidades apropiadas de las soluciones madre de terbio (III), TOPO y de la solución reguladora de imidazol, se completó a volumen final con agua

destilada de manera de obtener las mismas concentraciones finales que las utilizadas en las muestras de calibración y validación.

Para analizar la muestra de jugo en polvo (muestra 4) se procedió de la siguiente manera: la muestra se reconstituyó con agua destilada (0,350 g en 10,00 mL), luego se la diluyó (10,00 μ L en 10,00 mL) empleando el mismo procedimiento que en el resto de las muestras líquidas.

Procedimiento analítico para HPLC

Se prepararon cuatro soluciones por duplicado para los tres analitos estudiados: ácido benzoico, sacarina y sorbato, con concentraciones de 0,00, 0,50, 1,00, 1,50 y 2,00 mg L⁻¹. Las soluciones se obtuvieron por dilución adecuada de las soluciones madre de los compuestos en fase móvil: 12% de acetonitrilo grado HPLC y 88% de solución reguladora de acetato de sodio-ácido acético 2,20x10⁻³ mol L⁻¹, pH 4,2 preparado con agua destilada de grado HPLC.

Estas soluciones se filtraron empleando membranas de nylon de 0,45 μ m, y se inyectaron 200,0 μ L del filtrado en el cromatógrafo. La separación cromatográfica se completó en 1800 segundos, en condiciones isocráticas. Los tiempos de retención de los analitos estudiados fueron los siguientes: 200 segundos para la sacarina, 900 segundos para el ácido benzoico y 1400 segundos para el sorbato. Las condiciones cromatográficas empleadas son similares a las indicadas por Pylypiw y Grether.⁷² Se construyó una curva de calibrado para cada uno de los analitos cuyas ecuaciones de regresión fueron las siguientes: $A = 0,04(6) + 0,91(5) \times c$ ($R^2 = 0,99559$) para el ácido benzoico, $A = 0,03(4) + 0,42(3) \times c$ ($R^2 = 0,99078$) para la sacarina y $A = 0,03(5) + 0,73(4) \times c$ ($R^2 = 0,99390$) para el sorbato (la desviación estándar en la última cifra significativa aparece entre paréntesis, donde A es el área del pico del analito y c su concentración en mg L⁻¹). Para el análisis de las muestras reales, se realizaron diluciones adecuadas empleando fase móvil, se filtraron y se inyectaron en el cromatógrafo en las condiciones descriptas.

SISTEMA MODELO DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN CON SOLAPAMIENTO EXTREMO EN UNA DE LAS DIMENSIONES. DETERMINACIÓN DE CARBIDOPA EN PRESENCIA DE LEVODOPA

Datos simulados

Para ilustrar el comportamiento de MCR-ALS y de otros algoritmos de calibración de segundo orden en muestras que presentan un alto grado de solapamiento espectral de los componentes, se llevaron a cabo simulaciones. En este caso, los datos simulados se obtuvieron considerando un único analito en las muestras de calibración, e incluyendo en las muestras incógnita un componente adicional como potencial interferente. De este modo, la resolución correcta de este sistema requiere de la ventaja de segundo orden. La matriz de datos cinéticos-espectrales (espectros de emisión en función de tiempos de reacción) se generó a partir de los perfiles espectrales y cinéticos libres de ruido, los cuales se muestran en las Figuras 11A y B, respectivamente.

Como se puede ver, ambos componentes tienen espectros idénticos, pero diferentes velocidades de reacción. A partir de los perfiles mostrados en la Figura 11, se construyó una serie de datos de calibración con señales de segundo orden, con concentraciones nominales del analito de 0,3, 0,6 y 0,9 (en unidades arbitrarias). También se creó una serie de 100 muestras incógnita, tomando concentraciones al azar para ambos componentes en el rango 0,0-1,0. Para todas las señales de segundo orden, se agregó una señal de ruido de distribución gaussiana con una desviación estándar igual al 5% de la señal máxima de calibración.

Cada una de las 100 muestras incógnita se unió con las tres muestras de calibración y a cada grupo resultante de cuatro muestras se lo analizó con los algoritmos de segundo orden PARAFAC, GRAM, U-PLS/RBL y MCR-ALS, este último con aumento en el modo espectral. Las predicciones obtenidas del analito con los diferentes métodos fueron posteriormente analizadas y comparadas estadísticamente. En el caso de GRAM, las tres matrices de calibración se

promedian para proveer una matriz de datos virtuales correspondiente a la concentración promedio del analito en la serie de calibrado. Luego la muestra incógnita y la muestra virtual son sometidas al análisis GRAM.

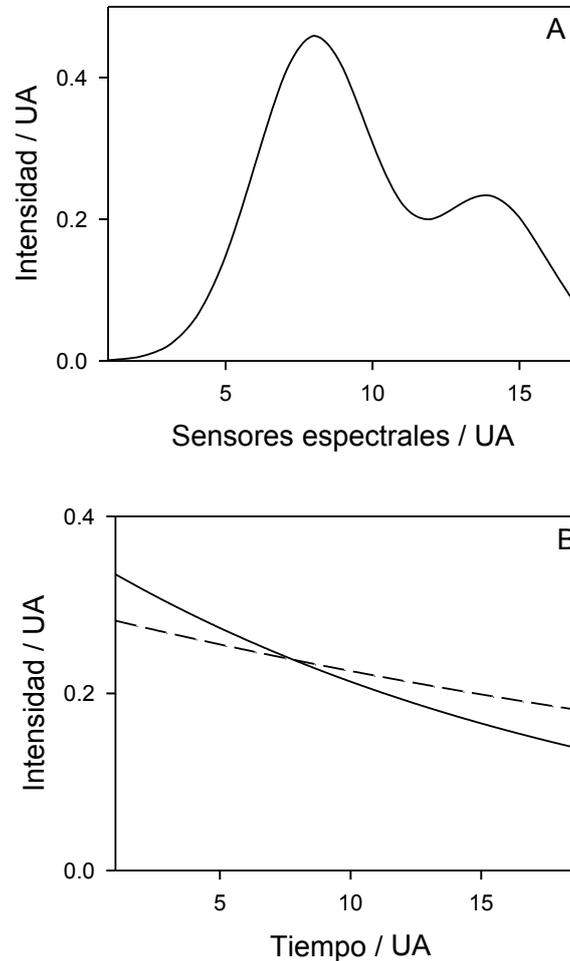


Figura 11. (A) Espectros comunes de ambos componentes del ejemplo simulado. (B) Perfiles cinéticos de ambos componentes del ejemplo simulado (línea sólida, analito, línea de guión, interferencia). En todos los casos, las intensidades han sido normalizadas a longitud unitaria. (UA: unidades arbitrarias).

Para cuantificar el grado de solapamiento espectral entre los componentes 1 y 2 (S_{12}),⁷³ se utilizó la siguiente expresión:

$$S_{12} = \frac{\|s_1^T s_2\|}{\|s_1\| \|s_2\|} \quad (1)$$

donde s_1 y s_2 son los espectros para el componente 1 y 2, respectivamente. El valor de S_{12} está en el rango entre cero y uno, correspondiendo a las extremas situaciones de no-solapamiento y solapamiento completo, respectivamente. Usando la Ecuación (1), el solapamiento espectral es igual a 1 para el sistema analizado.

Datos experimentales

Los espectros de emisión de fluorescencia se midieron con el espectrómetro luminiscente Varian Cary Eclipse. Las medidas se realizaron empleando una celda de cuarzo de 10 mm. Los parámetros instrumentales empleados fueron los siguientes: ranuras de emisión y excitación de 5 nm, longitud de excitación 255 nm, rango de emisión de 300 a 400 nm cada 5 nm, sensibilidad del fotomultiplicador 550 mV, velocidad de barrido de 3000 nm min^{-1} . La evolución cinética fue seguida usando 20 barridos, registrados cada 0,1 min. De esta forma, los datos matriciales de emisión-tiempo tienen un tamaño de 21x20 puntos. Todas las medidas fueron realizadas en una celda termostata a $20,0 \pm 0,1$ °C.

Los datos se guardaron en formato ASCII, y se transfirieron a un microprocesador Sempron AMD para subsecuentes manipulaciones con el programa quimiométrico MCR-ALS.

Muestras de calibración y validación

Para entrenar el modelo multivariado MCR-ALS, se preparó un conjunto de siete muestras de calibración para el analito carbidopa, en concentraciones distribuidas en el rango 0,00-0,50 mg L^{-1} . También se preparó un conjunto de cinco muestras de validación con concentraciones de carbidopa y levodopa elegidas al azar en el mismo rango de calibración para la carbidopa y en el rango de 0,00-1,20 mg L^{-1} para la levodopa. Las muestras de validación se prepararon por duplicado, mezclando los volúmenes apropiados de las soluciones madre de carbidopa y levodopa. Las medidas fueron realizadas al azar con respecto a la

concentración del analito. El conjunto de calibración fue medido en diferentes días con respecto al de validación.

La reacción de oxidación de la carbidopa y la levodopa se llevó a cabo directamente en la cubeta del espectrofluorómetro. Las condiciones experimentales óptimas se tomaron de un trabajo realizado previamente.⁷⁴ Después de 10 segundos de haber agregado el cerio (IV), se registraron los espectros de emisión en el rango de 300 a 400 nm cada 5 nm (21 puntos) durante 2 minutos cada 0,1 minuto (20 puntos). Para eliminar el efecto de señal que presenta el cerio (III) inicial y realizar las correcciones apropiadas del blanco, se registró diariamente un blanco de la reacción, el cual se realizó llevando a cabo el procedimiento anteriormente descrito reemplazando la muestra por agua destilada. Para obtener las matrices de emisión en función del tiempo, las muestras de calibración y validación se procesaron de la siguiente manera: 2,50 mL de la correspondiente solución se colocaron en la cubeta de cuarzo que se termostató a 20 °C por 1 minuto, luego se agregaron 200 µL de cerio (IV) $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ disuelto en H₂SO₄ 0,25 mol L⁻¹, se tapó la cubeta y su contenido se homogenizó invirtiéndola hacia arriba y hacia abajo.

SISTEMAS MODELO DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN QUE REQUIEREN DE ADICIÓN DE PATRÓN. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALGORITMOS

Datos simulados

Se simularon datos para mezclas de multi-componentes, presentando un único analito y dos potenciales interferentes en las muestras incógnita. Los perfiles del analito y los de los potenciales interferentes en ambas dimensiones se muestran en las Figuras 12A y B, conduciendo a matrices de datos de tamaño 50x40 puntos. Usando los perfiles de la Figura 12, se crearon 1000 muestras incógnita, en las cuales el analito está presente en concentraciones tomadas al azar en el rango 0-1 (en unidades arbitrarias) y ambos interferentes en concentraciones tomadas al azar en el rango 0,5-1,5 (para asegurarse que

siempre las muestras contienen una cantidad significativa de interferente). La matriz de señales \mathbf{X} para una típica muestra incógnita está dada por:

$$\mathbf{X} = y_1 \mathbf{b}_1 \mathbf{c}_1^T + y_2 \mathbf{b}_2 \mathbf{c}_2^T + y_3 \mathbf{b}_3 \mathbf{c}_3^T \quad (2)$$

donde la concentración del analito es y_1 y para los interferentes son y_2 e y_3 ; \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n ($n = 1, 2, 3$) son los ($J \times 1$) y ($K \times 1$) perfiles de los componentes en la dimensión 1 y 2 respectivamente, (J y K son los números de puntos en cada dimensión) y el superíndice T indica matrices traspuestas. Los perfiles \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n son mostrados en la Figura 12A y B, todos normalizados a longitud unitaria.

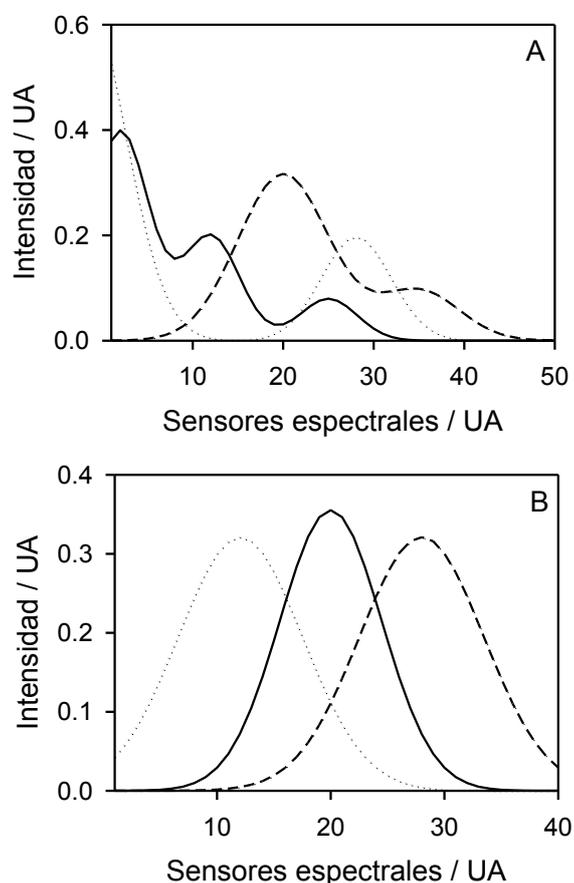


Figura 12. Perfiles utilizados para la simulación, en la primera (A) y segunda dimensión (B). En ambos casos la línea sólida corresponde al analito, la de guión y la de punto a los potenciales interferentes.

Para estimar el solapamiento espectral de este sistema simulado de tres componentes, se puede emplear el parámetro de selectividad definido por Messick, Kalivas y Lang (MKL),⁷⁵ como se describe en la referencia 76. El valor

correspondiente, calculado a partir de los perfiles de la Figura 12, es 0,89 (este puede ser comparado con los obtenidos para ambos sistemas experimentales discutidos a continuación).

Para cada una de las muestras incógnita, se construyeron tres muestras de adición de patrón, con concentraciones del analito de 1, 2 y 3 unidades mayores que la concentración del analito en la muestra incógnita. Las concentraciones de los interferentes se mantuvieron constantes en todas las muestras. A las matrices se le agregó ruido de distribución gaussiana de 0,01 unidades, equivalente al 5% de la señal máxima. También se introdujo incertidumbre en la concentración (con una desviación estándar de 0,01 unidades) tanto en la concentración nominal como en las agregadas a cada muestra.

Finalmente, los datos de segundo orden simulados se sometieron a la calibración de segundo orden utilizando PARAFAC, PARALIND, MCR-ALS y N-PLS/RBL en los diferentes modos de adición de patrón.

Datos experimentales

Los espectros de excitación-emisión de fluorescencia se midieron con el espectrómetro luminiscente Perkin Elmer. Las medidas se realizaron empleando una celda de cuarzo de 1,00 cm. Los parámetros instrumentales empleados fueron los siguientes: ranuras de emisión y excitación de 5 nm, sensibilidad del fotomultiplicador de 650 mV, velocidad de barrido de 1500 nm min⁻¹.

Determinación de salicilato en presencia de naproxeno en suero

Para la determinación de salicilato en suero en presencia de naproxeno, la excitación se midió en el rango 260-320 nm (cada 0,5 nm) y la emisión en el rango 330-494 nm (cada 2 nm), generándose datos matriciales de tamaño 121x83 puntos.

Se tomaron las alícuotas correspondientes de las soluciones madre y 4,00 µL de suero, se introdujeron en un matraz volumétrico de 2,00 mL y se llevó a volumen con amoníaco 0,1 mol L⁻¹. Esta solución se colocó en la celda de medición, registrándose la matriz de excitación-emisión de fluorescencia. Luego

se realizaron tres adiciones sucesivas de solución madre del analito (de 1,40 μL cada una), de manera que la concentración de salicilato se incrementara en 0,07, 0,14 y 0,21 mg L^{-1} (los cambios de concentración producidos por la dilución fueron considerados despreciables). Luego de cada adición de patrón, la muestra se homogeneizó, obteniéndose la correspondiente matriz de excitación-emisión. El rango de concentración final para el salicilato fue (valores referidos a los medidos en la celda) desde 0,00 hasta 0,60 mg L^{-1} . Se estimó en este caso una incertidumbre en la concentración del salicilato en el orden de $\pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$. El grado de dilución del suero (1:500) fue tal que la máxima concentración del analito en suero fuese de 300 mg L^{-1} para el salicilato y 100 mg L^{-1} para el naproxeno. Estos rangos de concentraciones están dentro de los valores terapéuticos de dichas drogas en suero humano.

Determinación de danofloxacina en presencia de salicilato en suero

Para la determinación de danofloxacina en suero en presencia de salicilato, los rangos correspondientes fueron 272-321 nm (cada 0,5 nm) y 400-500 nm (cada 2 nm) para excitación y emisión respectivamente, produciendo matrices de tamaño 99x51.

Se tomaron las alícuotas correspondientes de las soluciones madre, 200 μL de la solución reguladora de acético/acetato y 13 μL de suero, se introdujeron en un matraz volumétrico de 2,00 mL y se lo llevó a volumen final con agua destilada. Esta solución se colocó en la cubeta y se midió la matriz de excitación-emisión de fluorescencia. Luego se realizaron tres adiciones sucesivas de solución madre de danofloxacina (1,00 μL en cada adición), de manera que la concentración de danofloxacina se incrementara en 5,00, 10,0 y 15,0 ng L^{-1} (los cambios de concentración producidos por la dilución fueron considerados despreciables). Luego de cada adición de patrón, la muestra fue homogenizada, obteniéndose la correspondiente matriz de excitación-emisión. El rango de concentración final para la danofloxacina fue (valores referidos a los medidos en la celda) 0,00 hasta 55,0 ng L^{-1} . Se estimó en este caso una incertidumbre en la concentración de $\pm 0,01 \text{ mg L}^{-1}$. El grado de dilución del suero (1:150) fue tal que la máxima concentración del analito en suero fuese de 5,00 mg L^{-1} para la danofloxacina y

200 mg L⁻¹ para el salicilato. Los rangos de concentraciones considerados para ambos componentes están dentro de los valores terapéuticos de dichas drogas en suero humano.

APLICACIÓN DE ALGORITMOS DE SEGUNDO ORDEN A DATOS QUE REQUIEREN DE ADICIÓN DE PATRÓN Y PRESENTAN SOLAPAMIENTO EXTREMO EN UNA DE LAS DIMENSIONES. DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN SUERO EN PRESENCIA DE SALICILATO COMO INTERFERENTE

Datos simulados

Se llevaron a cabo simulaciones para un sistema modelo que permitió ilustrar el comportamiento de MCR-ALS en los dos modos de adición de patrón en datos de segundo orden que presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones. Se consideró un solo analito en la calibración, y se incluyó una interferencia en todas las muestras incógnita. De este modo, la resolución correcta de este sistema requiere de la ventaja de segundo orden. Para cada muestra incógnita, se crearon tres matrices de datos de muestras adicionales para simular la adición del analito. Las matrices de datos (espectros de excitación en función de tiempos de decaimiento) se generaron a partir de los perfiles espectrales y de los perfiles de tiempo de decaimiento. Como se puede observar en las Figuras 13A y B, ambos componentes tienen perfiles de tiempos de decaimiento idénticos, pero difieren sus espectros de excitación. A partir de estos perfiles mostrados en la Figura 13, se construyó una serie de señales de segundo orden para 100 muestras incógnita, con el analito y la interferencia en concentraciones tomadas al azar en el rango 0-1 (en unidades arbitrarias). Para cada una de estas matrices, se simularon tres adiciones de patrones, agregando el analito en concentraciones de 0,5, 1,0 y 1,5 unidades en exceso con respecto a la concentración original. Finalmente, a las matrices se les agregó ruido de distribución gaussiana con una desviación estándar igual al 5% de la señal máxima.

Los datos de segundo orden de las 100 muestras incógnita se unieron a los de adición de patrón, y cada serie de cuatro muestras se sometió a la calibración de segundo orden con MCR-ALS.

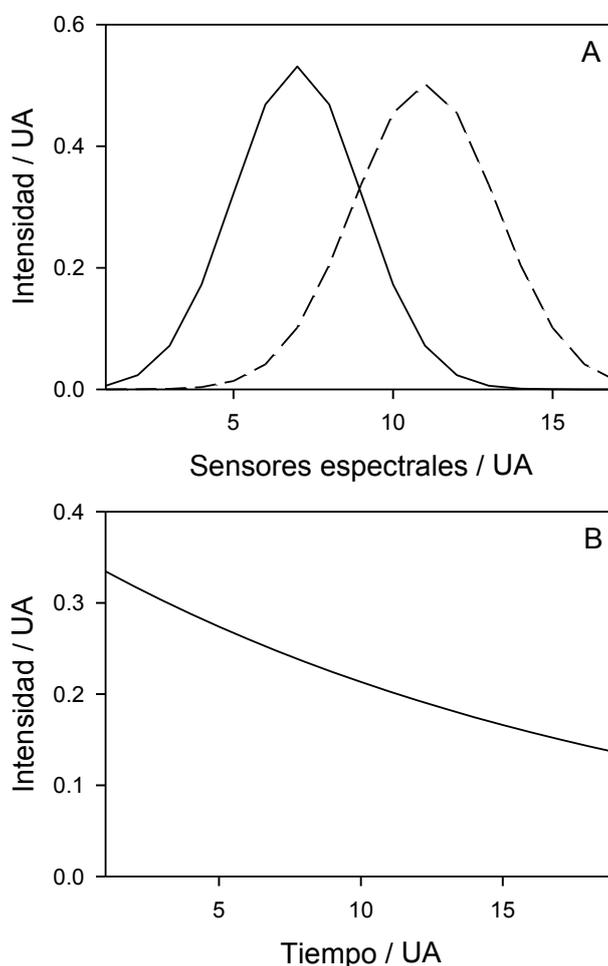


Figura 13. (A) Espectros de excitación para ambos componentes del sistema simulado. (B) Perfiles de tiempos de decaimiento. La línea sólida corresponde al analito y la línea de guión al interferente, en todos los casos las intensidades se normalizaron a longitud unitaria.

Datos experimentales

Las medidas de luminiscencia sensibilizada de lantánidos se realizaron utilizando un espectrofluorómetro Aminco Bowman. Los parámetros instrumentales empleados fueron los siguientes: modo de fosforescencia, con un *delay* de 225 μs , un *gate* de 800 μs , un período mínimo de flash de 5 ms, una sensibilidad del tubo fotomultiplicador de 500 mV y con el detector en modo

enmascarado. En todos los casos se empleó una ranura de 8 nm para la excitación y de 16 nm para la emisión. La temperatura de las soluciones y del compartimiento de la celda se mantuvieron constante a 25°C por medio de la circulación de agua destilada desde un baño termostatzado.

Los espectros individuales de excitación se recolectaron a la longitud de onda de emisión de 545 nm. Para medir los tiempos de decaimiento, las longitudes de ondas de excitación y emisión fueron 271 nm y 545 nm, respectivamente, mientras que los *gates* de tiempo se variaron entre 225 y 800 μs cada 25 μs . Las matrices fueron obtenidas a una longitud de onda de emisión fija de 545 nm, usando longitudes de onda de excitación desde 240 nm hasta 350 nm cada 5 nm (23 datos) y los tiempos de decaimiento se registraron desde 225 hasta 800 μs cada 25 μs (24 datos), produciendo matrices de tamaño 23x24.

Optimización de la señal luminiscente

En general, las condiciones para generar la señal de luminiscencia sensibilizada de lantánidos de complejos con fluoroquinolonas se tomaron de la literatura.⁷⁷ Para corroborarlas, se llevaron a cabo optimizaciones univariadas; estas mediciones puntuales se realizaron a longitudes de onda de excitación y emisión fijas en 271 nm y 545 nm, respectivamente.

Se realizaron optimizaciones univariadas de las variables químicas que comúnmente tienen un efecto sobre la intensidad de la señal luminiscente; estas fueron: (1) la concentración de terbio (III), la cual se evaluó entre $2,0 \times 10^{-4}$ y $4,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (6 puntos), (2) la concentración del surfactante SDS, que se evaluó entre $6,0 \times 10^{-4}$ a $1,8 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (6 puntos), (3) la concentración del desoxigenante sulfito de sodio, que se evaluó entre $4,5 \times 10^{-3}$ y $1,5 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ (5 puntos), y (4) el pH, del que se estudiaron cuatro valores: 4,0, 5,5, 6,5 y 7,0.

Muestras de suero

Las muestras empleadas para la determinación de fluoroquinolonas en suero en presencia de salicilato se obtuvieron adicionando a distintos sueros alícuotas de las soluciones madre de fluoroquinolonas y salicilato. Se utilizaron 8

muestras de suero tomadas de voluntarios sanos. Las concentraciones del analito y de la interferencia fueron seleccionadas al azar dentro de sus rangos terapéuticos. Los sueros adicionados fueron desproteinizados con acetonitrilo en relación 1:2 y un volumen de sobrenadante apropiado (0,24 mL para ciprofloxacina y 0,20 mL para norfloxacina y danofloxacina) se colocó en un matraz volumétrico de 2,00 mL. Luego se agregaron las cantidades requeridas de las soluciones madre de terbio (III), SDS, sulfito de sodio y de la solución reguladora de ácido acético/acetato, y finalmente se llevó a volumen final con agua destilada, de manera de obtener concentraciones finales de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, $4,80 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, $7,50 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ y 0,10 mol L⁻¹, respectivamente. La solución se colocó en la cubeta y se midió la matriz de intensidad luminiscente en función de la excitación y de los tiempos de decaimiento. Posteriormente se realizaron tres adiciones de patrón sucesivas de solución madre del analito (cada una de 2,0 µL para ciprofloxacina y 2,8 µL para norfloxacina y danofloxacina), de manera que la concentración del analito se incrementara de la siguiente manera: 1) 0,10, 0,20 y 0,30 mg L⁻¹ para la ciprofloxacina y 2) 0,07, 0,14 y 0,21 mg L⁻¹ para norfloxacina y danofloxacina (los cambios de concentración producidos por la dilución fueron considerados despreciables). Después de cada adición, la muestra fue homogenizada y se registraron nuevamente las matrices. Los rangos de concentraciones finales para cada analito analizado fueron los siguientes (valores referidos a los medidos en la celda): ciprofloxacina, desde 0,00 hasta 0,24 mg L⁻¹, norfloxacina y danofloxacina, desde 0,00 hasta 0,20 mg L⁻¹, y la potencial interferencia salicilato, desde 4,00 hasta 12,00 mg L⁻¹. Se estimó en todos los casos una incertidumbre en la concentración del analito en el orden de $\pm 0,01$ mg L⁻¹. El grado de dilución del suero (1:25) fue tal que la máxima concentración de analito en suero fue de 6,00 mg L⁻¹ para las tres fluoroquinolonas y 300 mg L⁻¹ para salicilato. Todos los rangos de concentraciones están dentro de los valores terapéuticos de dichas drogas en suero humano.⁶⁷

UN NUEVO PROCEDIMIENTO DE RBL PARA DATOS CON DEPENDENCIA LINEAL. DETERMINACIÓN DE CIPROFLOXACINA EN ORINA Y SUERO

Datos simulados

Se emplearon datos simulados para ilustrar el comportamiento del nuevo algoritmo de calibración de segundo orden, una modificación del algoritmo U-PLS/RBL en la que el procedimiento RBL está modificado para incluir dependencia lineal (RBL-LD), y para comparar su rendimiento con otros algoritmos. En este sistema simulado, se consideró un único analito, presente en las muestras de calibración, mientras que en las muestras de validación se consideró además un componente adicional (interferente). De esta manera la solución correcta de este sistema requiere de la ventaja de segundo orden. Las matrices de datos (espectros en función del tiempo) fueron generadas a partir de los espectros y perfiles de tiempo que se muestran en la Figura 14A y B, respectivamente. Como se puede ver, los dos componentes tienen espectros idénticos pero diferentes perfiles de tiempo.

A partir de los perfiles mostrados en la Figura 14, se construyó un conjunto de 4 matrices de calibración que contienen sólo al analito en concentraciones nominales de 0,25; 0,50; 0,75 y 1,00 (en unidades arbitrarias). El tamaño de cada matriz fue de 50x40 (50 puntos correspondientes a la dimensión del tiempo y 40 a la dimensión espectral). También se creó un conjunto de 100 muestras de validación con concentraciones tomadas al azar en el rango 0-1 para el analito y en el rango 0,5-1,5 para la interferencia (para asegurarse de que todas las muestras contienen cantidades significativas del agente interferente). A todas estas señales de segundo orden se les agregó ruido de distribución gaussiana con una desviación estándar igual a 1% de la máxima señal de calibración.

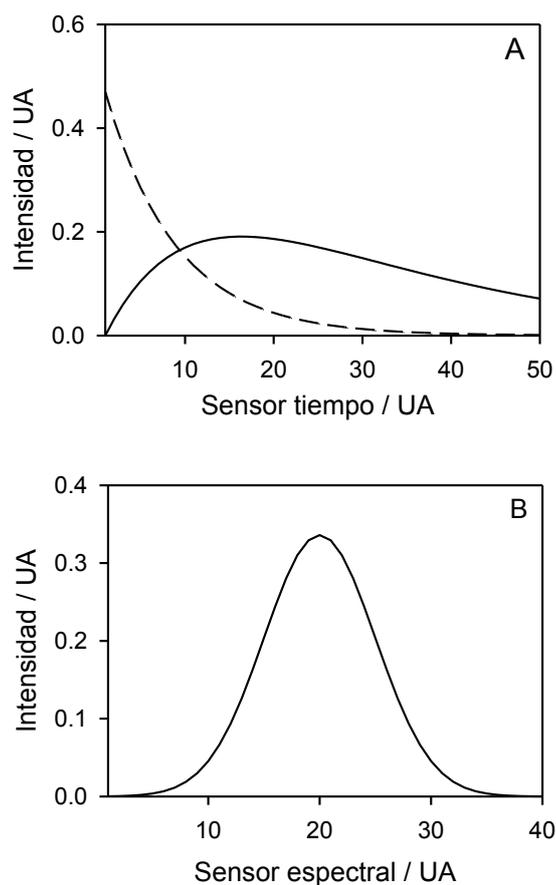


Figura 14. (A) Perfiles de tiempo utilizados en las muestras de simulación. (B) Perfiles espectrales. En ambos casos la línea sólida corresponde al analito y la línea de guión al potencial interferente. Todos los perfiles se normalizaron a longitud unitaria.

Para imitar a los experimentos analíticos reales, en los cuales la preparación de las muestras siempre acarrea algún grado de incertidumbre en la concentración final del analito, se adicionó ruido de distribución gaussiana con una desviación estándar de 0,01 unidades a las concentraciones nominales del analito, tanto en las muestras de calibración como de validación. Como la máxima concentración es 1 unidad, el nivel de incertidumbre introducido en la concentración de esta simulación es del 1%, análogo al utilizado en el caso del ruido de la señal.

Los datos de segundo orden para las 100 muestras de validación se unieron a aquellos del conjunto de calibración, y cada uno de los conjuntos de 5 muestras fue sometido a PARAFAC, U-PLS/RBL, PARALIND, MCR-ALS y a ambas versiones del nuevo U-PLS/RBL-LD. Las predicciones del analito fueron almacenadas para análisis estadísticos y futuras comparaciones.

Datos experimentales

Determinación de ciprofloxacina en orina a partir de señales quimioluminiscentes

Se midieron datos matriciales en función de la emisión quimioluminiscente y del tiempo dado por la reacción de rutenio con ciprofloxacina, en presencia de la interferencia producida por el fondo de las muestras de orina. Los espectros de emisión de quimioluminiscencia se midieron en el espectrómetro luminiscente Varian Cary Eclipse. Las medidas se realizaron empleando una celda de cuarzo de 10 mm. Los parámetros instrumentales empleados fueron los siguientes: ranura de emisión de 10 nm, rango de emisión de 550 a 650 nm cada 5 nm, ciclos de tiempo de 0,0 a 14,4 segundos registrados cada 0,48 segundos, sensibilidad del fotomultiplicador 880 mV, velocidad de barrido de 24000 nm min⁻¹. De esta forma, las matrices de datos de emisión-tiempo tienen un tamaño de 21x30 puntos. Todas las medidas fueron realizadas en una celda termostaticada a 20,0 ± 0,1 °C.

Selección del sistema quimioluminiscente

Para la generación de la señal quimioluminiscente se ensayaron, en primer lugar, reacciones de oxidación directas, empleando diferentes oxidantes fuertes: KMnO₄, cerio (IV) y H₂O₂. Estas reacciones emiten luz en tiempos demasiado cortos, no permitiendo la recolección de los datos matriciales, y presentando además muy poca señal, resultando en una baja sensibilidad. Por tal motivo, se buscó un sistema que presentara tiempos más largos de evolución de la emisión de quimioluminiscencia, en el orden de los segundos, permitiendo así la obtención de datos matriciales. El sistema seleccionado que cumple con este requisito se basa en la reacción de quimioluminiscencia del analito con tris (2,2'-bipiridil) dicloro-rutenio (II) y cerio (IV) en medio ácido.

En general, las condiciones para generar la señal de quimioluminiscencia de la ciprofloxacina se tomaron de la literatura.⁷⁷ Para corroborarlas, se llevaron a

cabo optimizaciones univariadas con diferentes muestras de orina; estas mediciones puntuales se realizaron a la longitud de onda de emisión fija de 610 nm durante un intervalo de tiempo desde los 0 a los 20 segundos. Para esto se analizaron las variables químicas que comúnmente tienen un efecto sobre la intensidad de la señal quimioluminiscente; estas fueron: (1) la concentración de $[\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]$, la cual se evaluó entre $2,0 \times 10^{-4}$ y $1,8 \times 10^{-3}$ mol L^{-1} , (2) la concentración de H_2SO_4 , que se evaluó entre 0,5 y 2,5 mol L^{-1} y (3) la concentración de cerio (IV), que se evaluó entre $5,0 \times 10^{-3}$ y $2,5 \times 10^{-2}$ mol L^{-1} .

Muestras de orina

Se prepararon 14 muestras de orina adicionadas de ciprofloxacina a partir de 7 orinas diferentes, libres de ciprofloxacina, provenientes de individuos saludables. Las alícuotas correspondientes de solución madre de ciprofloxacina se colocaron junto con 200 μL de orina, 400 μL de $[\text{Ru}(\text{bipi})_3^{2+}]$ y 500 μL de H_2SO_4 en un matraz volumétrico de 2,00 mL y finalmente se llevó a volumen con agua destilada. La solución se colocó en la cubeta de cuarzo, esta se introdujo en la celda termostaticada a $20,0 \pm 0,1$ °C y se la homogenizó con agitación magnética. Luego se inyectaron manualmente con una jeringa 300 μL de cerio (IV) en la cubeta e inmediatamente se midió la matriz de emisión de quimioluminiscencia en función del tiempo. El procedimiento antes descrito se repitió luego de cada adición de patrón realizada en la muestra, de manera que la concentración de ciprofloxacina se incrementara en 5,00, 10,00 y 15,00 mg L^{-1} con respecto a la concentración inicial. El rango de concentración final de analito analizado fue de 0,00 hasta 33,0 mg L^{-1} (valores referidos a los medidos en la celda). El grado de dilución de la orina (1:10) fue tal que la máxima concentración de analito en orina fuese de 180 mg L^{-1} de ciprofloxacina. El rango de concentración está dentro de los valores terapéuticos de dicha droga en orina humana.⁶⁷

Determinación de ciprofloxacina en suero a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos

La determinación de ciprofloxacina en suero a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos corresponde a los datos experimentales explicados anteriormente (página 46).

ALGORITMOS QUIMIOMÉTRICOS

ANÁLISIS PARALELO DE FACTORES (PARAFAC)

En este método multivariado los datos que corresponden a las I muestras de calibración son las matrices $\mathbf{X}_{i,cal}$ y por cada muestra desconocida la matriz \mathbf{X}_U . Estas pueden ser “apiladas” para formar un arreglo tridimensional \mathbf{X} . Si las matrices individuales son de un tamaño de $J \times K$, (donde J y K son los números de puntos en cada dimensión), las dimensiones de \mathbf{X} son $[(I+1) \times J \times K]$, (I = número de muestras de calibración). En el modelo de PARAFAC se define un elemento genérico X_{ijk} para el arreglo \mathbf{X} como:⁷⁸

$$X_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + E_{ij} \quad (3)$$

donde N es el número total de componentes, a_{in} es la concentración relativa del componente n en la i -ésima muestra, y b_{jn} y c_{kn} son las señales en la primera dimensión j y en la segunda dimensión k , respectivamente. Los valores de E_{ijk} son los elementos del arreglo \mathbf{E} de error residual (con las mismas dimensiones que \mathbf{X}). Los vectores columna \mathbf{a}_n , \mathbf{b}_n y \mathbf{c}_n son almacenados dentro de la matriz de los vectores de *scores* \mathbf{A} , y de carga o *loadings* \mathbf{B} y \mathbf{C} (en estos dos casos con las columnas normalizadas a la unidad).

El modelo descrito por la Ecuación (3) define la descomposición de \mathbf{X} , lo cual da acceso a los perfiles en ambas dimensiones de los datos (\mathbf{B} y \mathbf{C}) y también a las concentraciones relativas (\mathbf{A}) de los componentes individuales en las $(I + 1)$ mezclas, sean o no químicamente conocidos; esto nos provee la base

de la ventaja de segundo orden. La descomposición es usualmente llevada a cabo a través de un esquema de cuadrados mínimos alternantes.^{5,79} Los pasos relevantes a tener en cuenta al aplicar el modelo de PARAFAC para la calibración empleando datos tridimensionales son: 1) inicializar el algoritmo, 2) establecer el número de componentes, 3) identificar los componentes específicos a partir de la información provista por el modelo y 4) calibrar el modelo de forma de obtener concentraciones absolutas para los componentes particulares en una muestra desconocida.

La inicialización puede hacerse utilizando GRAM, que es la forma en que se implementa comúnmente PARAFAC. El número de componentes (N) puede ser estimado por distintas técnicas, una de ellas CORCONDIA, una herramienta diagnóstica de PARAFAC, que utiliza un parámetro interno conocido como *core consistency*.^{80,81} Otra técnica útil en PARAFAC es la consideración del error residual, por ejemplo, la desviación estándar de los elementos de \mathbf{E} en la Ecuación (3).⁵ Usualmente este parámetro decrece con el incremento de N , hasta que se estabiliza en un valor compatible con el ruido instrumental (este último puede ser calculado por las mediciones replicadas del blanco). Una elección razonable de N es el menor número para el cual el error residual no es estadísticamente diferente al ruido instrumental.

La identificación del analito de interés se realiza con ayuda de los perfiles estimados en ambas dimensiones, que se comparan con los obtenidos para una solución estándar del analito de interés. Esto es necesario ya que los componentes provistos por la descomposición de \mathbf{X} son seleccionados según su contribución a la variancia espectral total, y este orden no es necesariamente mantenido cuando se cambia la muestra incógnita.

Las concentraciones absolutas de los analitos son obtenidas luego de la calibración, porque la descomposición de los datos tridimensionales sólo provee valores de concentraciones relativas (\mathbf{A}). La calibración se realiza mediante la medición de un conjunto de muestras de calibración de concentraciones conocidas del analito (contenidas en un vector \mathbf{y} de dimensiones $l \times 1$) y la regresión de los primeros elementos l de la columna \mathbf{a}_n en función de \mathbf{y} :

$$k = \mathbf{y}^+ \times [\mathbf{a}_{1n} \mid \dots \mid \mathbf{a}_{ln}] \quad (4)$$

donde '+' implica la operación pseudo-inversa. La conversión de concentraciones relativas a absolutas de n en la muestra incógnita se obtiene al dividir el último elemento de la columna \mathbf{a}_n [$a_{(j+1)n}$] por la pendiente del gráfico de calibración (k):

$$y_u = a_{(j+1)n} / k \quad (5)$$

El procedimiento anteriormente descrito se repite para cada una de las muestras analizadas.

PARAFAC PARA SISTEMAS CON DEPENDENCIA LINEAL (PARALIND)

Este método es una versión modificada de PARAFAC, que tiene en cuenta la dependencia lineal entre los perfiles de los componentes; esto implica la descomposición de la matriz de datos tridimensional en cuatro matrices en lugar de tres. El siguiente es un modelo para una matriz de datos única \mathbf{X} , de tamaño $J \times K$, donde J y K son los números de canales instrumentales en la primera y segunda dimensión:

$$\mathbf{X} = \mathbf{B} \mathbf{H} \mathbf{Y} \mathbf{C}^T + \mathbf{E} \quad (6)$$

donde las cuatro matrices relevantes son: 1) \mathbf{B} , matriz de *loadings* de la primera dimensión (de tamaño $J \times N$, donde N es el número total de componentes), 2) \mathbf{H} , matriz que incorpora la dependencia lineal en el modelo (de tamaño $N \times M$, donde M es el número de perfiles únicos en la segunda dimensión), 3) \mathbf{Y} , matriz diagonal (de tamaño $N \times N$) de los *scores* de las muestras, conteniendo en la diagonal las concentraciones relativas de todos los componentes de la muestra y 4) \mathbf{C} , matriz de *loadings* únicos en la segunda dimensión (de tamaño $K \times M$). La matriz \mathbf{E} contiene los errores del modelo. Las diagonales de las matrices \mathbf{Y} de cada muestra se recogen en la matriz de *scores* \mathbf{A} (de tamaño $I \times N$, donde I es el número de muestras). En los casos en los cuales se encuentran dos componentes que presentan perfiles idénticos en la segunda dimensión de los datos pero diferentes en la primera, \mathbf{B} contiene dos columnas (correspondientes a

cada uno de los perfiles de los componentes distinguibles en la primera dimensión), pero **C** contiene únicamente un perfil (perfil común para ambos componentes en la segunda dimensión). Inicialmente la matriz **H** presenta la siguiente forma:

$$\mathbf{H} = \begin{bmatrix} 1 \\ 1 \end{bmatrix} \quad (7)$$

Esta matriz interviene en el producto matricial ($\mathbf{H}\mathbf{C}^T$) para producir dos *loadings* idénticos en la segunda dimensión o dimensión K (ver Ecuación (6)). Durante el ajuste de PARALIND, se imponen restricciones de no-negatividad a los elementos de todas las matrices para recuperar *scores* y *loadings* con significado físico. La inicialización de PARALIND se puede hacer usando *scores* y *loadings* conocidos o con matrices de dimensiones adecuadas que contengan números al azar.

CUADRADOS MÍNIMOS PARCIALES DESDOBLADOS ACOPLADOS A LA BILINEALIZACIÓN RESIDUAL (U-PLS/RBL)

El procedimiento U-PLS desdobra en primer lugar los datos de calibración de segundo orden en vectores.¹⁷ Luego utiliza la información de la concentración del analito para calibrar un modelo sin incluir datos de la muestra desconocida. Con las matrices de datos de calibración I_{cal} , todas desdobladas en vectores de tamaño $JK \times 1$, y el vector de concentraciones de calibración, \mathbf{y} (de tamaño $I_{cal} \times 1$), se construye un modelo habitual PLS. Este proporciona un conjunto de *loadings* **P** y *loadings pesados* **W** (ambos de tamaño $JK \times A$, donde A es el número de factores latentes), así como también coeficientes de regresión, \mathbf{v} (de tamaño $A \times 1$).

El parámetro A puede ser seleccionado por la técnica de validación cruzada,⁸² en la cual cada una de las muestras del conjunto de calibración es dejada afuera y su concentración es predicha usando el modelo construido con las demás muestras.

Si no aparecen componentes inesperados en la muestra incógnita, \mathbf{v} puede ser utilizada para estimar la concentración del analito de acuerdo con:

$$y_u = \mathbf{t}_u^T \mathbf{v} \quad (8)$$

donde \mathbf{t}_u es el *score* de la muestra, obtenido por proyección de los datos vectorizados de la muestra, $\text{vec}(\mathbf{X}_u)$, en el espacio de los factores latentes A :

$$\mathbf{t}_u = (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u) \quad (9)$$

donde $\text{vec}(\cdot)$ es el operador de vectorización.

Cuando aparecen componentes inesperados en \mathbf{X}_u , los *scores* de la muestra dados por la Ecuación (9) son inadecuados para la predicción del analito con la Ecuación (8). En este caso, los residuos de la etapa de predicción de U-PLS [s_p , Ecuación (10)] serán anormalmente grandes en comparación con el nivel de ruido instrumental:

$$\begin{aligned} s_p &= \|\mathbf{E}_p\| / (JK-A)^{1/2} \\ &= \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} (\mathbf{W}^T \mathbf{P})^{-1} \mathbf{W}^T \text{vec}(\mathbf{X}_u)\| / (JK-A)^{1/2} \\ &= \|\text{vec}(\mathbf{X}_u) - \mathbf{P} \mathbf{t}_u\| / (JK-A)^{1/2} \end{aligned} \quad (10)$$

donde $\|\cdot\|$ indica la norma Euclidiana.

Para resolver la presencia de componentes inesperados, la bilinealización residual recurre al análisis de componentes principales (PCA) de estos componentes, por minimización de los residuos calculados mientras se ajustan los datos de la muestra a la suma de las contribuciones relevantes.^{21,22}

$$\mathbf{X}_u = \text{reshape}(\mathbf{P} \mathbf{t}_u) + \mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T + \mathbf{E}_u \quad (11)$$

donde 'reshape' indica la transformación de un vector $JK \times 1$ a una matriz $J \times K$ y las matrices \mathbf{B}_{unx} , \mathbf{G}_{unx} y \mathbf{C}_{unx} son obtenidas por descomposición de valores singulares (SVD) de la matriz de errores \mathbf{E}_p :

$$\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{G}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T = \text{SVD}(\mathbf{E}_p) \quad (12)$$

donde \mathbf{E}_p es la matriz de tamaño $J \times K$ de la Ecuación (10) y SVD indica que se toma el primer componente principal.

Durante el procedimiento de RBL, los *loadings* se mantienen constantes en los valores de calibración, y \mathbf{t}_u varía hasta que el error residual $\|\mathbf{E}_u\|$ se minimiza en la Ecuación (11) utilizando el procedimiento de Gauss-Newton. Una vez hecho esto, la concentración del analito es calculada por la Ecuación (8), introduciendo el vector final de \mathbf{t}_u encontrado por el procedimiento de RBL.

El propósito de RBL es la minimización del error residual s_u hasta un nivel compatible con el grado de ruido presente en las mediciones, con s_u dado por:

$$s_u = \|\mathbf{E}_u\| / (JK)^{1/2} \quad (13)$$

Para lograr este objetivo, se debe explorar el número posible de interferencias y seleccionar el modelo más simple que nos proporcione un valor residual s_u que no sea estadísticamente diferente que el menor de los ruidos instrumentales. Debemos notar que aparecen dos parámetros de residuos diferentes en lo discutido anteriormente, que no debemos confundir: s_p [Ecuación (10)] corresponde a la diferencia entre la señal de las muestras de validación y el modelo de U-PLS antes del procedimiento con RBL, mientras que s_u [Ecuación (13)] surge después del modelado de los efectos interferentes con RBL. Por lo tanto, este último debe ser comparable con el nivel de ruido instrumental si RBL es satisfactorio.

CUADRADOS MÍNIMOS PARCIALES MULTIDIMENSIONALES ACOPLADOS A LA BILINEALIZACIÓN RESIDUAL (N-PLS/RBL)

El método N-PLS se aplica a los datos de segundo orden de manera similar que el método desdoblado U-PLS, pero las matrices de datos originales no son desdobladas. Durante la etapa de calibración, se obtienen dos conjuntos de *loadings* \mathbf{W}^j y \mathbf{W}^k (de tamaños $J \times A$ y $K \times A$, donde A es el número de factores latentes) así como el vector de coeficientes de regresión \mathbf{v} (de tamaño $A \times 1$).^{80,82} Cuando están presentes componentes inesperados en las muestras de validación, los *scores* de estas últimas son inadecuados para predecir al analito

con la Ecuación (8), página 57. Los residuos del modelo N-PLS para las señales de las muestras de validación [s_p , ver más abajo la Ecuación (14)], van a ser anormalmente grandes en comparación con el nivel de ruido instrumental típico:

$$\begin{aligned} s_p &= \| \mathbf{E}_p \| / (JK-A)^{1/2} \\ &= \| \mathbf{X}_u - \text{reshape}\{t_u[(\mathbf{W}^j|\otimes|\mathbf{W}^k)]\} \| \hat{\mathbf{X}}_u \| / (JK-A)^{1/2} \end{aligned} \quad (14)$$

donde $\hat{\mathbf{X}}_u$ es la matriz de datos de la muestra \mathbf{X}_u reconstruida por el modelo N-PLS.

La situación es tratada de una manera similar a la discutida anteriormente para U-PLS/RBL, por minimización de los residuos calculados mientras se ajustan los datos de la muestra a la suma de las contribuciones relevantes:

$$\mathbf{X}_u = \text{reshape}\{t_u[(\mathbf{W}^j|\otimes|\mathbf{W}^k)]\} + \text{SVD}(\hat{\mathbf{X}}_u - \mathbf{X}_u) + \mathbf{E}_u \quad (15)$$

donde $|\otimes|$ es el operador Kathri-Rao.⁸⁰ Durante el procedimiento RBL, los *loadings* \mathbf{W}^j y \mathbf{W}^k se mantienen constantes en los valores de calibración y t_u varía hasta que el error residual s_u se minimiza usando el procedimiento de Gauss-Newton, con s_u dado por una ecuación análoga a la Ecuación (13).

Una vez que esto es realizado, se introduce el vector final t_u encontrado por el procedimiento RBL en una ecuación análoga a la Ecuación (8), para poder determinar la concentración del analito.

RESOLUCIÓN MULTIVARIADA DE CURVAS ACOPLADA A CUADRADOS MÍNIMOS ALTERNANTES (MCR-ALS)

En este método multivariado de segundo orden, se crea una matriz de datos aumentada a partir de la matriz de la muestra incógnita y: (1) las matrices de calibración en el modo de calibración externa, o (2) las matrices de adición de patrón. Si las matrices son de tamaño $J \times K$, J es el número de puntos de la primera dimensión y K el número de puntos de la segunda dimensión. El aumento puede ser llevado a cabo en la dirección de las columnas o en la dirección de las

filas, dependiendo del tipo de experimento que se va a analizar y también de la presencia de solapamiento severo en uno de los modos. Aumentando en la dirección de las columnas, la descomposición bilineal de la matriz aumentada se realiza de acuerdo a la siguiente expresión:

$$\mathbf{D} = \mathbf{G} \mathbf{S}^T + \mathbf{E} \quad (16)$$

donde las filas de \mathbf{D} contienen las señales en la primera dimensión para diferentes muestras a distintos valores de la segunda dimensión, las columnas de \mathbf{G} contienen las señales de las especies intervinientes, las filas de \mathbf{S}^T las señales en la segunda dimensión y \mathbf{E} es una matriz de residuos no ajustados por el modelo. La Figura 15 muestra un esquema ilustrativo de la descomposición de la matriz \mathbf{D} .

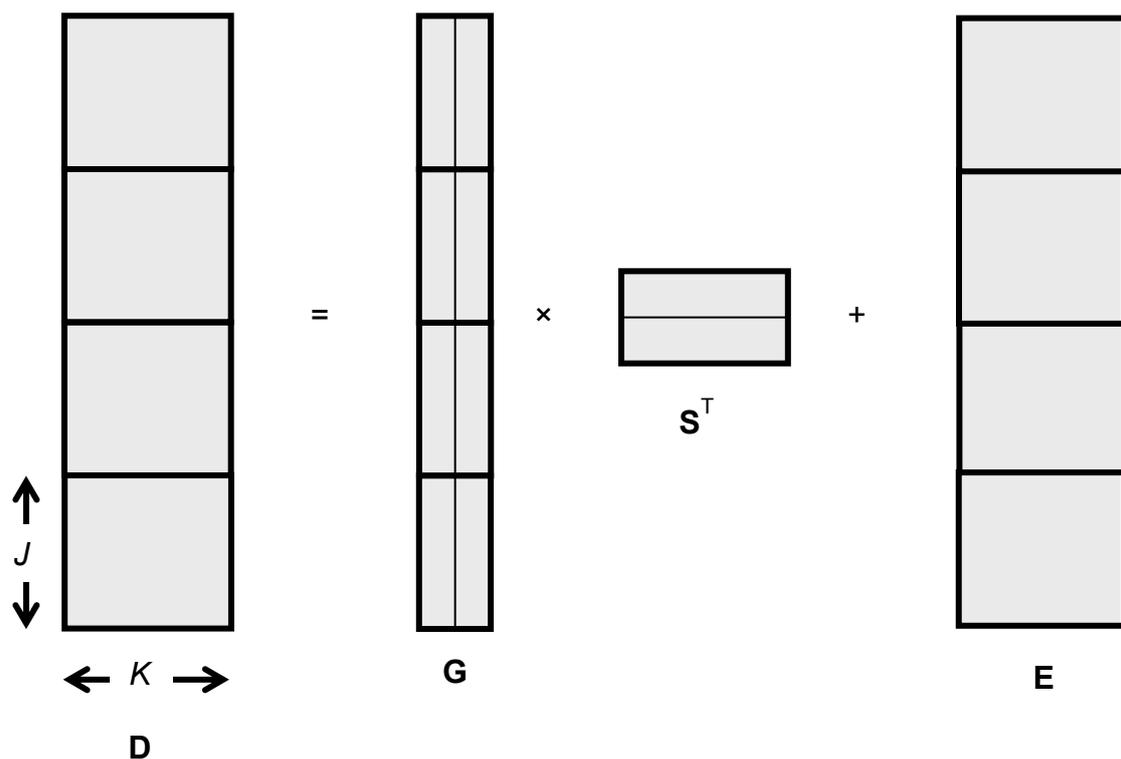


Figura 15. Esquema ilustrativo de la descomposición de la matriz \mathbf{D} [Ecuación (16)] por MCR-ALS. Los rectángulos grises uno debajo del otro representan las matrices de datos de las muestras de cada experimento, contenidas en \mathbf{D} . La matriz \mathbf{G} se contiene las señales en la primera dimensión para muestras de dos componentes, mientras que \mathbf{S}^T contiene dos filas, cada una describe las señales en la segunda dimensión de los componentes de la muestra.

Las dimensiones apropiadas de **D**, **G**, **S** y **E** son $(IJ) \times K$, $(IJ) \times N$, $K \times N$ y $(IJ) \times K$, respectivamente (I es el número total de muestras en la matriz **D** y N el número de componentes). La descomposición de **D** es obtenida por minimización de cuadrados mínimos de la norma de Frobenius de **E**. La minimización comienza al suministrar perfiles estimados de los componentes, los cuales son utilizados para estimar $\hat{\mathbf{G}}$ (el 'sombrero' implica matriz estimada) a partir de la Ecuación (16):

$$\hat{\mathbf{G}} = \mathbf{D} (\mathbf{S}^T)^+ \quad (17)$$

donde '+' indica la inversa generalizada. Con la matriz $\hat{\mathbf{G}}$ de la Ecuación (17) y la matriz de datos original **D**, la matriz **S** es re-estimada por mínimos cuadrados:

$$\hat{\mathbf{S}} = \mathbf{D}^T (\hat{\mathbf{G}}^+)^T \quad (18)$$

y finalmente **E** es calculado de la Ecuación (16) usando **D** y las matrices estimadas $\hat{\mathbf{G}}$ y $\hat{\mathbf{S}}$. Estos pasos se repiten hasta que el proceso converge, bajo adecuadas restricciones durante el proceso ALS: no-negatividad en ambas dimensiones de los datos. Es importante señalar que MCR-ALS requiere inicialización con parámetros tan cerca como sea posible a los resultados finales. Estos pueden proveerse, por ejemplo, en forma de espectros de las especies, obtenidos de soluciones patrón de cada analito puro, o del análisis llamado *purest*,⁸³⁻⁸⁵ basado en la metodología SIMPLISMA (análisis de mezclas por automodelado iterativo simple), un algoritmo de resolución multivariada de curvas que extrae espectros de los componentes puros a partir de una serie de espectros de mezclas de composición variable.⁸³ Unimodalidad y clausura son restricciones adicionales que pueden ser aplicadas a perfiles que tienen un único máximo y para cumplir las ecuaciones químicas de balance de masa entre diferentes especies químicas en equilibrio o en cinéticas, respectivamente. Finalmente, la correspondencia entre las especies y la matriz de datos puede ser establecida porque el modelo puede estar restringido de modo que el analito esté ausente en la matriz residual \mathbf{E}_p y el agente interferente esté ausente en las matrices de calibración.

Después que MCR-ALS descompone **D**, la información de concentración contenida en **G** puede ser usada para predicciones cuantitativas: primero se

define el *score* de concentración del analito como el área bajo el perfil para la i -ésima muestra:

$$a(i,n) = \sum_{j=1+(i-1)J}^{iJ} G(j,n) \quad (19)$$

donde $a(i,n)$ es el *score* para el componente n en la muestra i . Los *scores* son utilizados para construir un gráfico de calibración pseudo-univariada en función de la concentración de analito, prediciendo la concentración en la muestra incógnita de la manera univariada usual.

U-PLS/RBL MODIFICADO PARA INCLUIR DEPENDENCIA LINEAL (U-PLS/RBL-LD)

En este trabajo de tesis se propone un nuevo procedimiento RBL para la dependencia lineal. Este es similar al método RBL clásico, que minimiza la norma del vector de residuos (\mathbf{e}_u) calculado mediante el ajuste de los datos de validación a la suma de las contribuciones relevantes (por ejemplo, la parte que es modelada por la calibración y la contribución de los agentes interferentes) pero teniendo en cuenta los perfiles idénticos en una de las dimensiones de los datos. Esto puede hacerse modelando los residuos con MCR-ALS o con PARALIND, como se explicará a continuación.

RBL-LD usando MCR-ALS

Una alternativa para modelar la contribución de los agentes interferentes es utilizar MCR-ALS, formalmente expresado como en la siguiente ecuación:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{S}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T] + \mathbf{E}_u \quad (20)$$

El nuevo método RBL-LD modela las señales de los agentes interferentes con el producto de las matrices \mathbf{S}_{unx} y \mathbf{C}_{unx} que contienen el perfil de la primera

dimensión y la concentración del agente interferente, respectivamente. Estos son recuperados con el análisis de MCR-ALS de una matriz de datos aumentada \mathbf{D} [de tamaño $J \times (1+I_{cal})K$], constituida por la aumentación de la matriz de residuos con las I_{cal} matrices de calibración $\mathbf{X}_{cal,i}$:

$$\mathbf{D} = [\mathbf{E}_p \mid \mathbf{X}_{cal,1} \mid \mathbf{X}_{cal,2} \mid \dots \mid \mathbf{X}_{cal,I_{cal}}] \quad (21)$$

donde \mathbf{E}_p es la matriz residual $J \times K$ obtenida luego de reorganizar el vector $JK \times 1$ \mathbf{e}_p de la Ecuación (10). La dirección de aumentación de la matriz se supone que corresponde a los canales K (la dimensión que tiene perfiles idénticos de los componentes).

Luego, la descomposición de la matriz \mathbf{D} es llevada a cabo por el siguiente modelo de cuadrados mínimos:

$$\mathbf{D} = \mathbf{S}_{unx} \mathbf{G}_{unx}^T + \mathbf{E}_{MCR} \quad (22)$$

donde \mathbf{S}_{unx} y \mathbf{G}_{unx} contienen los perfiles de ambas dimensiones [de tamaño $J \times (A+N_{RBL-LD})$ y $K(1+I_{cal}) \times (A+N_{RBL-LD})$ respectivamente, donde N_{RBL-LD} es el número de componentes interferentes]. La matriz \mathbf{E}_{MCR} contiene los errores no ajustados por el modelo MCR. La matriz \mathbf{G}_{unx} contienen $(1+I_{cal})$ sucesivos perfiles de los componentes, cada uno de tamaño $K \times (A+N_{RBL-LD})$. La primera sub-matriz de \mathbf{G}_{unx} corresponde al perfil en la matriz \mathbf{E}_p y las restantes a aquellos de las sucesivas matrices de calibración:

$$\mathbf{G}_{unx} = \begin{bmatrix} \mathbf{C}_{unx} \\ \mathbf{C}_{cal,1} \\ \mathbf{C}_{cal,2} \\ \dots \\ \mathbf{C}_{cal,I_{cal}} \end{bmatrix} \quad (23)$$

Está claro que para estimar la contribución adecuada de los componentes inesperados en la Ecuación (20), sólo se necesita la matriz \mathbf{C}_{unx} , en la cual los perfiles de concentración correspondientes a los analitos se fijan en cero, gracias

a la correspondencia de especies. Por lo tanto, es irrelevante si estos perfiles del analito se dejan en \mathbf{C}_{unx} cuando se insertan en la Ecuación (23).

El modelo de MCR-ALS de la Ecuación (22) puede ser inicializado usando una estimación de los perfiles espectrales o de concentración para cada especie interviniente. Diferentes métodos se pueden usar para este propósito, como el análisis de factor evolutivo⁸⁶ o la determinación de las variables a través de *purest*,⁸³⁻⁸⁵ dependiendo de la estructura de los datos. Este procedimiento puede proporcionar espectros iniciales o concentraciones.

Durante el ajuste de la Ecuación (22), se pueden aplicar restricciones, tales como no-negatividad, unimodalidad, clausura, etc., las cuales son regularmente utilizadas en MCR-ALS. Estas ayudan a mejorar las soluciones, dándoles significado físico y a limitar el número posible de soluciones para el ajuste de los datos.⁸⁷ Las iteraciones continúan hasta que se obtiene una solución óptima que cumpla con las restricciones postuladas y el criterio de convergencia establecido. Restricciones de no-negatividad se aplican a los perfiles de concentración debido a que las concentraciones de las especies químicas son siempre valores positivos o cero.

Durante el procedimiento RBL-LD aplicado en la Ecuación (20), \mathbf{P} es mantenido constante en los valores de calibración y \mathbf{t}_u es variable hasta que $\|\mathbf{E}_u\|$ es minimizada usando el procedimiento Gauss-Newton. Una vez que $\|\mathbf{E}_u\|$ es minimizada, las concentraciones del analito son provistas por la Ecuación (8) al introducir el vector final \mathbf{t}_u encontrado por el procedimiento RBL-LD. El proceso completo se desarrolla mediante un esquema ilustrativo en la Figura 16.

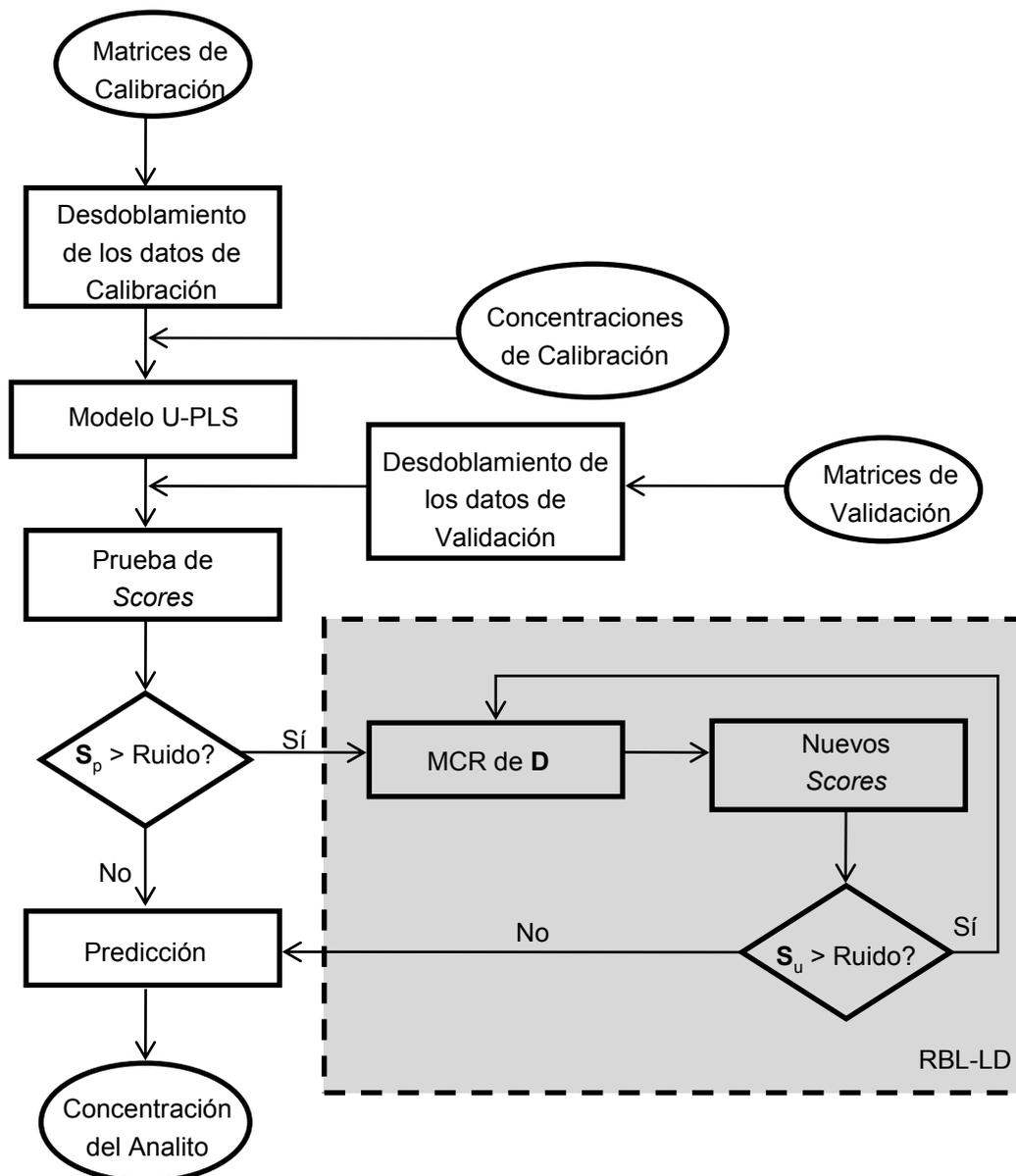


Figura 16. Esquema ilustrativo de cómo funciona el nuevo método U-PLS/RBL-LD.

Cuando sólo está presente una interferencia, el análisis de RBL-LD provee perfiles reales del agente interferente en ambas dimensiones de los datos. Sin embargo, cuando hay interferentes adicionales, los perfiles recuperados no se parecen a los verdaderos perfiles. Por ejemplo, si ocurre que dos o más interferentes tienen el mismo perfil en una de las dimensiones de los datos, estos van a ser interpretados como un único componente y los perfiles recuperados en esta dimensión específica va a estar compuesto de combinaciones lineales en lugar del espectro del componente puro.

El objetivo que persigue el procedimiento RBL-LD es el de minimizar los errores residuales s_u a un nivel compatible con el grado del ruido presente en las señales medidas, con s_u dada por:

$$s_u = || \mathbf{E}_u || / [(J - N_{\text{RBL-LD}})(K - N_{\text{RBL-LD}}) - A]^{1/2} \quad (24)$$

Por lo tanto, si se considera más de un interferente, RBL-LD debe seleccionar el modelo más simple que provea un valor residual que no sea estadísticamente diferente del mínimo.⁸⁸

Se debe aclarar que la presente descripción del procedimiento U-PLS/RBL-LD es completamente general, en el sentido de que esta puede ser aplicada en casos en donde la selectividad es lograda en ambas dimensiones de los datos. Lo nuevo en este modelo RBL-LD es que puede ser aplicado en casos que presentan pérdida de selectividad en una de las dimensiones de los datos, particularmente entre el analito y la interferencia, lo cual no es contemplado por el método clásico RBL.

RBL-LD usando PARALIND

Una segunda alternativa para RBL-LD es modelar la contribución del agente interferente con PARALIND. En este caso, en lugar de construir una matriz aumentada, se construye un arreglo tridimensional con la matriz \mathbf{E}_p y las matrices de calibración. Este se descompone usando PARALIND, como se describió anteriormente. Luego se seleccionan los *loadings* y los *scores* del agente interferente y se los incluye en el modelo RBL:

$$\text{vec}(\mathbf{X}_u) = \mathbf{P} \mathbf{t}_u + \text{vec}[\mathbf{B}_{\text{unx}} \mathbf{Y}_{\text{unx}} \mathbf{H}_{\text{unx}} (\mathbf{C}_{\text{unx}})^T] + \mathbf{E}_u \quad (25)$$

donde \mathbf{B}_{unx} , \mathbf{Y}_{unx} , \mathbf{H}_{unx} y \mathbf{C}_{unx} tienen el mismo significado que en la Ecuación (6), pero contienen sólo información respecto del agente interferente en la muestra incógnita.

Como antes, durante la aplicación de este modelo, la matriz de calibración \mathbf{P} se mantiene constante y t_u varía hasta minimizar $\|\mathbf{E}_u\|$. La cuantificación del analito se realiza empleando la Ecuación (8), página 57.

ALGORITMOS DE SEGUNDO ORDEN CON ADICIÓN DE PATRÓN

En el caso de PARAFAC, cuando se aplica en el modo usual de adición de patrón, aquí llamado modo 1, se construye un arreglo de tercer orden con una matriz de datos para la muestra incógnita y las correspondientes a las de adición de patrón. La Figura 17A muestra un esquema de las matrices de datos, las cuales están ensambladas para el análisis con PARAFAC. La descomposición resulta en los *scores* o concentraciones relativas (usualmente la matriz \mathbf{A} contiene los *scores*, de tamaño $I \times N$, donde I es el número de muestras y N el número de componentes que dan respuesta). La descomposición es lograda por la inicialización del algoritmo con los *scores* y los *loadings* provistos por: 1) DTLD,¹⁶ o 2) los mejores resultados de un pequeño número de corridas, incluyendo los resultados de DTLD y vectores compuestos de números al azar. Existe la posibilidad de aplicar restricciones de no-negatividad a los tres modos durante la fase de ajuste por cuadrados mínimos.

En el modo 1 de calibración, los *scores* del analito son usados para construir un gráfico de calibración pseudo-univariado de adición de patrón en función de la concentración adicionada de analito, prediciendo la concentración en las muestras incógnita de la manera univariada usual.⁷³

$$[a(1,n) \mid a(2,n) \mid \dots \mid a(I,n)] = m_1 [0 \mid \mathbf{y}^T] + n_1 \quad (26)$$

$$y_u = n_1 / m_1 \quad (27)$$

donde n indica al analito, y_u es la concentración predicha e \mathbf{y} el vector [de tamaño $(I-1) \times 1$] de concentraciones nominales adicionadas a la muestra, suponiendo que la muestra número 1 es la muestra incógnita y las muestras 2... I son las de adición de patrón. Como se ha discutido recientemente, en estos casos los *scores* para los interferentes son constantes en todas las muestras y por lo tanto las

columnas correspondientes de la matriz \mathbf{A} son linealmente dependientes.⁷ Uno de los propósitos de esta simulación es investigar los límites en la aplicabilidad de PARAFAC con adición de patrón para este tipo de problema analítico, probando diferentes condiciones de inicialización y restricciones de no-negatividad durante la etapa de ajuste por cuadrados mínimos. Se ha recomendado PARALIND para el modo de adición de patrón de segundo orden.⁷ La fase analítica que sigue a la descomposición de PARALIND es análoga a la discutida anteriormente para PARAFAC.

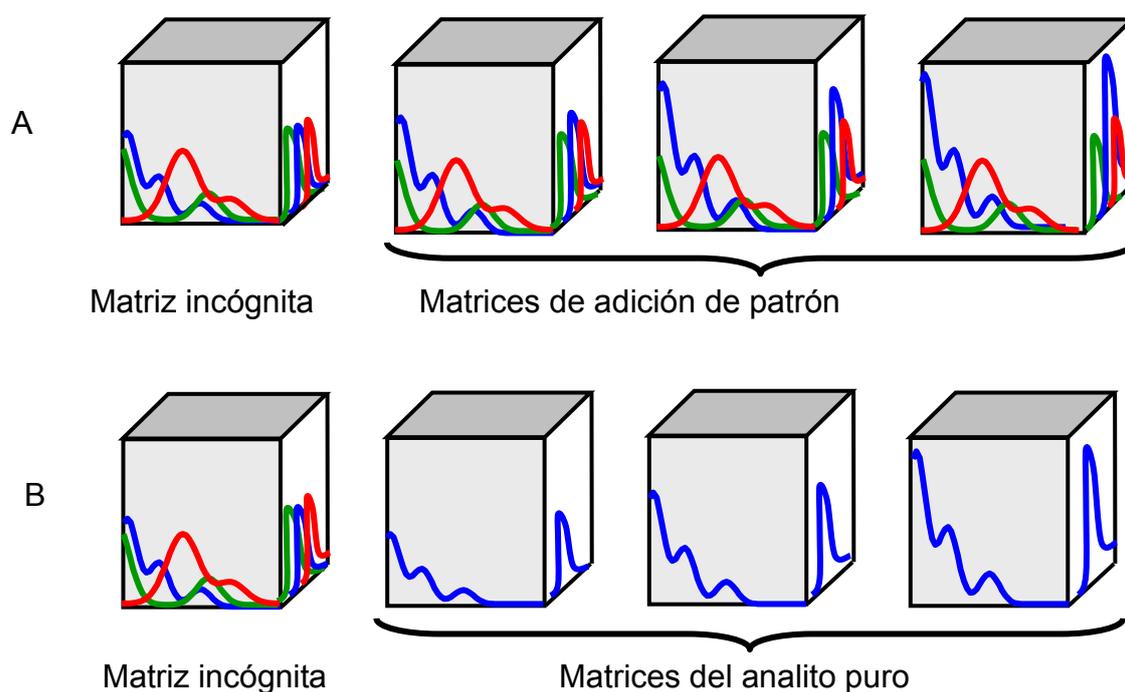


Figura 17. Representación esquemática de ambos modos de adición de patrón. (A) modo usual o modo 1, donde las matrices a ser analizadas son la matriz de datos de la muestra incógnita y las matrices de adición de patrón. Las líneas azul, roja y verde representan los perfiles en ambas dimensiones del analito y de los dos interferentes, respectivamente. Por lo tanto, todas las matrices contienen la misma cantidad de interferente (rojo y verde), mientras que la señal del analito (azul) se incrementa de izquierda a derecha. (B) modo modificado o modo 2, donde la matriz de datos de la muestra incógnita es analizada junto con las matrices del analito puro. Aquí, sólo la matriz incógnita contiene a los tres componentes.

En el modo de adición de patrón modificado o modo 2, la matriz de datos de la muestra incógnita es substraída digitalmente de cada una de las matrices de adición de patrón, creando una nueva serie de datos comprendida por la matriz

desconocida y las matrices de datos que representan la contribución del analito puro inmersa en la señal de fondo de la muestra. Las correspondientes matrices son esquematizadas en la Figura 17B; con estas matrices se crean nuevos datos de tres vías, que serán descompuestos por PARAFAC. La cuantificación es posible usando el modo de calibración usual:

$$[a(2,n) | a(3,n) | \dots | a(l,n)] = m_2 \mathbf{y}^T + n_2 \quad (28)$$

$$y_u = [a(1,n) - n_2] / m_2 \quad (29)$$

En este modo, los *scores* de los interferentes no son linealmente dependientes, ya que están ausentes en las matrices artificiales del analito puro. Sin embargo, cuando una muestra incógnita tiene más de un interferente, el ajuste de PARAFAC lleva a combinaciones lineales de los *scores* y *loadings* de los interferentes. Esto no implica que la cuantificación del analito no sea posible; los perfiles de los analitos son correctamente recuperados, lo que se consigue con condiciones de inicialización adecuadas y restricciones de no-negatividad en los tres modos de PARAFAC.

Cuando se aplica MCR-ALS a este tipo de problema, la implementación de ambos modos de adición de patrón es análoga a PARAFAC, como se describió anteriormente en detalle. En el nuevo modo de adición de patrón o modo 2, se pueden aplicar restricciones adicionales durante la minimización de ALS, denominada correspondencia entre componentes y muestras, que contiene información de si un dado componente está presente o ausente en cierta muestra. En este caso, la interferencia sólo está presente en la muestra incógnita y esta información es valiosa durante la descomposición de la matriz de datos aumentada.

Finalmente, la aplicación de U-PLS/RBL y N-PLS/RBL para datos de adición de patrón sólo es posible la calibración en el modo 2. La implementación es por lo tanto análoga a la detallada en detalle en la referencia 22.

SOFTWARE

Todas las rutinas empleadas en el presente trabajo están escritas en MATLAB.⁸⁹ Aquellas que aplican PARAFAC, PARALIND y N-PLS (sin la ventaja de segundo orden provista por RBL) pueden descargarse de Internet gracias a Bro (<http://www.models.kvl.dk/source/>). N-PLS/RBL está disponible en Internet (www.chemometry.com), incluyendo una interfaz gráfica útil para los datos de entrada y para los parámetros ajustados por MVC2,⁹⁰ disponibles en Internet (<http://www.chemometry.com/Index/Links%20and%20downloads/Programs.htm>), similar al utilizado para la calibración multivariada de primer orden (MVC1).⁹¹ El programa MVC2 también implementa las combinaciones de N-PLS/RBL y U-PLS/RBL. El análisis multivariado con MCR-ALS⁹² se aplicó con la interfaz gráfica provista por Tauler, disponible en el Internet (<http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>). El nuevo método U-PLS/RBL-LD se implementó usando rutinas propias.

RESULTADOS

RESUMEN DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

A continuación se presenta en la Tabla 2 un resumen de los sistemas estudiados en la presente Tesis, en la que se sintetizan el problema analítico y quimiométrico planteado, el tipo de datos y los algoritmos multivariados utilizados. Estos sistemas se discutirán en detalle en las siguientes secciones.

Tabla 2. Resumen de los sistemas estudiados.

Problema analítico	Sistema	Tipo de datos	Problema quimiométrico	Algoritmos utilizados
Determinación de ácido benzoico en presencia de sacarina en jugos de fruta	Real	Experimentales. Matrices de luminiscencia sensibilizada de lantánidos en función de la longitud de onda de excitación y los tiempos de decaimiento	Los modos de excitación y el tiempo de decaimiento proveen selectividad, aunque con un alto grado de solapamiento	PARAFAC y N-PLS/RBL
Determinación de carbidopa en presencia de levodopa como potencial interferente	Modelo	Simulados y experimentales. Matrices de datos cinéticos en función de la longitud de onda de emisión y del tiempo	Solapamiento espectral extremo de ambos componentes, (espectros de emisión idénticos, pero diferentes velocidades de reacción)	PARAFAC, GRAM, U-PLS/RBL y MCR-ALS

Determinación de salicilato en presencia de naproxeno en suero	Modelo	Simulados y experimentales. Matrices de fluorescencia en función de la longitud de onda de excitación y de la longitud de onda de emisión	Solapamiento espectral en ambas dimensiones. Requerimiento de adición de patrón	PARAFAC, PARALIND, MCR-ALS, U-PLS/RBL y N-PLS/RBL en los diferentes modos de adición de patrón
Determinación de danofloxacina en presencia de salicilato en suero				
Determinación de fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina) en suero, en presencia de salicilato como un potencial interferente	Real	Simulados y experimentales. Matrices de luminiscencia sensibilizada de lantánidos en función de la longitud de onda de excitación y los tiempos de decaimiento	Solapamiento temporal extremo, (perfiles de tiempos de decaimiento muy similares), pero diferentes espectros de excitación. Requerimiento de adición de patrón	MCR-ALS en el modo modificado de adición de patrón
Determinación de ciprofloxacina en: - orina en presencia de la interferencia producida por el fondo del fluido biológico - en suero en presencia de salicilato como un potencial interferente	Modelo y Real	Simulados y experimentales. - Matrices de quimioluminiscencia en función del tiempo de evolución de la señal y de la longitud de onda de emisión - Matrices de luminiscencia sensibilizada de lantánidos en función de la longitud de onda de excitación y los tiempos de decaimiento	- Solapamiento espectral extremo - Solapamiento temporal extremo Requerimiento de adición de patrón	PARAFAC, U-PLS/RBL, PARALIND, MCR-ALS y ambas versiones del nuevo U-PLS/RBL-LD en el modo modificado de adición de patrón

RESULTADOS Y DISCUSIÓN DE LOS SISTEMAS ESTUDIADOS

DETERMINACIÓN DE ÁCIDO BENZOICO EN PRESENCIA DE SACARINA EN JUGOS DE FRUTAS

En este sistema experimental se estudió la posibilidad de cuantificar ácido benzoico en muestras reales de jugos en presencia de interferencias. Para ello, se obtuvieron datos de segundo orden de LSETD para un conjunto de muestras de calibración, que contienen ácido benzoico (el analito de interés), de validación, que incluyen tanto al analito como a la sacarina (un potencial interferente) y muestras de jugos en los cuales el ácido benzoico se emplea como conservante y la sacarina como edulcorante. Los resultados obtenidos para las muestras reales se compararon con los hallados al aplicar el método de referencia (HPLC).

Condiciones de optimización de la señal luminiscente

Previamente a la realización de la calibración multivariada de segundo orden, se estudiaron las condiciones experimentales necesarias para obtener una señal óptima de los datos de LSETD. Se realizaron optimizaciones univariadas, obteniéndose los siguientes resultados. El valor óptimo para la concentración de terbio (III) fue de $1,00 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. Se confirmó que el uso de TOPO $2,8 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ como ligando sinérgico es necesario para mejorar la intensidad de luminiscencia de las muestras estudiadas. La mejor señal se obtuvo con solución reguladora de imidazol $1,20 \times 10^{-2}$ mol L⁻¹ de pH 6,2. Sin embargo, el uso de diferentes surfactantes no-iónicos, como triton X-100, C₁₂E₁₀ y Brij35 no condujo a mejoras significativas en la señal, por lo cual no se emplearon en las experiencias realizadas.

Perfiles espectrales y tiempos de decaimiento

Los espectros de excitación y emisión unidimensionales típicos para el complejo entre el terbio (III) y el analito se muestran en la Figura 18, donde se comparan con los de la sacarina, un potencial interferente que puede estar presente en muestras reales que contienen ácido benzoico. También se muestran los resultados para un blanco.

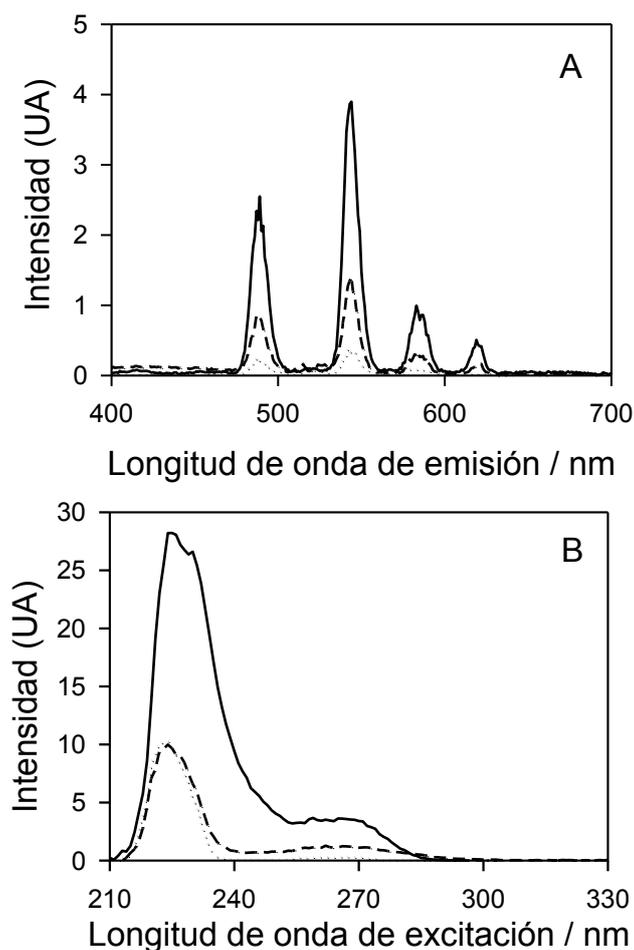


Figura 18. (A) Espectro de emisión de soluciones de ácido benzoico ($3,00 \text{ mg L}^{-1}$, línea sólida), sacarina ($5,00 \text{ mg L}^{-1}$, línea cortada) y blanco (línea de puntos). Las tres soluciones contienen terbio (III) ($1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), TOPO ($2,80 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) y la solución reguladora de imidazol ($1,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). La longitud de onda de excitación es de 260 nm . (B) Espectros de excitación correspondientes. La longitud de onda de emisión es de 545 nm .

Los correspondientes perfiles de tiempo de decaimiento para el complejo de ácido benzoico, el de sacarina y un blanco se muestran en la Figura 19. Como

se puede observar, el modo de emisión no es selectivo, porque la emisión de luminiscencia sólo depende del ión lantánido (Figura 18A). Los restantes modos (excitación y tiempo de decaimiento) proveen más selectividad, aunque muestran un alto grado de solapamiento, lo cual constituye un gran desafío para el empleo de métodos multivariados de segundo orden. Los tiempos de decaimiento se obtuvieron por análisis de regresión no lineal de las curvas mostradas en la Figura 19; en el caso del ácido benzoico y la sacarina, previo al ajuste se corrigió la señal por sustracción de la del blanco.

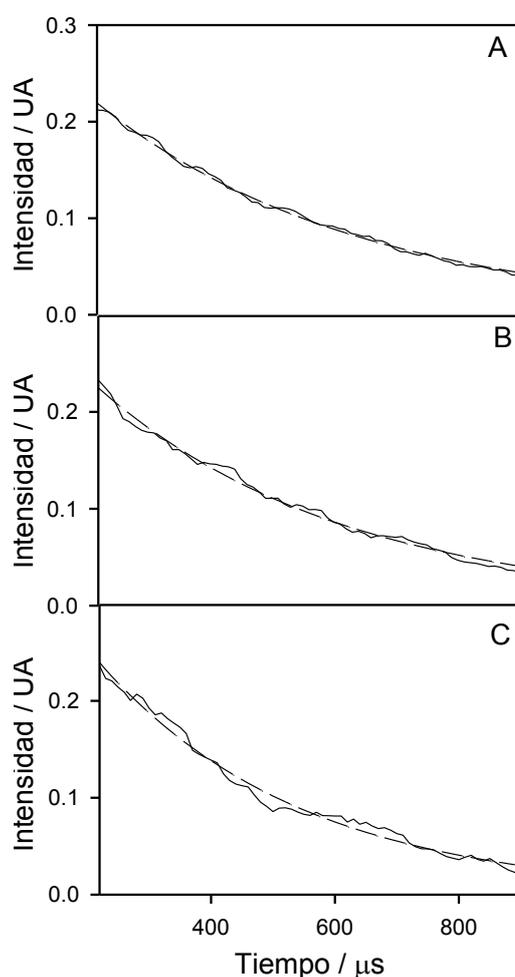


Figura 19. Curvas de tiempos de decaimiento (longitud de onda de excitación y emisión, 260 y 545 nm respectivamente) de las siguientes soluciones: (A) ácido benzoico ($3,00 \text{ mg L}^{-1}$), (B) sacarina ($10,00 \text{ mg L}^{-1}$) y (C) blanco. Las tres soluciones contienen terbio (III) ($1,00 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), TOPO ($2,80 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) y la solución reguladora de imidazol ($1,20 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$). La escala vertical se normalizó a la unidad. La línea sólida corresponde a los resultados experimentales, mientras que la línea de guión es la línea de regresión exponencial.

Al ajustar los perfiles de tiempos (corregidos) de la Figura 19 a través de la expresión $f(t) = \exp(-t / T)$, donde T es el tiempo de decaimiento, se obtuvieron los siguientes valores de T : para el complejo de ácido benzoico, $T = 422(3) \mu\text{s}$ ($r^2 = 0,9969$); para el complejo de la sacarina, $T = 476(3) \mu\text{s}$ ($r^2 = 0,9920$) y para la señal del blanco, $T = 335(8) \mu\text{s}$ ($r^2 = 0,9870$) (el número entre paréntesis indica el error estándar en la última cifra significativa). Esto confirma que los perfiles de los tiempos de decaimiento son significativamente diferentes para las tres señales de la Figura 19. Debe notarse que los rangos de tiempos de vida de la luminiscencia sensibilizada de terbio (III) están entre 400 y 2000 μs .⁹³

En la Figura 20 se muestra una superficie de LSETD para una muestra que contiene al analito en las condiciones ensayadas para la formación del complejo con el terbio (III). Este tipo de información matricial, utilizado en este sistema en estudio, no ha sido empleado previamente en determinaciones analíticas que requieran aprovechar la ventaja de segundo orden.

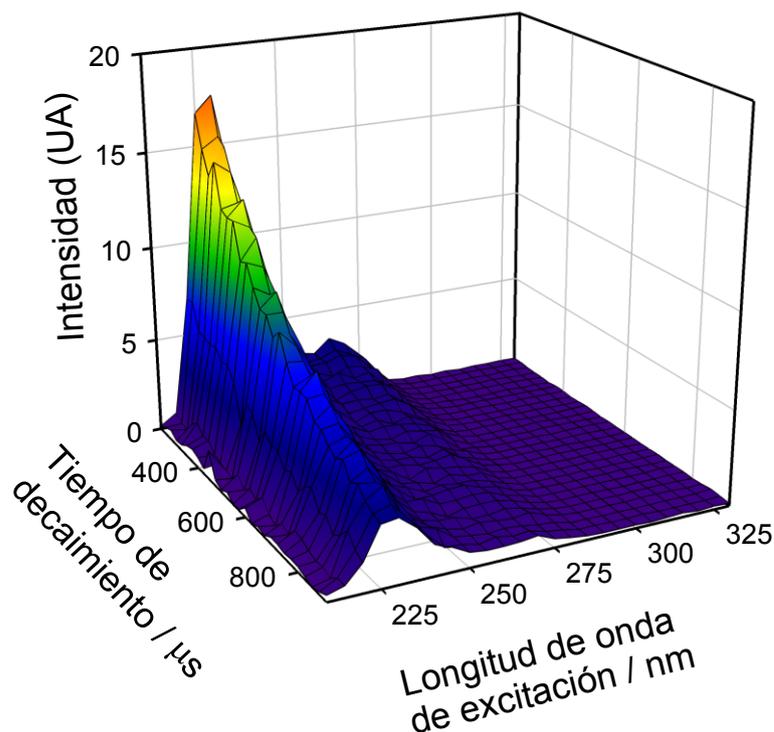


Figura 20. Superficie tridimensional de intensidad de luminiscencia en función de la longitud de onda de excitación y los tiempos de decaimiento para una muestra de calibración que contiene ácido benzoico ($5,00 \text{ mg L}^{-1}$).

Análisis multivariado de segundo orden

El conjunto de muestras de calibración que contiene sólo al analito y las muestras de validación en las cuales está presente analito y el potencial interferente se analizó empleando algoritmos de segundo orden, tales como PARAFAC y N-PLS/RBL. También se analizaron muestras de jugos comerciales y los resultados obtenidos con dichos algoritmos quimiométricos se compararon con los resultados obtenidos con el método de referencia HPLC.

Muestras de calibración y validación

Debido a que el blanco produce una señal de luminiscencia significativa (Figura 18), hay dos posibilidades para procesar la información: 1) modelar la señal de fondo como un componente adicional de PARAFAC, o 2) substraer digitalmente una matriz promedio del blanco a todas las matrices de los datos. La segunda estrategia fue la elegida para analizar las muestras, debido a que esta provee mejores resultados.

Cuando el conjunto de calibración y cada una de las muestras de validación se analizan con PARAFAC, el modelo requiere dos componentes, lo cual coincide con los resultados obtenidos al aplicar la prueba de CORCONDIA: los valores de *core consistency* decrecen significativamente desde 100 hasta valores menores que 30 para más de dos componentes. Asimismo, el análisis de regresión residual indica una disminución significativa de la desviación estándar de los residuos de PARAFAC incluyendo al segundo componente y una estabilización de este valor para un valor promedio de 0,15 UA. El modelo requiere dos componentes, ya que tanto el analito como la interferencia, sacarina, dan señales contribuyendo a los datos tridimensionales de LSETD.

Los perfiles de excitación y de tiempo de decaimiento recuperados al analizar una muestra típica de validación con PARAFAC se muestran en la Figura 21A y B, respectivamente. El perfil de excitación de la Figura 21A es similar al perfil obtenido para el analito puro (Figura 18B). Los perfiles de tiempo de decaimiento recuperados (Figura 21B) también muestran una concordancia con los perfiles de los analitos puros (Figura 20), obteniéndose un valor de $T = 410(6)$

μs para el complejo del ácido benzoico y de $T = 467(10) \mu\text{s}$ para el complejo de la sacarina (entre paréntesis se dan los errores estándares). Este último análisis indica que PARAFAC es capaz de descomponer satisfactoriamente la contribución que aporta la interferencia sacarina de la del analito ácido benzoico, lo cual es crucial para poder obtener la ventaja de segundo orden.

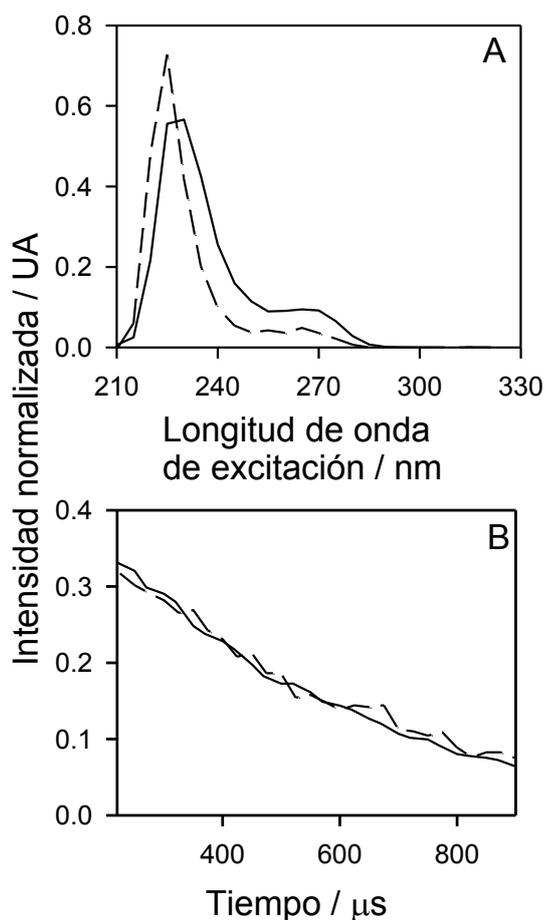


Figura 21. (A) Perfiles de excitación y (B) tiempos de decaimiento recuperados por PARAFAC cuando se procesa una muestras típica de validación. En ambos casos la línea sólida corresponde al ácido benzoico y la línea de guión a la sacarina.

Luego de descomponer los datos tridimensionales y de identificar los perfiles del analito (ácido benzoico) y de la interferencia (sacarina), se interpoló el score de la muestra en el gráfico de calibración pseudo-univariada de PARAFAC para predecir los valores de concentración, los cuales se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Concentración predicha de ácido benzoico en el conjunto de muestras de validación usando PARAFAC y N-PLS e indicadores estadísticos de la habilidad de predicción.

Muestra de validación	Nominal ácido benzoico (mg L ⁻¹)	Sacarina (mg L ⁻¹)	Predicho ácido benzoico (mg L ⁻¹)	
			PARAFAC ^a	N-PLS/RBL ^b
1	4,38	1,96	4,34	4,42
2	1,05	0,52	0,93	1,04
3	0,98	6,00	1,25	0,92
4	2,95	2,25	2,88	3,11
5	0,70	1,00	0,82	0,77
6	0,45	0,50	0,47	0,50
7	0,00	0,78	0,24	0,19
8	1,75	1,10	2,24	1,42
9	0,64	0,43	0,85	0,74
10	1,23	1,08	1,47	1,11
11	0,34	0,15	0,57	0,37
RMSE^c / mg L⁻¹			0,22	0,13
REP%^d			8,8	5,2

^a Modelo PARAFAC con dos componentes.

^b Dos variables latentes de calibración y un componente inesperado.

^c RMSE = raíz cuadrada del error medio.

^d REP% = error relativo de predicción.

Como se puede ver, la raíz cuadrada del error medio (RMSE) es 0,22 mg L⁻¹, lo cual implica un error relativo de predicción (REP%) de 8,8 % con respecto al valor central de la calibración. Estos resultados de validación se pueden emplear para valorar la exactitud de PARAFAC usando el método conocido como de la elipse de confianza conjunta (EJCR), analizando la pendiente y la ordenada al origen de la regresión lineal de valores predichos en función de las concentraciones nominales del analito. Si el punto ideal (1,0) se encuentra dentro

de la superficie de la EJCR, la cual contiene pares de valores de (pendiente, ordenada al origen) a un nivel de confianza de 95%, el método puede ser considerado exacto. El gráfico de la EJCR para las predicciones con PARAFAC (Tabla 3) se muestra en la Figura 22. Como se puede observar, el punto ideal se encuentra en el borde de la elipse, indicando que este método pasa la prueba, pero sólo marginalmente.

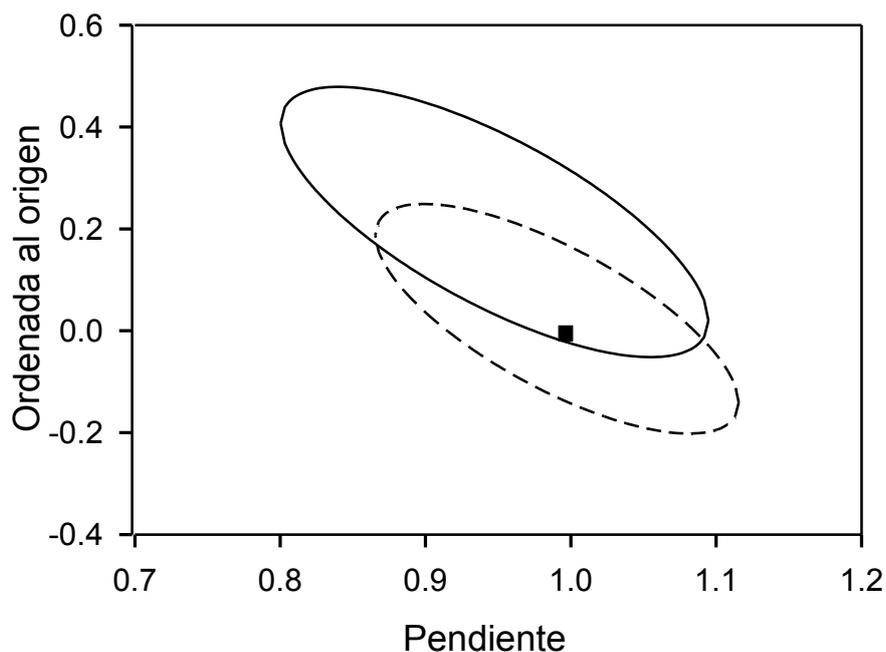


Figura 22. Elipse de la región de confianza conjunta para la pendiente y la ordenada al origen para estudiar la exactitud de los resultados de predicción para las muestras de validación (Tabla 3). Línea sólida para valores de PARAFAC, línea cortada para valores de N-PLS/RBL. El punto ideal (1,0) se indica con el cuadrado sólido.

El primer paso en el análisis de N-PLS es la determinación del número óptimo de factores de la calibración. Esto puede hacerse empleando la técnica de validación cruzada que procede calculando los coeficientes $F(A) = \text{PRESS}(A < A^*) / \text{PRESS}(A)$ [donde $\text{PRESS} = \sum (y_{i,\text{nom}} - y_{i,\text{pred}})^2$ es la sumatoria de errores cuadrados (nom representa nominal y pred predicho), A es un número de prueba de factores y A^* corresponde al mínimo PRESS]. El número óptimo de factores es aquel que tiene una probabilidad asociada menor que el 75% y un valor de F mayor que 1. Los resultados de la validación cruzada de N-PLS se muestran en la Tabla 4. Dos componentes aparentan ser suficientes para explicar

el número de variables latentes, lo que estaría de acuerdo con la presencia del analito y la señal de fondo en el conjunto de muestras de calibración. Como la señal del blanco no es perfectamente reproducible, se adiciona una variable latente más, necesaria para modelar la variabilidad de los datos con N-PLS, aún cuando la matriz promedio del blanco fue sustraída de todas las matrices de datos.

Tabla 4. Resultados de la validación cruzada de N-PLS^a.

A	PRESS / mg² L⁻²	RMSECV / mg L⁻¹	F	p
1	3,39	0,43	8,95	0,999
2	0,45	0,15	1,20	0,646
3	0,38	0,14	1,00	0,500
4	0,42	0,15	—	—

^a Valores resaltados corresponden a los parámetros óptimos de acuerdo a la referencia 81. RMSECV: raíz cuadrada del error medio en la validación cruzada. *F* = relación entre el PRESS y el mínimo PRESS. *p* = probabilidad asociada con el valor de *F*.

Luego de establecer el número de variables latentes empleando el conjunto de calibración, cada muestra de validación, conteniendo al analito ácido benzoico y a la interferencia sacarina, se analizó empleando N-PLS/RBL. En este caso, el número de componentes inesperados (o potenciales interferentes) se estimó considerando la variación del valor residual final de s_u [ver Ecuación (13), página 58]. Este último parámetro se grafica en función del número de componentes inesperados, hasta que su valor se estabiliza alrededor del valor de 0,15 UA, cercano al residuo de calibración y también similar al residuo de regresión en PARAFAC. En este caso, el número de componentes inesperados se establece para cada una de las muestras analizadas. El análisis sugirió que un único componente inesperado es suficiente para estabilizar el valor de s_u alrededor del ruido instrumental en todas las muestras evaluadas.

Los perfiles de excitación y tiempos de decaimiento para una muestra típica de validación obtenidos por bilinealización residual para un interferente se muestran en las Figuras 23A y B respectivamente. El perfil de excitación del

interferente se corresponde con el de la sacarina, mientras que el perfil de tiempo de decaimiento presenta un valor de $T = 476(12) \mu\text{s}$, similar al valor medido para la sacarina pura. Esto indica que el procedimiento RBL resulta satisfactorio para extraer la contribución del interferente en las muestras de validación, lo cual es relevante para alcanzar la ventaja de segundo orden y reestablecer la exactitud del algoritmo N-PLS.

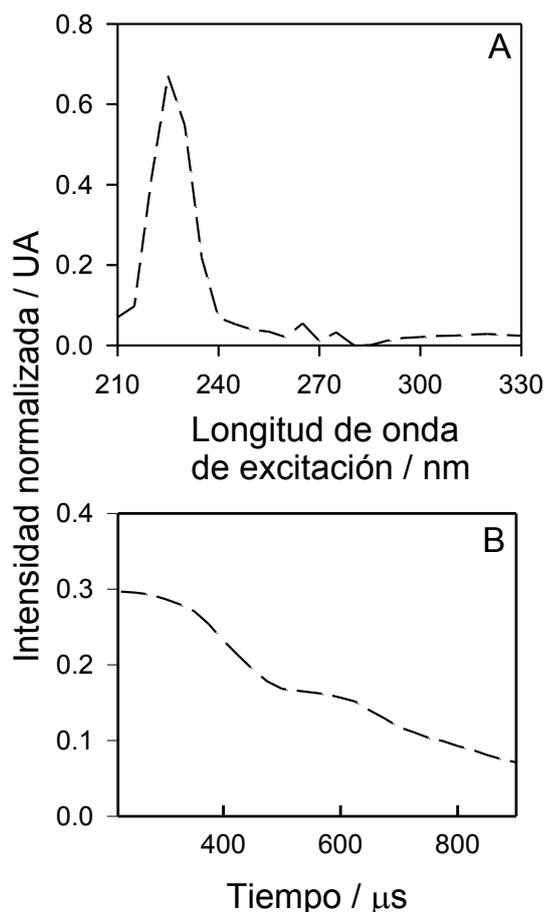


Figura 23. (A) Perfiles de excitación y (B) tiempo de decaimiento recuperado para la interferencia sacarina cuando se procesa una muestras típica de validación con N-PLS/RBL.

Luego de la etapa de calibración, los *scores* de N-PLS para cada una de las muestras de validación se corrigen con el procedimiento de RBL, permitiendo realizar la predicción, en ausencia del efecto de la interferencia, usando la Ecuación (8) (página 57). Los resultados para las muestras de validación se muestran en la Tabla 3, donde se observa una mejora en los resultados en comparación con PARAFAC, con un valor de REP% de 5,2%. Además, el gráfico

de EJCR (Figura 22) empleado para evaluar la exactitud, análogo al empleado para PARAFAC, condujo a una superficie elíptica menor (esto indica un mejor ajuste) la cual contiene claramente al punto ideal (1, 0). Por lo tanto N-PLS/RBL puede ser considerado más exacto que PARAFAC para el análisis de las muestras estudiadas.

Muestras reales

Con respecto a la aplicación de PARAFAC en las muestras reales, luego de medir las correspondientes LSETD para las muestras analizadas (por triplicado), el número adecuado de componentes también se estimó por CORCONDIA y por el estudio del ajuste residual. Luego de identificar los perfiles del analito y de la interferencia, se realizó la predicción del compuesto de interés en base a los *scores* de las muestras de calibración. Algunas muestras reales (Tabla 5) que contenían ácido benzoico, al compararlas con HPLC empleando la prueba *t* de comparación de medias,⁷³ no mostraron diferencias significativas entre los métodos. El ácido benzoico no fue detectado por el método desarrollado en la muestra real 4 que no contenía al analito. No obstante, para otras muestras reales ensayadas, los valores obtenidos fueron estadísticamente diferentes a los obtenidos por HPLC y dispersos entre si, aún cuando las muestras se analizaron en distintos puntos de la recta de calibrado realizando distintas diluciones. Esto podría ser debido a la existencia de un efecto de filtro interno. Para corroborarlo, se midieron los espectros de absorción de cada una de las muestras de los jugos analizados, en una concentración de 3,00 mg L⁻¹, pero no se encontró relación alguna entre los valores de absorbancia de las longitudes de onda de excitación y los resultados anómalos. La conclusión es que en ciertas muestras, debido a su compleja composición, el modelo multivariado no es capaz de predecir correctamente la concentración de analito. Por lo tanto, se recomienda realizar un estudio de recuperación del agregado de un patrón de ácido benzoico, previo al análisis de una muestra desconocida mediante el método propuesto en este trabajo. Esto permitiría controlar que el presente método es exacto para un determinado tipo de muestra.

Las mismas muestras reales analizadas con PARAFAC se evaluaron empleando N-PLS/RBL, con el criterio discutido anteriormente en lo que respecta al número de variables latentes de calibración y componentes inesperados en las muestras. Como con PARAFAC, algunas muestras reales que contenían ácido benzoico (Tabla 5), al compararlas con HPLC empleando la prueba t de comparación de medias, no mostraron diferencias significativas entre los métodos. El ácido benzoico no fue encontrado en la muestra de jugo deshidratado (muestra 4), la cual no contenía al analito. Para las otras muestras estudiadas, tal como con PARAFAC, los valores obtenidos difieren de los de HPLC.

Tabla 5. Comparación de los resultados de calibración multivariada de segundo orden con HPLC para muestras reales.

Muestra ^a	HPLC ^b		PARAFAC ^c		N-PLS/RBL ^c	
	Predicho (g L ⁻¹)		Predicho (g L ⁻¹)	t	Predicho (g L ⁻¹)	t
1	1,15(6)		1,14(9)	0,27	1,15(7)	0,00
2	0,37(6)		0,38(5)	0,36	0,38(7)	0,31
3	0,28(6)		0,24(3)	1,78	0,26(3)	0,89
4	–		ND ^d		ND ^d	

^a Muestra 1: jugo concentrado de ananá Asunción; muestra 2: jugo concentrada de pomelo Trechel; muestra 3: bebida soda de manzana verde Magna; muestra 4: jugo en polvo de limón Tang. Los contenidos de ácido benzoico en las muestras 1-3 no son declarados en el producto comercial; la muestra 4 no contiene ácido benzoico.

^b Desviaciones estándares en la última cifra significativa se muestran entre paréntesis, estimada como la media de la regresión univariada.

^c Desviación estándares en la última cifra significativa se muestra entre paréntesis, estimada del análisis por triplicado de cada muestra. Valores de t calculados de acuerdo a la referencia 73. Estos se compararon con un valor crítico $t_{4,0,05} = 2,78$ (4 grados de libertad, 95% de nivel de confianza).

^d ND = no detectado, las predicciones produjeron valores negativos pequeños.

SISTEMA MODELO DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN CON SOLAPAMIENTO EXTREMO EN UNA DE LAS DIMENSIONES. DETERMINACIÓN DE CARBIDOPA EN PRESENCIA DE LEVODOPA

La estructura de la mayoría de los algoritmos de segundo orden no permite evaluar sistemas con solapamientos extremos en una de las dimensiones entre el analito y el potencial interferente. Este fenómeno puede ser considerado como un caso específico de dependencia lineal entre los perfiles de los componentes. Una manera de solucionar este problema es incluir al potencial interferente en el conjunto de muestras de calibración. Esto tiene la desventaja que requiere el conocimiento de todos los posibles interferentes que puedan ser encontrados en nuevas muestras, y conduce a un incremento considerable en el tamaño del conjunto de calibración.

MCR-ALS es un algoritmo que permite resolver los problemas ocasionados por la presencia de dependencia lineal. La solución consiste en construir matrices de datos aumentadas a través de la recopilación de los datos matriciales instrumentales para diferentes muestras, siguiendo alguno de los siguientes modelos de aumento matricial: (1) en la dirección de las columnas, (2) en la dirección de las filas, o (3) en ambas direcciones simultáneamente. En sistemas espectroscópico-cinéticos es usual aumentar las matrices en la dirección del tiempo de reacción, porque esto permite paliar el problema asociado con las diferencias en las velocidades de reacción entre muestra y muestra. Sin embargo, cuando los perfiles de los compuestos son idénticos, es necesario el aumento matricial en el modo espectral. En el caso de poca selectividad de una de las dimensiones, pero no cero, se deben chequear ambos modos de aumento, y luego decidir cuál provee mejores cifras de mérito.

Datos simulados

Los datos simulados presentan un alto grado de solapamiento espectral de los componentes, debido a que ambos compuestos tienen espectros idénticos, pero diferentes tiempos de reacción. A continuación se describen los resultados obtenidos con diferentes algoritmos.

Cuando se aplica PARAFAC a las muestras de validación de este sistema, se lo hace con la metodología usual, en la cual cada muestra de validación se une con las muestras de calibración usadas. Subsecuentemente la descomposición tridimensional permite identificar al analito de interés, e interpolar en el gráfico de calibración pseudo-univariada para predecir la concentración del analito. Los resultados se muestran en la Figura 24A, en la cual se observa una recuperación pobre.

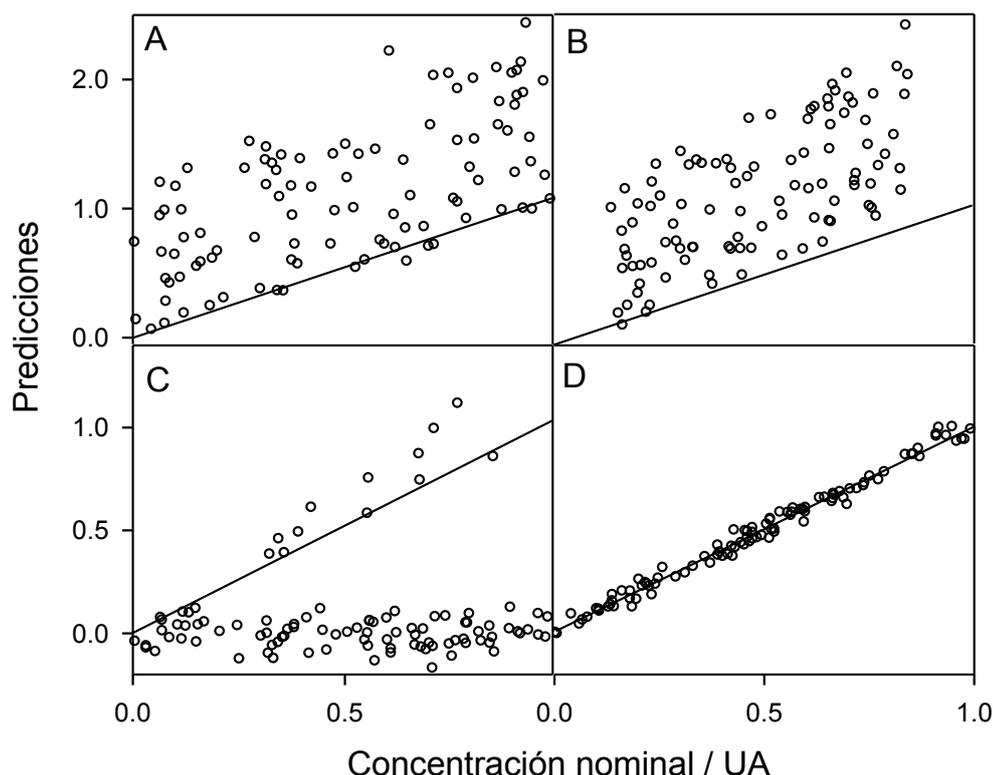


Figura 24. Resultados de predicción para 100 muestras de validación de un ejemplo simulado usando: (A) PARAFAC, (B) GRAM, (C) U-PLS/RBL y (D) MCR-ALS aumentados en el modo espectral. La línea sólida indica el ajuste ideal.

Asimismo, se aplicó GRAM uniendo cada muestra de validación y una muestra virtual creada al promediar los datos matriciales de todas las muestras de calibración, obteniéndose los resultados que se presentan en la Figura 24B. Nuevamente, al igual que con PARAFAC, se observa una recuperación pobre.

Para aplicar el método U-PLS a este conjunto de muestras, primero se entrenó al conjunto de calibración, usando una única variable latente de PLS, y luego se implementó el procedimiento de RBL para poder obtener la ventaja de segundo orden. Las predicciones obtenidas en este caso también son pobres, como se observa en la Figura 24C.

Por último, se aplicó MCR-ALS en el modo de aumento espectral. La matriz de datos para cada muestra de validación fue apilada junto con las matrices de calibración. Se impusieron restricciones de no-negatividad para ambos componentes en ambas dimensiones, y de correspondencia entre especies durante la etapa de minimización de ALS. Por ejemplo, se informó al algoritmo la ausencia del componente 2 en todas las muestras de calibración y su presencia en las de validación. Los resultados (Figura 24D) muestran una buena concordancia entre los valores de concentraciones nominales y predichas, con un RMSE de 0,035 unidades, y un REP% con respecto a la concentración media de calibración de 5,8%. La Figura 25 muestra los perfiles recuperados por MCR-ALS en la dimensión tiempo (Figura 25A) y en la dimensión espectral (Figura 25B) para una muestra típica de validación y tres muestras de calibración. Como se puede ver, las cinéticas son perfectamente distinguibles al comparar la Figura 25A con la Figura 11B (página 39) y los espectros son reconocidos como pertenecientes al componente 1 (presente en todas las muestras) o al componente 2 (sólo presente en la muestra de validación), como se muestra en la Figura 25B. Debe notarse que en este caso simulado, el aumento espectral es la única manera en la cual MCR-ALS permite resolver el problema analítico, aprovechando la ventaja de segundo orden.

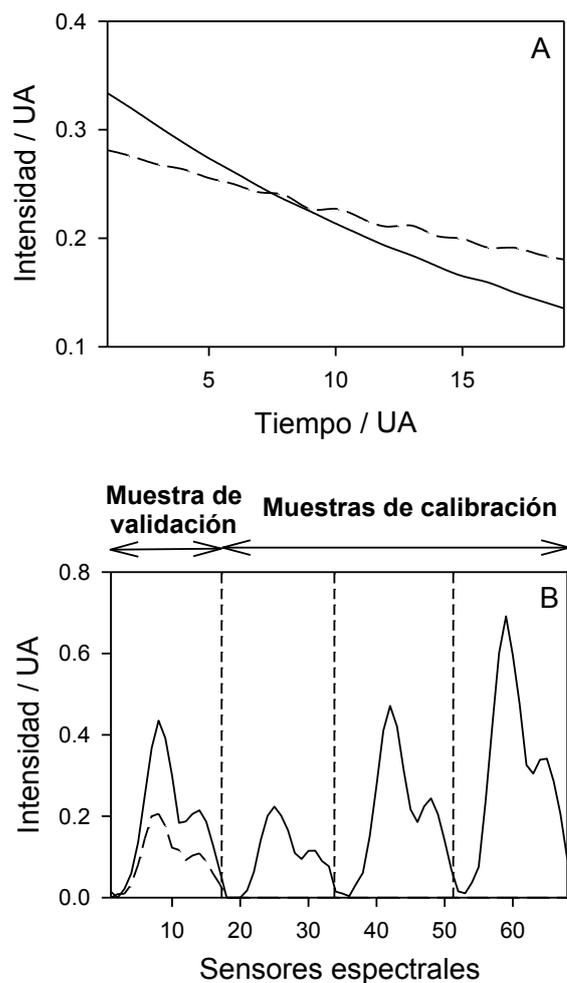


Figura 25. Perfiles recuperados por MCR-ALS cuando se procesa una muestra de validación típica para el ejemplo simulado. (A) Perfiles cinéticos, comunes para todas las muestras. (B) Perfiles espectrales para sucesivas muestras matriciales aumentadas en el modo espectral (se indican las muestras de calibración y las de validación). En ambos casos, la línea sólida indica al analito y la de guión a la interferencia.

Datos experimentales

Para validar el análisis de los datos simulados, se seleccionó un sistema experimental modelo con características de solapamiento espectral, tal como se planteó en la simulación. El sistema experimental analizado está basado en la reacción del antiparquinsoniano carbidopa (analito) en presencia de levodopa como potencial interferente. Ambos compuestos reaccionan con cerio (IV) para producir la especie fluorescente cerio (III), pero con diferente cinética.⁷⁴

Las muestras de calibración sólo contienen al analito de interés, en este caso la carbidopa, mientras que las muestras de validación contienen a ambos componentes, el analito analizado y la potencial interferencia, levodopa. Como los espectros de emisión producidos por ambos sistemas son idénticos, la cuantificación de carbidopa en las muestras de validación sólo fue posible usando MCR-ALS en el modo de aumentación espectral.

Debido a que las soluciones recién preparadas de cerio (IV) producen una señal de blanco por la presencia de cerio (III) inicial en la solución, se obtuvo una matriz promedio del blanco para corregir la presencia de dicha señal. De esta manera, se consideraron sólo dos componentes durante el procesamiento de los datos con MCR-ALS. La Figura 26 muestra la intensidad de fluorescencia en función del tiempo de reacción en el rango de emisión utilizado para una muestra de carbidopa durante su reacción con cerio (IV) para producir la especie fluorescente cerio (III). Resultados similares se obtienen cuando la levodopa es sometida a las mismas condiciones de oxidación.

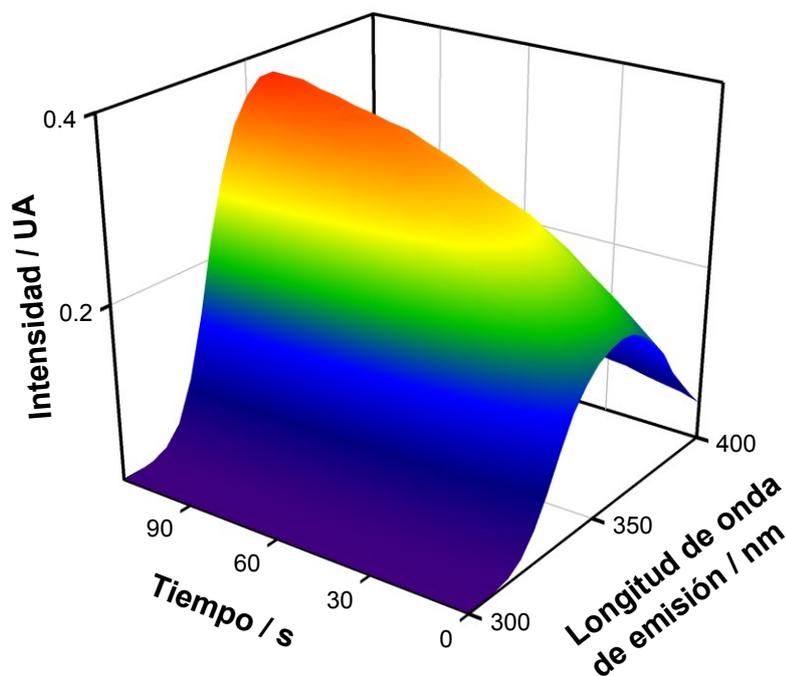


Figura 26. Gráfico tridimensional de la intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión y del tiempo de reacción para una muestra de calibración que contiene $0,40 \text{ mg L}^{-1}$ de carbidopa, durante la reacción con cerio (IV) para producir el compuesto fluorescente cerio (III).

La descomposición de las matrices originó los perfiles cinéticos y espectrales que se muestran en la Figura 27A y B. Como se puede observar, los perfiles cinéticos (Figura 27A) son lo suficientemente diferentes como para asegurar la diferenciación de ambos componentes de la muestra, mientras que los espectros de emisión son idénticos, ya que se asocian a la fluorescencia de cerio (III) generado. Además, en la Figura 27B se muestra que la presencia del interferente levodopa es correctamente detectada en la muestra de validación, mientras que en las de calibración sólo está presente el analito carbidopa.

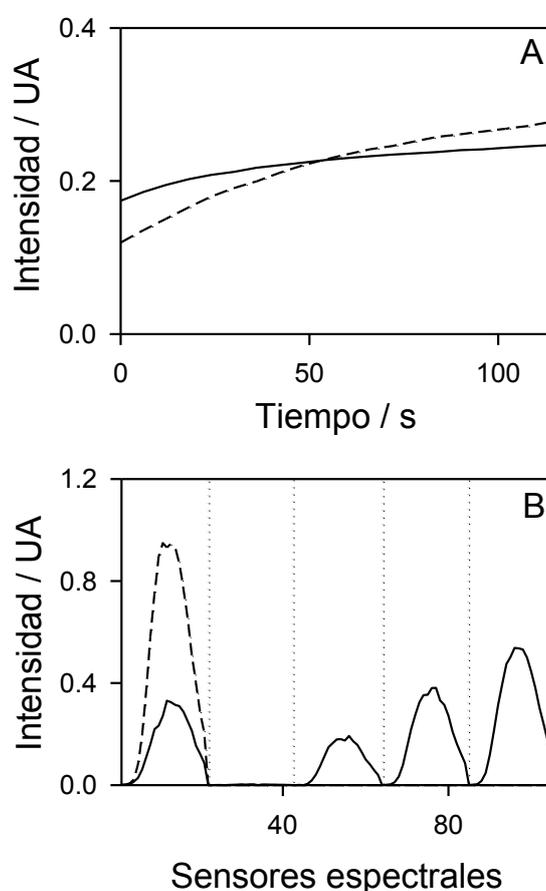


Figura 27. Gráfico de los perfiles cinéticos (A) y espectrales (B) luego de procesar una muestra típica de validación con MCR-ALS junto con las muestras de calibración.

El área bajo el espectro del analito en cada muestra (Figura 27B) es proporcional a su concentración, lo que permite cuantificar al analito en las muestras incógnita, incluso en presencia de interferentes inesperados.

Las predicciones de las cinco muestras de la serie de validación se presentan en la Tabla 6. Como puede observarse, se obtuvieron buenos

indicadores estadísticos: el RMSE es 0,02 mg L⁻¹, correspondiente a un REP% de 8,0 %, calculado en base a la concentración media de calibración. Además se calculó la diferencia (Δ) entre la concentración nominal y la predicha y se aplicó la prueba *t* de pares.⁷³ Esta prueba estadística compara una *t* experimental (t_{exp}) con una *t* crítica (t_{crit}), donde $t_{\text{exp}} = \frac{|\bar{\Delta}| \sqrt{n-1}}{s}$ ($\bar{\Delta}$ y *s* son la media y la desviación estándar de los diferentes valores de Δ , *n* es el número de pares y el símbolo || indica valor absoluto). Debido a que el valor de $t_{\text{exp}} = 1,6$ resultó ser menor que el $t_{\text{crit}} = 2,78$ (con un 95% de nivel de confianza y 4 grados de libertad), se confirmó que los resultados provistos por MCR-ALS no difieren estadísticamente de los valores nominales, demostrando que la presente metodología es factible para obtener la ventaja de segundo orden en casos en que los componentes de las muestras poseen solapamiento extremo (perfiles idénticos) en una de las dimensiones.

Tabla 6. Concentración predicha de carbidopa en el conjunto de muestras de validación usando MCR-ALS e indicadores estadísticos de la habilidad de predicción.

Muestra de Validación	Levodopa (mg L ⁻¹)	Carbidopa (mg L ⁻¹)	
		Nominal	Predicho ^c
1	0,13	0,47	0,47
2	0,46	0,38	0,37
3	0,66	0,28	0,28
4	0,79	0,18	0,16
5	1,06	0,08	0,04
RMSE^a / mg L⁻¹			0,02
REP^b %			8,0

^a RMSE = raíz cuadrada del error medio.

^b REP% = error relativo de predicción (con respecto a la concentración media de calibración).

^c Promedio de muestras duplicadas.

SISTEMAS MODELO DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN QUE REQUIEREN DE ADICIÓN DE PATRÓN. EVALUACIÓN DE DIFERENTES ALGORITMOS

Datos simulados

A continuación se describen los resultados del análisis de muestras incógnita simuladas empleando diferentes algoritmos quimiométricos de segundo orden. En primer lugar se aplicó PARAFAC considerando la respuesta de tres componentes asociada a un único analito y dos potenciales interferentes. En general, cuando PARAFAC se emplea en el modo 1 de adición de patrón sin restricciones y con una inicialización de ajuste de cuadrados mínimos a partir de los *scores* y perfiles obtenidos con DTLTD, algunos perfiles finales no son físicamente razonables, y algunos de los valores son negativos. Sin embargo, como se puede ver en la Figura 28, los perfiles del analito son correctamente recuperados, por lo tanto los *scores* permiten cuantificar al analito de manera exacta. La aplicación de restricciones de no-negatividad lleva a perfiles de los interferentes razonables, presentando en este caso *scores* razonables no sólo para el analito (valores que aumentan con la adición del analito), sino también para los interferentes (*scores* aproximadamente constantes en todas las muestras). De este modo, parece que la no-negatividad es suficiente para permitir un análisis cualitativo de los perfiles de los componentes y también para cuantificar al analito por adición de patrón, incluso en presencia de más de un interferente. Debido a esto, no se requiere realizar el análisis empleando variantes de PARAFAC tales como PARALIND.

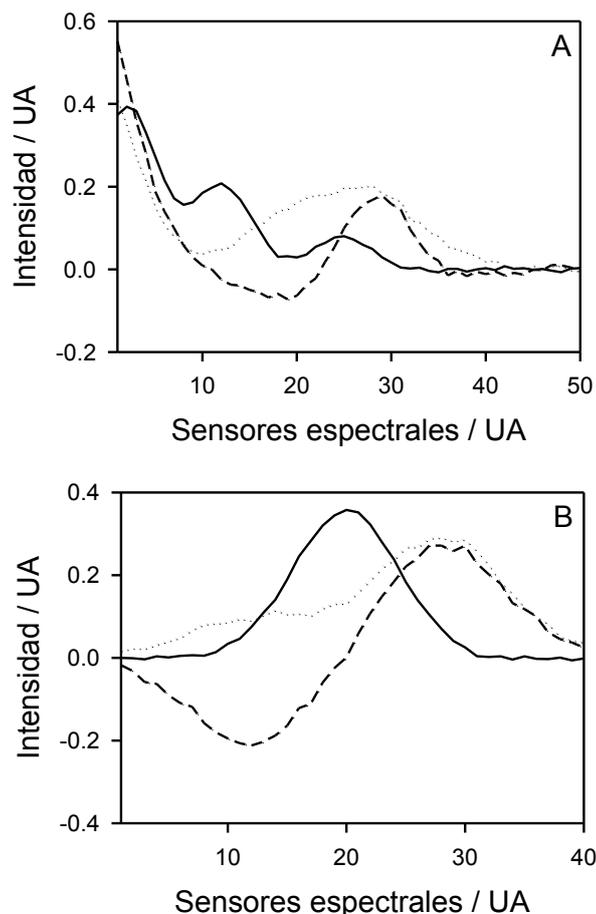


Figura 28. Perfiles recuperados cuando se aplica PARAFAC sin restricciones, inicializado con valores de DTLD, sobre una muestra típica de simulación usando adición de patrón clásica o modo 1. (A) Perfiles en la primera dimensión, la línea sólida corresponde al analito y la de guión y la de punto a los potenciales interferentes. (B) Perfiles en la segunda dimensión, las líneas son las mismas que en el gráfico (A).

Sin embargo, cuando el proceso anterior fue aplicado para 1000 muestras diferentes, 10% de los casos produjo resultados significativamente incorrectos, aún luego de aplicar restricciones de no-negatividad. En la Tabla 7 se muestran las predicciones para las primeras 10 muestras incógnita. En la Figura 29, en un gráfico de *Box and Whisker* se resumen los resultados de las 1000 muestras. Los resultados obtenidos con el algoritmo 1 muestran predicciones que son significativamente diferentes a los valores nominales, correspondiendo a soluciones de PARAFAC que son combinaciones lineales de los perfiles de los componentes conocidos. Sin embargo, los resultados son correctos cuando PARAFAC se inicializa con los *scores* y los *loadings* provistos por el mejor resultado obtenido al analizar un conjunto de 10 corridas, las cuales incluyen

DTLD y vectores compuestos de números al azar (Figura 29, algoritmo 2). La Tabla 7 contiene los resultados para las primeras 10 muestras usando esta estrategia, que lleva a un RMSE de 0,05 unidades (8% con respecto a la concentración media del analito).

Tabla 7. Resultados de predicción para las primeras 10 muestras del conjunto de datos simulados.

Nominal	PARAFAC ^a			PARALIND ^a	MCR-ALS ^a		N-PLS/RBL
	Modo 1 ^b	Modo 1 ^c	Modo 2 ^b	Modo 1	Modo 1	Modo 2	Modo 2
0,49	0,48	0,43	0,45	0,45	0,53	0,48	0,46
0,15	0,18	0,22	0,20	0,21	0,19	0,14	0,21
0,78	0,68	0,71	0,73	0,73	0,82	0,77	0,74
0,07	0,03	0,04	0,03	0,04	0,11	0,06	0,06
0,11	0,46	0,08	0,09	0,09	0,15	0,10	0,10
0,76	1,20	0,75	0,75	0,74	0,80	0,75	0,77
0,50	0,52	0,51	0,50	0,50	0,54	0,49	0,52
0,55	1,09	0,47	0,49	0,48	0,59	0,54	0,51
0,05	0,70	0,04	0,05	0,05	0,09	0,04	0,07
0,13	0,12	0,11	0,12	0,12	0,17	0,18	0,13
RMSE^d	0,32	0,05	0,04	0,04	0,04	0,02	0,03

^a El modo 1 es el modo usual de adición de patrón, el modo 2 es un nuevo modo modificado de adición de patrón, estrategia descrita en el presente trabajo.

^b Inicialización usando el algoritmo DTLD y restricciones de no-negatividad durante la fase de ajuste con cuadrados mínimos.

^c Inicialización usando la mejor de 10 corridas y restricciones de no-negatividad durante la fase de ajuste con cuadrados mínimos.

^d RMSE: raíz cuadrada del error medio.

El mismo conjunto de 1000 muestras fue estudiado usando PARAFAC en el modo modificado de adición de patrón o modo 2. La aplicación de DTLD en la inicialización y las restricciones de no-negatividad fueron suficientes para producir resultados de predicción con una exactitud comparable con aquellos alcanzados en el modo 1 al considerar un conjunto de 10 muestras, obteniéndose en este

caso un RMSE de 0,04 unidades (Tabla 7). Sin embargo, cuando nuevamente se analizan los resultados de las 1000 muestras (Figura 29, algoritmo 3) se observan resultados de predicción ligeramente más pobres en comparación con la anterior alternativa (algoritmo 2).

También se aplicó PARALIND considerando tres componentes. El modelo se inicializó con los mejores perfiles recuperados para un conjunto de 20 cálculos, en cada corrida con unas pocas iteraciones. Las restricciones de no-negatividad se impusieron en los tres modos. Los resultados, en términos de habilidad predictiva del modelo, fueron muy similares a los obtenidos con el mejor modelo de PARAFAC, el cual incluía restricciones de no-negatividad e inicialización con la mejor de 10 corridas (algoritmo 2). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 7 para las primeras 10 muestras y en la Figura 29 en forma completa para las 1000 muestras incógnita simuladas.

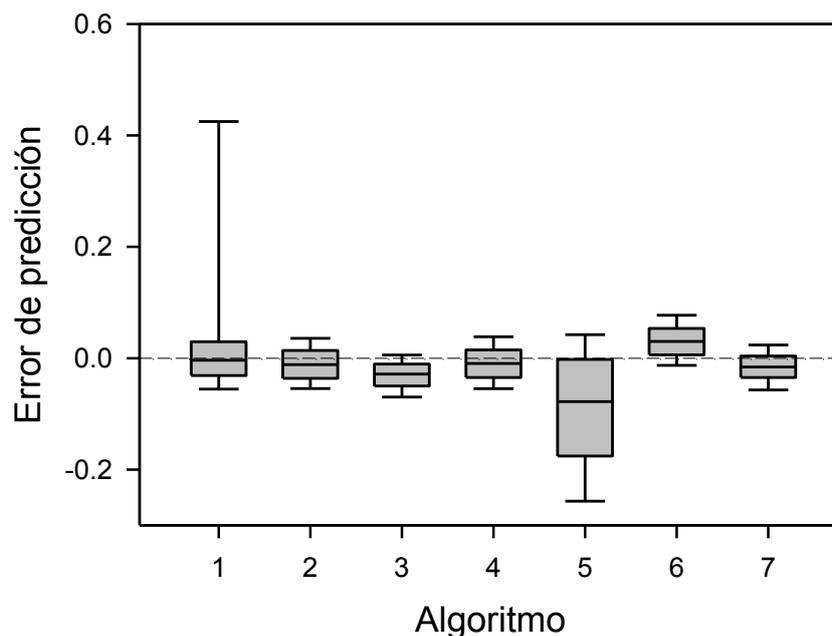


Figura 29. Gráfico de *Box and Whisker* para los resultados completos de las predicciones de las 1000 muestras simuladas. Los algoritmos se enumeran en el eje horizontal de la siguiente manera: (1) PARAFAC en el modo 1, inicializado con DTLD, (2) PARAFAC en el modo 1, inicializado con la mejor de 10 corridas, (3) PARAFAC en el modo 2, inicializado con DTLD, (4) PARALIND en el modo 1, (5) MCR-ALS en el modo 1, (6) MCR-ALS en el modo 2 y (7) N-PLS/RBL en el modo 2. Para cada algoritmo, la caja gris contiene entre el 25% y 75% de los cuartiles, con la mediana dentro de la misma. Los niveles extremos corresponden al 5% y 95% de los cuartiles. PARAFAC, PARALIND y MCR-ALS se aplicaron usando restricciones de no-negatividad.

Al aplicar MCR-ALS se consideró que estaban presentes tres componentes en todas las muestras, de la misma manera que cuando se empleó PARAFAC. Los resultados de predicción de las primeras 10 muestras, con un RMSE comparable con los mejores de PARAFAC, se muestran en la Tabla 7. Sin embargo, si observamos la Figura 29, los resultados completos usando el modo 1 (algoritmo 5) muestran un cierto sesgo, que se mejora significativamente al usar el modo 2 (algoritmo 6). De hecho, el pequeño sesgo observado en los resultados es comparable con la incertidumbre en las concentraciones nominales, del orden de 0,01 unidades. El origen de este sesgo en el primer caso (modo 1) es poco claro, pero podría estar relacionado a una fuerte correlación entre los perfiles espectrales cuando se usa el modo 1.

Finalmente, se aplicaron los modelos U-PLS/RBL y N-PLS/RBL para el conjunto de 1000 muestras incógnita, usando la única posibilidad de adición de patrón, el modo 2. La calibración se realizó con una sola variable latente, y se incluyeron dos componentes en la fase de RBL. Se debe aclarar que en el caso de dos interferentes en las muestras incógnita, los perfiles obtenidos por U-PLS/RBL y N-PLS/RBL no se parecen a los verdaderos perfiles de los componentes, porque son obtenidos a través del análisis de componentes principales.²² Los resultados obtenidos usando U-PLS/RBL son bastantes desalentadores, ya que algunas de las muestras estudiadas dieron resultados de predicción significativamente inadecuados. Sin embargo, el uso de la variante multidimensional N-PLS/RBL produjo resultados de predicción exactos, y comparables a los de PARAFAC y MCR-ALS. La Tabla 7 demuestra que el RMSE para N-PLS/RBL para las primeras 10 muestras es comparable con el resto de los algoritmos. La Figura 29 muestra también que los resultados completos son cualitativamente comparables con los mejores resultados de PARAFAC y PARALIND. Esto indica que la variante multidimensional de PLS, la cual mantiene la estructura de la matriz de datos, a diferencia de la variante desdoblada (U-PLS/RBL), permite un mejor manejo de la información analítica para aprovechar la ventaja de segundo orden, discutida en los sistemas simulados en estudio.

Datos experimentales

Determinación de salicilato en presencia de naproxeno en suero

La determinación de salicilato en suero requiere de adición de patrón, debido a los cambios en el espectro del analito por interacciones con el fondo de la muestra de suero.³⁷ En este sistema experimental se aplicó PARAFAC en el modo 2 anteriormente discutido, con restricciones de no-negatividad e inicialización con el mejor resultado de un conjunto de 10 corridas, que fue la opción que mejores resultados produjo en las muestras simuladas. Al realizar el análisis de los datos empleando PARAFAC, el primer paso fue la estimación del número de componentes; como ya ha sido discutido esto puede realizarse utilizando la herramienta diagnóstica conocida como *core consistency*,⁸¹ o la consideración de los errores de la regresión del modelo de PARAFAC en función del número de componentes.⁴³ Al procesar con PARAFAC los datos de tres vías compuestos por una muestra típica de suero y el conjunto de muestras de adición de patrón, los valores de *core consistency* fueron 100, 99,7, 99,5, 99,8 y 74,5 para 1, 2, 3, 4 y 5 componentes respectivamente, mientras que los errores de la regresión decrecieron de la siguiente manera: 25, 3,5, 2,6, 2,5 y 2,4 unidades arbitrarias de fluorescencia. Esto sugiere que, en este caso, la *core consistency* no permite establecer firmemente el número de componentes, sin embargo cuando se analizan los errores de la regresión el número óptimo parece ser tres componentes, lo cual resulta más razonable.

Es interesante analizar los tres perfiles espectrales recuperados por PARAFAC (Figura 30) cuando se procesan datos de adición de patrón en el modo 2. El salicilato muestra máximos de excitación y emisión a 300 y 410 nm respectivamente, mientras que los interferentes se pueden identificar como naproxeno (excitación máxima a 265 nm y un hombro a 320 nm y emisión a 355 nm) y suero (excitación a 280 nm y emisión a 340 nm, correspondiendo probablemente a la fluorescencia del triptofano). Cuando se consideran cuatro componentes en el modelo PARAFAC, el último perfil es similar a uno de los tres primeros, confirmando que tres componentes es una buena elección para este

sistema. El sistema simulado presenta un valor del parámetro de selectividad MKL^{75} de 0,89, mientras que para este sistema experimental es de 0,92.

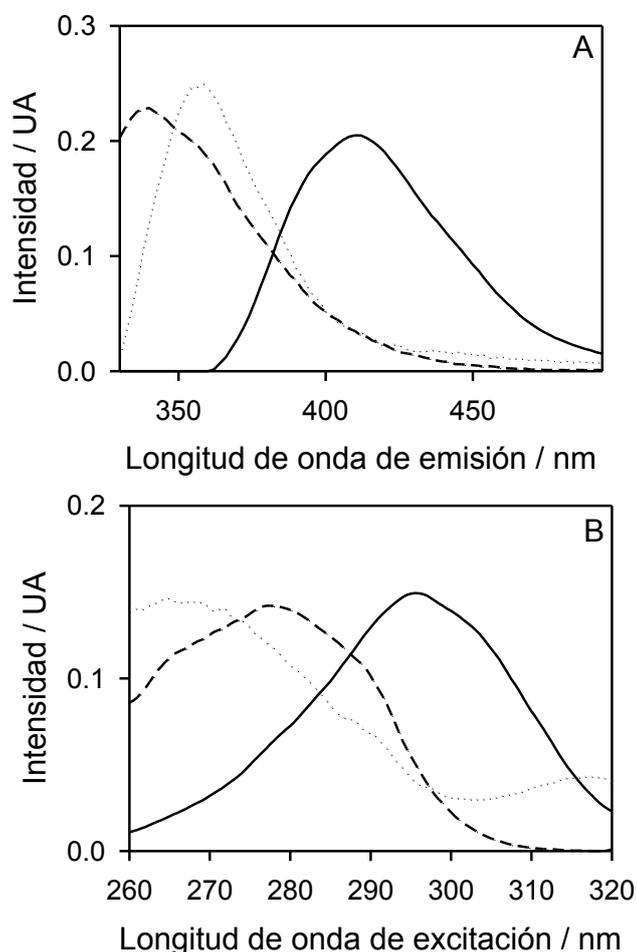


Figura 30. Perfiles recuperados cuando PARAFAC se aplica en el modo 2 con restricciones de no-negatividad, inicializado con la mejor de 10 corridas, para una muestra experimental de suero que contiene salicilato y naproxeno. (A) Perfiles de emisión, la línea sólida corresponde al analito salicilato, las líneas de guión y de punto a los potenciales interferentes. (B) Perfiles de excitación. Las líneas son las mismas que en el gráfico (A).

Los resultados de predicción para las muestras incógnita se muestran en la Tabla 8, obteniéndose valores razonables de RMSE con todos los algoritmos. Al aplicar PARALIND a este conjunto de datos experimentales, se obtuvieron resultados de predicción análogos a los obtenidos con PARAFAC (Tabla 8).

Al realizar el análisis con MCR-ALS, se consideraron tres componentes, establecidos por el análisis de componentes principales. Los perfiles utilizados en

la inicialización del ajuste de MCR-ALS fueron los estimados por SIMPLISMA. Las predicciones de salicilato en el sistema experimental aplicando MCR-ALS son semejantes a las de PARAFAC (Tabla 8).

Luego se procesó este conjunto de datos con U-PLS/RBL y N-PLS/RBL. Como en el caso de los datos simulados, con U-PLS/RBL se obtuvieron resultados inexactos para una de las muestras, mientras que N-PLS/RBL proporciona un valor de RMSE comparable con los de PARAFAC, PARALIND y MCR-ALS (Tabla 8). Esta es la primera vez que se utilizan los algoritmos U-PLS/RBL y N-PLS/RBL para datos de adición de patrón, siendo los mejores resultados los obtenidos usando la última metodología. Para corroborarlo, se calculó la prueba t de comparación de pares⁷³ obteniéndose un $t_{\text{exp}} = 2,19$ el cual resultó ser menor que $t_{\text{crit}} = 2,78$ (con un 95% de nivel de confianza y 4 grados de libertad), concluyendo que los valores predichos por N-PLS/RBL no difieren estadísticamente de los valores nominales.

Tabla 8. Resultados de predicción del conjunto de datos experimentales.

Nominal Salicilato ^a	PARAFAC ^b	PARALIND ^b	MCR-ALS ^b	U-PLS/RBL ^c	N-PLS/RBL ^c
0,20	0,20	0,20	0,20	0,20	0,20
0,50	0,51	0,51	0,51	– ^d	0,50
0,05	0,06	0,06	0,06	0,06	0,06
0,00	0,02	0,02	0,01	0,01	0,01
0,03	0,03	0,03	0,04	0,04	0,04
RMSE^e	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01

^a Valores en mg L⁻¹. Todas las muestras contienen suero y 0,20 mg L⁻¹ de naproxeno.

^b PARAFAC, PARALIND y MCR-ALS se aplicaron con tres.

^c U-PLS/RBL y N-PLS/RBL se aplicaron con una variable latente en la calibración y dos interferentes.

^d Resultado altamente inexacto. El valor de RMSE es calculado sin tener en cuenta este valor.

^e RMSE: raíz cuadrada del error medio.

Determinación de danofloxacin en presencia de salicilato en suero

La determinación de antibióticos quinolónicos en suero, tal como la danofloxacin, requiere de adición de patrón debido a los cambios en el espectro del analito por interacciones con el fondo de la muestra de suero. De la misma manera que en el sistema anterior, PARAFAC se aplicó en el modo 2 y se inicializó con los perfiles obtenidos luego de analizar corridas con un pequeño número de iteraciones, con condiciones de no-negatividad en los tres modos durante el ajuste por cuadrados mínimos. En la determinación del número de componentes, se obtuvieron valores de *core consistency* de: 100, 94,7, 89,9, 80,5 y 58,5 para los componentes 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente, y los errores del ajuste de PARAFAC, se estimaron en 9,7, 4,7, 3,6, 3,5 y 3,5 unidades arbitrarias de fluorescencia. Nuevamente, el análisis de los datos sugiere que el número óptimo de componentes aparenta ser tres, conclusión que sólo puede ser alcanzada a través de los errores del ajuste y no del diagnóstico de *core consistency*.

Los tres perfiles espectrales recuperados por PARAFAC para una muestra típica se muestran en la Figura 31. El perfil que se atribuye a la danofloxacin muestra máximos de excitación a 280 nm y a 320 nm, y de emisión a 450 nm, mientras que los interferentes pueden ser identificados como salicilato (excitación a 300 nm y emisión a 410 nm) y suero (excitación a 280-290 nm y emisión como una banda decreciente que puede tener su máximo en 350 nm y que corresponde al triptofano). En este sistema experimental el parámetro de selectividad MKL^{75} presenta un valor de 0,74, menor que el hallado para el sistema de datos simulados (0,89).

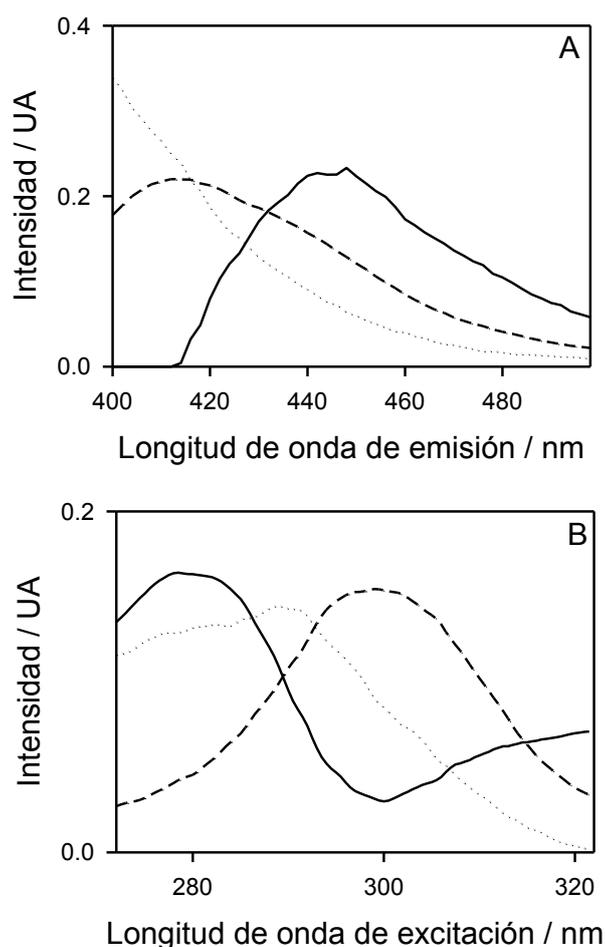


Figura 31. Perfiles recuperados cuando PARAFAC se aplica en el modo 2 con restricciones de no-negatividad, inicializado con la mejor de 10 corridas, para una muestra experimental de suero que contiene danofloxacin y salicilato. (A) perfiles de emisión, la línea sólida corresponde al analito danofloxacin, las líneas de guión y de punto a los potenciales interferentes. (B) perfiles de excitación. Las líneas son las mismas que en el gráfico (A).

Los resultados de predicción para este sistema se muestran en la Tabla 9. En este caso, se observa menor sensibilidad para el analito y un fuerte solapamiento en ambas dimensiones de los datos, siendo el RMSE bastante mayor en comparación con el promedio de concentración del analito usados en las muestras incógnita. Como con el sistema experimental anteriormente discutido, los resultados de predicción obtenidos para PARALIND son idénticos a los correspondientes a PARAFAC (Tabla 9).

Al aplicar MCR-ALS, las predicciones obtenidas son claramente peores, indicando que la combinación de baja señal del analito y solapamiento espectral

tiene mayor efecto sobre este algoritmo que sobre la descomposición de PARAFAC.

Por otro lado, U-PLS/RBL y N-PLS/RBL conducen a predicciones significativamente mejores (Tabla 9). Para obtener una mayor comprensión de la exactitud de N-PLS/RBL con datos de adición de patrón se calculó la prueba t de comparación de pares,⁷³ obteniéndose un $t_{\text{exp}} = 2,05$ el cual resultó ser otra vez menor que $t_{\text{crit}} = 2,78$ (con un 95% de nivel de confianza y 4 grados de libertad), concluyendo que los valores predichos por N-PLS/RBL no difieren estadísticamente de los valores nominales. Esto puede ser un indicativo de que estos métodos de estructura latente están mejor preparados para modelar los problemas de severos solapamientos espectrales cuando se analizan datos de adición de patrón.

Tabla 9. Resultados de predicción del conjunto de datos experimentales.

Nominal Danofloxacina ^a	PARAFAC ^b	PARALIND ^b	MCR-ALS ^b	U-PLS/RBL ^c	N-PLS/RBL ^c
10	18	18	21	7	7
40	55	55	107	41	31
0	6	6	5	0	0
5	12	12	19	2	3
25	15	15	18	13	13
RMSE^d	10	10	30	6	7

^a Valores en mg L⁻¹. Todas las muestras contienen suero y salicilato (0,50 mg L⁻¹ en las tres primeras muestras y 0,30 mg L⁻¹ en las dos restantes).

^b PARAFAC, PARALIND y MCR-ALS se aplicaron con tres componentes.

^c U-PLS/RBL y N-PLS/RBL se aplicaron con una variable latente en la calibración y dos interferentes.

^d RMSE: raíz cuadrada del error medio.

APLICACIÓN DE ALGORITMOS DE SEGUNDO ORDEN A DATOS QUE REQUIEREN DE ADICIÓN DE PATRÓN Y PRESENTAN SOLAPAMIENTO EXTREMO EN UNA DE LAS DIMENSIONES. DETERMINACIÓN DE FLUOROQUINOLONAS EN SUERO EN PRESENCIA DE SALICILATO COMO INTERFERENTE

En este sistema experimental se discute el análisis de tres fluoroquinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, danofloxacina) en muestras de suero, en presencia de salicilato como un potencial interferente, utilizando datos matriciales LSETD. Las quinolonas forman complejos estables con los iones terbio. El complejo ligando-lantánido absorbe energía a longitudes de ondas que dependen del ligando orgánico, y emite radiación a longitudes características del terbio (III) (máximo a 545 nm).^{58,61,94} En varios métodos para la cuantificación de fluoroquinolonas descritos en la literatura, el salicilato se informó como un importante interferente.^{59,61} El salicilato forma quelatos luminiscentes con el terbio, principalmente en presencia de EDTA como ligando sinérgico,^{95,96} siendo esta la causa de interferencia que produce en la determinación de fluoroquinolonas al emplear luminiscencia sensibilizada de lantánidos.

El sistema investigado presenta los siguientes inconvenientes: (1) el fondo del suero modifica significativamente la intensidad de la señal del complejo analito-lantánido en comparación con la obtenida en solución acuosa, y (2) las señales de segundo orden del complejo analito-lantánido y la del interferente-lantánido presentan perfiles de tiempo de decaimiento muy similares. El efecto de fondo en la respuesta de la señal del analito conduce a una variación en la pendiente de la señal univariada en relación con la concentración, que puede ser corregida por el método de adición de patrón.³³ Ante la presencia de un componente inesperado en la muestra que genera una señal solapada con la del analito, es necesaria la calibración de segundo orden junto con adición de patrón para su cuantificación satisfactoria.^{4,7,37-39,97} MCR-ALS ha sido implementado usando adición de patrón.⁹⁸ En el sistema experimental anterior se discutió el uso de diferentes algoritmos quimiométricos en el modo 2 de adición de patrón empleando datos simulados y sistemas experimentales. En este caso, es importante mencionar que sólo MCR-ALS puede ser aplicado, debido al

solapamiento extremo en la dimensión tiempo, de manera similar a lo discutido en el modelo experimental basado en la determinación de carbidopa en presencia de levodopa como potencial interferente. MCR-ALS permite romper la colinealidad en una de las dimensiones de los datos recurriendo a la matriz aumentada, haciendo posible la cuantificación del analito en presencia de interferentes cuando los perfiles en uno de los modos están fuertemente solapados.

Datos simulados

Análisis de rango

Antes de proceder con la discusión de los resultados de MCR-ALS para el sistema simulado, es interesante notar que la resolución depende fuertemente del conocimiento de las propiedades globales y locales de la serie de datos, particularmente aquellos relacionados con los rangos matemáticos y químicos. El rango matemático puede ser definido como el número de componentes principales (PCs), obtenidos del análisis de PCA, mientras que el rango químico es el número de especies químicas que producen respuesta instrumental. Una matriz de datos se considera de rango completo si los rangos matemáticos y químicos coinciden.^{99,100} Usualmente, el número de PCs que explican la variancia espectral en una matriz se calcula por comparación de la sumatoria de los errores residuales al cuadrado (RSSE) de la matriz reconstruida con un número creciente de PCs, con la sumatoria de errores cuadrados de la predicción (PRESS) de la validación cruzada.¹⁰¹ El número adecuado de PCs es aquel para el que la relación $PRESS(n)/RSSE(n-1)$ no es mayor que 1, donde n es un número dado de PCs. La Tabla 10 muestra los resultados obtenidos para una matriz de datos de una muestra incógnita simulada. Como puede verse, la matriz de datos incógnita es deficiente de rango, debido a que el número de PCs significativo es uno, mientras que el número de especies conocidas que contribuyen es dos. A pesar de que existe cierta selectividad en el modo espectral, los perfiles de tiempos idénticos llevan a la existencia de un único componente principal significativo para este sistema.

Para superar el problema de deficiencia de rango, se puede utilizar la aumentación matricial, lo que facilita la resolución.^{99,100} La aplicación de SVD a las matrices aumentadas obtenidas en ambos modos de adición de patrón estima correctamente el rango, que en este caso es dos (Tabla 10). De este modo, las matrices de datos aumentadas son de rango completo, porque el número de PCs significativos y el número de especies químicas coincide.

Tabla 10. Validación cruzada del análisis de PCA de una matriz de datos de una muestra de validación simulada y de las matrices aumentadas en ambos modos de adición de patrón.

n^a	RSSE ^b	PRESS ^c	PRESS(n)/RSSE($n-1$)
Matriz de Datos de Validación			
1	2,40x10 ⁻⁵	2,92x10 ⁻⁵	–
2	2,21x10 ⁻⁵	3,14x10 ⁻⁵	1,05
3	1,94x10 ⁻⁵	3,36x10 ⁻⁵	1,18
4	1,76x10 ⁻⁵	3,36x10 ⁻⁵	1,33
Matrices de Datos Aumentadas: modo 1			
1	2,56x10 ⁻⁴	3,61x10 ⁻⁴	–
2	2,50x10 ⁻⁵	3,36x10 ⁻⁵	0,11
3	2,30x10 ⁻⁵	3,72x10 ⁻⁵	1,20
4	2,21x10 ⁻⁵	3,97x10 ⁻⁵	1,34
Matrices de Datos Aumentadas: modo 2			
1	5,76x10 ⁻⁴	7,29x10 ⁻⁴	–
2	2,50x10 ⁻⁵	3,48x10 ⁻⁵	0,05
3	2,30x10 ⁻⁵	3,72x10 ⁻⁵	1,20
4	2,21x10 ⁻⁵	4,10x10 ⁻⁵	1,37

^a n = número de PCs. El número de PCs significativos está en negrita.

^b RSSE = sumatoria de los errores residuales al cuadrado después de reconstruir la matriz con el número indicado de PCs.

^c PRESS = sumatoria de errores cuadrados predichos correspondientes a la validación cruzada con el número indicado de PCs.

Resultados de predicción

El análisis de muestras incógnita simuladas se llevó a cabo en primer lugar en el modo 1 de adición de patrón clásico. Cada matriz de datos fue aumentada en la dirección del tiempo de decaimiento de la señal luminiscente, que es la dimensión que presenta solapamiento extremo, y esta matriz aumentada se analizó con MCR-ALS, imponiéndose restricciones de no-negatividad en todos los perfiles, e inicializando el ajuste de cuadrados mínimos con los perfiles espectrales de ambos componentes (analito e interferencia) provistos por el algoritmo *purest*.⁸³⁻⁸⁵ Después de llegar a la convergencia, MCR-ALS recupera perfiles espectrales satisfactorios, como se puede observar en la Figura 32A, que muestra los espectros recuperados para ambos componentes, y que pueden ser comparados con los de la Figura 13A (página 46). Los perfiles de tiempo recuperados para los sucesivos datos matriciales se muestran en la Figura 32B, ilustrando cómo la concentración del analito (línea sólida) aumenta desde la muestra de validación (sub-matriz de la izquierda) hacia las adicionadas con el analito (las tres sub-matrices adyacentes), mientras que la interferencia (línea de guión) permanece casi constante, como es de esperar. Estas figuras ilustran la notable capacidad de MCR-ALS en descomponer la serie de datos en la cual los dos componentes tienen perfiles de tiempos idénticos.

Luego de la descomposición de la matriz aumentada en el modo 1 de adición de patrón, se obtienen los *scores* para las muestras incógnita que se transforman en concentraciones del analito por medio de las ecuaciones de adición de patrón mencionadas anteriormente (Ecuaciones (26) y (27), página 67). Los resultados de las predicciones muestran un valor de RMSE de 0,017 unidades, correspondientes a un REP% de 3,4% con respecto a la concentración promedio de validación (0,5 unidades).

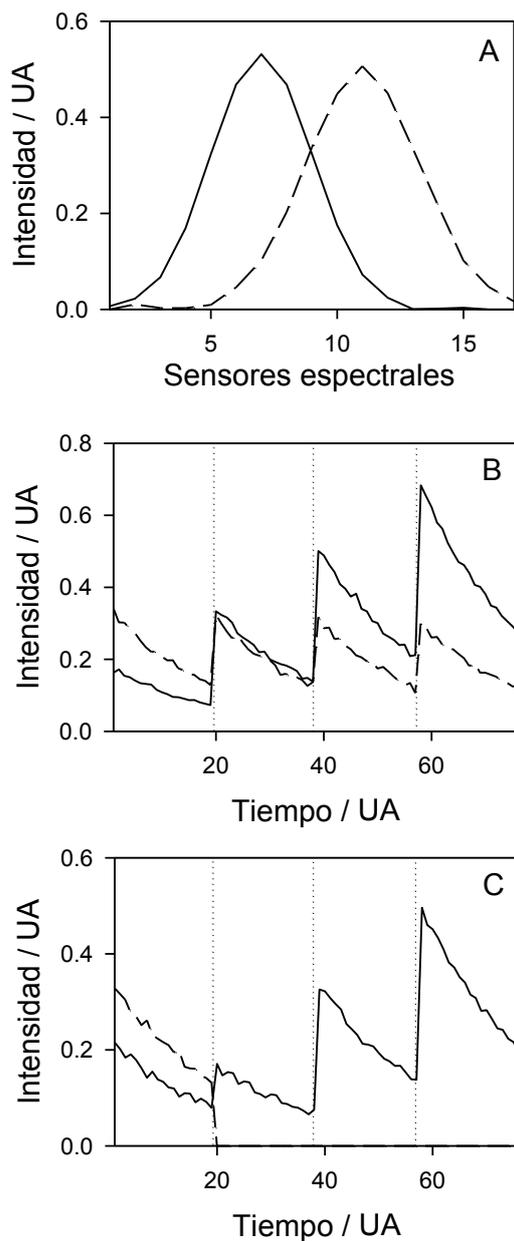


Figura 32. Perfiles recuperados por MCR-ALS cuando se procesa una muestra de validación típica de datos simulados, junto con matrices de adición de patrón. (A) Perfiles espectrales, comunes a todas las muestras en el modo 1 de adición de patrón (los obtenidos en el modo 2 son idénticos). (B) Perfiles de tiempos de decaimiento para las sucesivas matrices en el modo 1, (la línea de punto separa las distintas muestras: de izquierda a derecha, muestra de validación y las tres de adición de patrón). (C) Perfiles de tiempos de decaimiento para las sucesivas matrices en el modo 2. La línea de punto separa las distintas muestras: de izquierda a derecha, muestra de validación y el resultado de la substracción de la muestra de validación de las tres matrices de adición de patrón. En todos los casos, la línea sólida se refiere al analito y la línea de guión al interferente.

En el modo alternativo de adición de patrón (modo 2), el análisis de MCR-ALS emplea condiciones de inicialización y restricciones similares durante el ajuste con cuadrados mínimos, y utiliza la información adicional provista por la correspondencia entre especies y muestras. Los perfiles espectrales recuperados por el algoritmo fueron nuevamente muy similares a los de la Figura 13A (página 46), mientras que los correspondientes a la dimensiones del tiempo, presentados en la Figura 32C, se interpretan considerando que el perfil de la interferencia sólo contribuye en la muestra de validación, y los perfiles del analito lo hacen en las tres sub-matrices de la derecha. Esto permite que la cuantificación pueda realizarse usando las ecuaciones de calibración usual, aplicando la Ecuación (28) (página 69), donde los *scores* de la sub-matriz de la izquierda se interpolan en la Ecuación (29) (página 69).

Los resultados de predicción obtenidos para el analito resultan en este segundo modo considerablemente mejores que los alcanzados en el modo 1. El valor de RMSE decrece a 0,007 unidades de concentración, correspondiente a un REP% de sólo 1,4%. Esta mejora analítica se atribuye a un menor grado de solapamiento en la dirección del tiempo cuando se aplica adición de patrón alternativa, o modo 2. Para cuantificar el grado de solapamiento en los perfiles de tiempos de decaimiento entre los componentes 1 y 2, se utiliza una expresión análoga a la del coeficiente de correlación cuadrático (Ecuación (1), página 39), los solapamientos para el modo 1 y para el modo 2 son 0,90 y 0,26 respectivamente. Este resultado justifica una mejor capacidad de predicción para adición de patrón en el modo 2.

Datos experimentales

Optimización de la señal luminiscente

Antes de comenzar con la aplicación del método de calibración multivariado de segundo orden, se estudiaron las condiciones experimentales para obtener las señales óptimas de LSETD. Se realizaron optimizaciones univariadas, obteniéndose las siguientes condiciones óptimas: (1) para la concentración de terbio (III) fue de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (2) para la concentración del surfactante SDS

fue de $4,8 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹, (3) para la concentración del desoxigenante sulfito de sodio fue de $7,5 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ y (4) para el pH fue de 6,5. Estas condiciones se utilizaron para todos los experimentos realizados con los tres analitos estudiados.

La necesidad de la adición de patrón

Al abordar el análisis de fluoroquinolonas en suero, la primera característica a evaluar es la necesidad de emplear el método de adición de patrón. Como ya se ha mencionado en la introducción (página 8), esta técnica se requiere cuando la pendiente de la curva de regresión univariada cambia en presencia de la matriz del fondo. Para corroborar esto, se realizaron las curvas de calibración univariada (intensidad de luminiscencia en función de la concentración del analito) para cada analito en presencia de suero, y se las comparó con las obtenidas en solución acuosa. Los resultados obtenidos para la ciprofloxacina en agua, por ejemplo, con seis concentraciones diferentes en el rango lineal (0,0-0,50 mg L⁻¹) fueron: pendiente = 185(2), ordenada al origen = 2,2(5), $r^2 = 0,9985$ (entre paréntesis se muestra la desviación estándar en la última cifra significativa), mientras que en un suero típico los resultados obtenidos fueron: pendiente = 142(3), ordenada al origen = 10(1), $r^2 = 0,9999$. Los resultados sugieren un cambio significativo en la pendiente (decrece 43 unidades de pendiente, 17 veces mayor que el promedio de la desviación estándar). Además, las regiones elípticas de confianza conjunta para cada par de pendiente y su ordenada (al 95% de nivel de confianza) no coinciden, confirmando un comportamiento diferente de la señal del analito en ausencia y presencia de suero. Estos resultados pueden ser atribuidos, en principio, a las interacciones entre el analito y el fondo del suero, requiriendo adición de patrón para cuantificaciones satisfactorias de los compuestos estudiados, como ya se ha explicado. Recientemente, se ha propuesto una alternativa a la adición de patrón que consiste en realizar la calibración externa en presencia de la matriz.²³ Sin embargo, en el presente caso, se encontró que cada suero produce cambios diferentes en la respuesta del analito, haciendo esta última alternativa irrealizable.

En presencia de componentes inesperados en la muestra que produzcan complejos luminiscentes con el terbio (III), tal como el salicilato, la adición de

patrón debe complementarse con la medición de datos de segundo orden, en este caso matrices LSETD, intensidad de luminiscencia en función de la excitación y los tiempos de decaimiento, de modo de aprovechar la ventaja de segundo orden. Se debe notar que los blancos de suero no producen señal luminiscente significativa bajo las condiciones de trabajo utilizadas, confirmando que el único efecto de la matriz es un cambio en la intensidad del complejo analito-terbio (III).

Perfiles espectrales y tiempos de decaimiento

La Figura 33 muestra una superficie típica de datos LSETD para una muestra de suero conteniendo ciprofloxacina y salicilato.

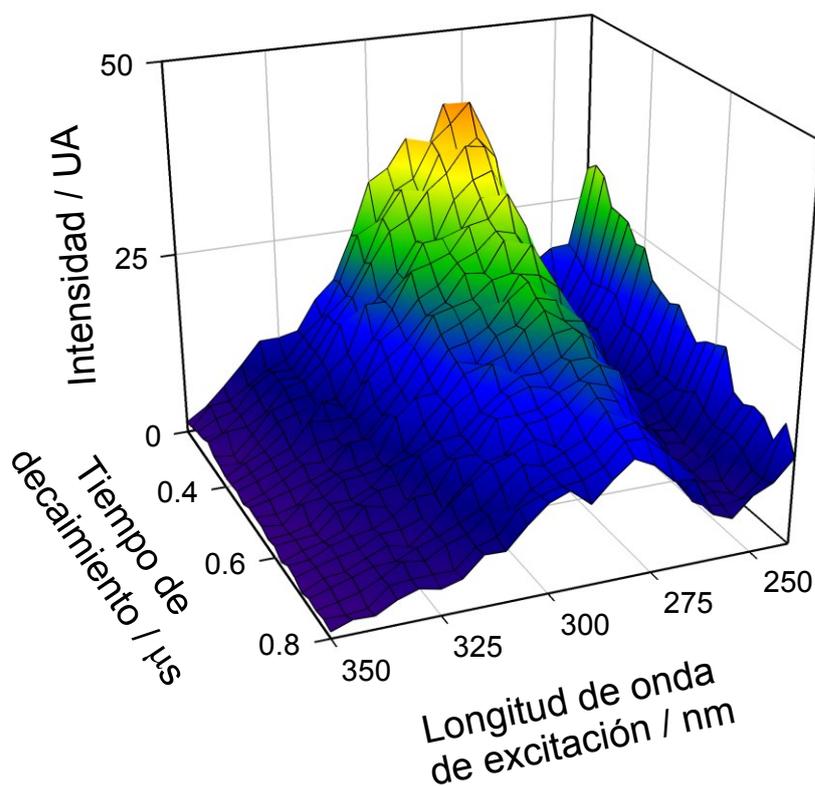


Figura 33. Matriz tridimensional LSETD, intensidad luminiscente en función del tiempo de decaimiento y la longitud de onda de excitación, correspondiente a una muestra de suero que contiene $0,14 \text{ mg L}^{-1}$ de ciprofloxacina y $11,8 \text{ mg L}^{-1}$ de salicilato.

Se debe recordar que todas las matrices de LSETD del presente estudio han sido obtenidas manteniendo la longitud de onda de emisión fija a 545 nm, correspondiente a la línea de intensidad máxima de emisión del terbio (III). Debido a que la emisión siempre se consigue a partir de un estado excitado del ión lantánido, esta dimensión no aporta selectividad al análisis, y esta es la razón por la cual se mantiene constante. Como se ha mencionado en la introducción, un requerimiento importante para la aplicación de la mayoría de los algoritmos de calibración multivariada de segundo orden es que la selectividad entre el analito calibrado y el interferente en ambos modos de medición sea suficiente. En el presente caso, el modo de excitación muestra buena selectividad entre el analito y el salicilato (Figura 34A), mientras que en el modo del tiempo la selectividad es bastante pobre, como se muestra en la Figura 34B. Los tiempos de vida correspondientes a los perfiles mostrados en la figura anterior se obtuvieron a partir de una regresión de mínimos cuadrados no-lineales con la expresión de decaimiento exponencial $f(t) = \exp(-t / T)$, resultando 0,60(1) para la ciprofloxacina, 0,62(1) para la norfloxacina, 0,57(1) para la danofloxacina y 0,59(1) para el salicilato, (valores en ms, entre paréntesis se muestra la desviación estándar en la última cifra significativa), lo que confirma que todos son muy similares y por lo tanto una falta de selectividad en el modo tiempo. En efecto, el grado de solapamiento entre los perfiles de tiempos de decaimiento para cada uno de los complejos del lantánido con las fluoroquinolonas y para el interferente salicilato, calculados con la Ecuación (1) (página 39), fueron 0,9991, 0,9998 y 0,9996 para ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina, respectivamente.

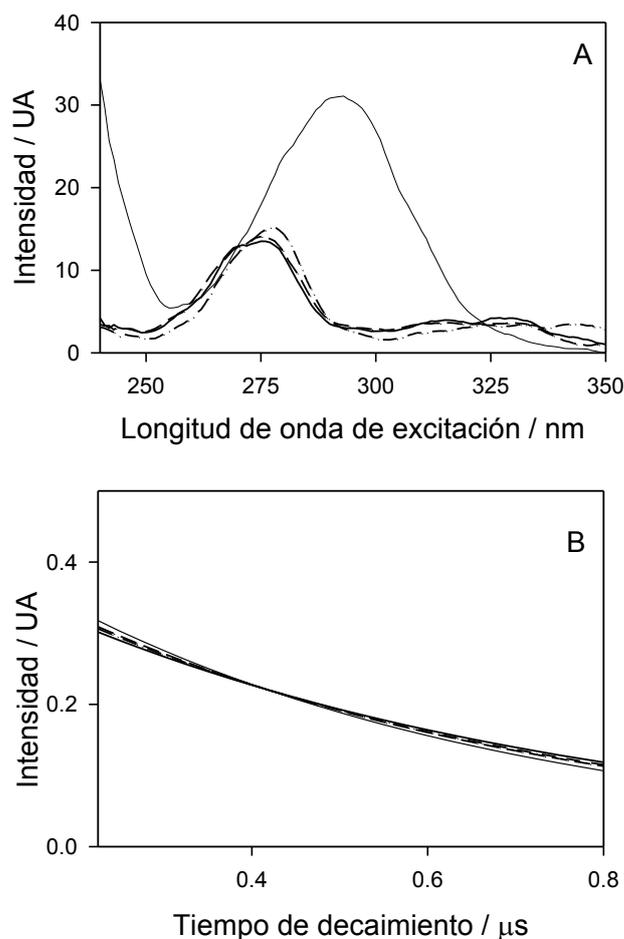


Figura 34. (A) Espectros de excitación de luminiscencia sensibilizada de lantánidos para los complejos de terbio (III) con los analitos estudiados en presencia de suero, todos a concentraciones de $0,1 \text{ mg L}^{-1}$: ciprofloxacina (línea sólida), norfloxacina (línea de guión) y danofloxacina (línea de guión y punto). La línea continua delgada corresponde al espectro de excitación para el salicilato ($8,0 \text{ mg L}^{-1}$ en suero). (B) Curvas de tiempos de decaimiento para todos los componentes mostrados en la parte (A), luego de normalizar a longitud unitaria. Las líneas son iguales a las indicadas en el gráfico (A).

Resultados de predicción

Como la selectividad en la dimensión del tiempo es muy pobre, el sistema experimental fluoroquinolonas-salicilato es similar al de los datos simulados. Por lo tanto, MCR-ALS se eligió como el algoritmo de calibración multivariada de segundo orden para el procesamiento de estos datos. Debido al cambio significativo de pendiente de la recta que relaciona la intensidad de la señal con la concentración del analito en presencia de suero discutido anteriormente, MCR-ALS se implementó con datos de segundo orden provenientes del método de

adición de patrón. Como se discutió en relación con las series de datos simulados, la mejor alternativa es usar el modo 2 de adición de patrón, empleándose el mismo en todos los sistemas evaluados.

Como ya se explicó al analizar los datos simulados, el análisis de rango se llevó a cabo aplicando el análisis de PCA a las matrices aumentadas antes de aplicar la descomposición con MCR-ALS. La Tabla 11 muestra a modo de ejemplo los resultados para el estudio de PCA de una muestra típica de suero, donde la concentración de salicilato es significativa. Como se puede apreciar, las matrices de datos de la incógnita son deficientes de rango, porque PCA sólo puede detectar un único PC significativo, mientras que se requieren dos PCs para explicar la variabilidad espectral a través de la matriz de datos aumentada. Estos dos componentes corresponden a las respuestas del analito y del potencial interferente. Este análisis de rango fue llevado a cabo para todas las muestras incógnita antes de la aplicación de MCR-ALS. En ciertos casos, a pesar de que los sueros se adicionaron con el analito y también con el potencial interferente, se encontró que el rango de las matrices aumentadas fue de uno. Estas matrices son también de rango completo, debido a que la señal originada por el complejo de terbio (III) con el interferente salicilato es indistinguible del ruido instrumental, y el único componente que genera señal significativa es el analito. En todos estos casos, MCR-ALS provee un ajuste satisfactorio cuando se considera una sola respuesta, que corresponde al espectro característico de los complejos de los analitos. Se debe destacar que si bien el salicilato tiene un espectro intenso (Figura 34A), cuando se compleja con terbio (III) en presencia de las fluoroquinolonas la intensidad del complejo observada es menor, probablemente como consecuencia de una competición entre la fluoroquinolona y salicilato por el terbio (III).

Tabla 11. Análisis de validación cruzada de PCA para los datos matriciales de una muestra típica de suero que contiene ciprofloxacina y salicilato, y para las correspondientes matrices aumentadas de adición de patrón.

n^a	RSSE ^b	PRESS ^c	PRESS(n)/RSSE($n-1$)
Matriz de Datos de Validación			
1	1,01	1,12	–
2	0,96	1,15	1,06
3	0,91	1,16	1,20
4	0,86	1,19	1,39
Matrices de Datos Aumentadas: modo 2			
1	1,67	1,71	–
2	1,39	1,44	0,68
3	1,32	1,40	1,00
4	1,28	1,39	1,01

^a n = número de PCs. El número de PCs significativos se indica en negrita.

^b RSSE = sumatoria de los errores residuales al cuadrado después de reconstruir la matriz con el número indicado de PCs.

^c PRESS = sumatoria de errores cuadrados predichos correspondientes a la validación cruzada con el número indicado de PCs.

La Figura 35 muestra los resultados obtenidos luego de la descomposición con MCR-ALS para una muestra de suero típica que contiene ciprofloxacina y salicilato, que requiere de dos componentes para un procesamiento satisfactorio de los datos. En la Figura 35A se visualizan los perfiles espectrales recuperados, similares a los de los complejos del analito y de la potencial interferencia (comparar con Figura 34A). Si bien los perfiles de la Figura 35A están normalizados a la unidad, se observa que las características principales del espectro de la ciprofloxacina y salicilato, máximos alrededor de 275 y 300 nm, respectivamente, son bien recuperadas. Por otro lado, la Figura 35B muestra la progresión de los perfiles de tiempos de decaimiento para una muestra incógnita típica analizada en el modo 2 de adición de patrón. El sub-gráfico de la izquierda corresponde a la muestra incógnita, en el cual se observan los perfiles del analito y del interferente. Los tres restantes sub-gráficos corresponden a las matrices obtenidas luego de sustraer la matriz de la muestra incógnita a cada una de las

matrices de adición de patrón, en los cuales el perfil de la interferencia está ausente.

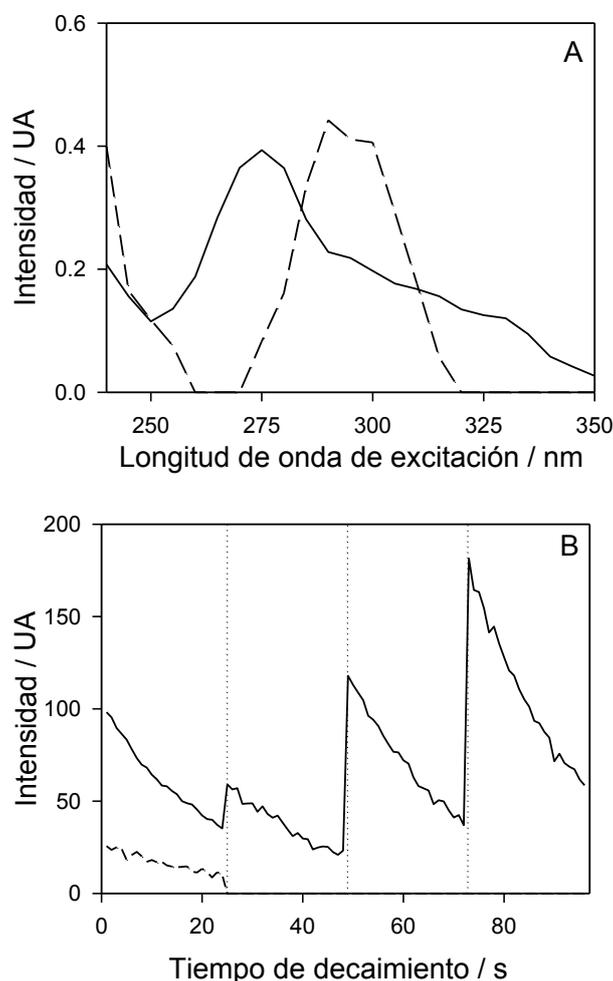


Figura 35. Resultados de MCR-ALS para una muestra típica de suero, que contiene ciprofloxacina ($0,14 \text{ mg L}^{-1}$) y salicilato ($11,8 \text{ mg L}^{-1}$). (A) Perfiles de excitación de luminiscencia sensibilizada de lantánidos para los complejos de terbio (III) con ambos componentes de la muestra. (B) Perfiles de tiempos de decaimiento para las sucesivas matrices en el modo 2 de adición de patrón. La línea de puntos separa las diferentes muestras: de izquierda a derecha, muestra incógnita y resultados de la substracción de la muestra incógnita a cada una de las matrices de adición de patrón. En todos los casos la línea sólida representa al analito y la línea de guión al interferente.

Se debe hacer hincapié en que el análisis planteado no puede ser resuelto por una calibración univariada empleando señales luminiscentes en presencia de un potencial interferente en una dada muestra. Este problema se resuelve empleando datos de segundo orden, que pueden obtener la ventaja de segundo orden. Esta estrategia es posible para modelar muestras con componentes

inesperados que generan interferencia, permitiendo la cuantificación del analito en muestras complejas.

En las Tablas 12-14 se encuentran los resultados de predicción para todas las muestras analizadas, usando la metodología desarrollada para los sistemas en estudio. Las muestras que contienen un único componente podrían ser analizadas usando adición de patrón univariada. Sin embargo, en las tablas se informan los resultados provistos por el análisis MCR-ALS porque: (1) este provee mayor sensibilidad y (2) todos los resultados pueden ser comparados sobre una misma base.

Globalmente, los resultados son satisfactorios, ya que los RMSE, expresados en mg L^{-1} , son 0,02, 0,03 y 0,02 para ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina, respectivamente, es decir, se encuentran en el rango de las ppb. Estos valores corresponden a REP% de 8,3, 15 y 10%, respectivamente, todos razonables si se tiene en cuenta la complejidad del presente análisis. Aunque resulta difícil evaluar el límite de detección para adición de patrón usando MCR-ALS, los resultados sugieren que esta cifra de mérito se encontraría alrededor de $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ para los tres analitos, basándose en los valores de RMSE y en el hecho de que las muestras blanco de suero que sólo contienen salicilato, arrojan valores de predicción de $0,01\text{-}0,02 \text{ mg L}^{-1}$ (Tablas 12-14). También se calculó la prueba t de comparación de pares⁷³ obteniéndose para la ciprofloxacina un $t_{\text{exp}} = 1,38$, el cual resultó ser menor que $t_{\text{crit}} = 2,13$ (con un 95% de nivel de confianza y 15 grados de libertad); para la norfloxacina un $t_{\text{exp}} = 1,79$, el cual resultó ser menor que $t_{\text{crit}} = 2,18$ (con un 95% de nivel de confianza y 12 grados de libertad) y para la danofloxacina un $t_{\text{exp}} = 0,22$, el cual resultó ser menor que $t_{\text{crit}} = 2,16$ (con un 95% de nivel de confianza y 13 grados de libertad); concluyendo en todos los casos que los valores predichos por N-PLS/RBL no difieren estadísticamente de los valores nominales.

Tabla 12. Resultados de predicción para las muestras de validación de suero que contiene ciprofloxacina y salicilato.

Muestra	Nominal analito mg L ⁻¹	Salicilato mg L ⁻¹	Suero ^a	Predicción analito mg L ⁻¹	Componentes MCR ^b
1	0,22	9,80	A	0,24	1
2	0,22	9,80	D	0,19	1
3	0,24	10,80	A	0,23	1
4	0,19	7,30	A	0,19	1
5	0,14	11,80	B	0,16	2
6	0,00	8,00	B	0,02	2
7	0,13	4,00	B	0,12	1
8	0,13	4,00	D	0,15	1
9	0,17	5,50	C	0,17	2
10	0,17	5,50	D	0,20	2
11	0,11	6,10	C	0,14	2
12	0,18	11,20	C	0,15	1
13	0,18	11,20	D	0,19	2
14	0,08	6,40	E	0,08	1
15	0,08	10,00	E	0,10	1
16	0,08	10,00	F	0,10	2
RMSE				0,02	
REP%				8,3	

^a La letra identifica el tipo de suero utilizado para la preparación de la muestra.

^b Número de componentes utilizados en la descomposición de MCR de la matriz aumentada, determinados con PCA (ver texto).

Tabla 13. Resultados de predicción para las muestras de validación de suero que contiene norfloxacina y salicilato.

Muestra	Nominal analito mg L ⁻¹	Salicilato mg L ⁻¹	Suero ^a	Predicción analito mg L ⁻¹	Componentes MCR ^b
1	0,10	8,00	A	0,09	1
2	0,10	8,00	B	0,12	2
3	0,18	8,20	C	0,14	2
4	0,18	8,20	D	0,25	2
5	0,12	9,80	C	0,12	1
6	0,08	9,00	E	0,09	1
7	0,08	9,00	F	0,09	1
8	0,00	6,70	F	0,02	2
9	0,15	9,30	G	0,20	2
10	0,20	9,00	G	0,25	2
11	0,16	6,10	H	0,10	1
12	0,14	4,60	H	0,12	1
13	0,09	5,10	H	0,09	1
RMSE				0,03	
REP%				15	

^a La letra identifica el tipo de suero utilizado para la preparación de la muestra.

^b Número de componentes utilizados en la descomposición de MCR de la matriz aumentada, determinados con PCA (ver texto).

Tabla 14. Resultados de predicción para las muestras de validación de suero que contiene danofloxacin y salicilato.

Muestra	Nominal analito mg L ⁻¹	Salicilato mg L ⁻¹	Suero ^a	Predicción analito mg L ⁻¹	Componentes MCR ^b
1	0,10	10,00	A	0,11	2
2	0,10	10,00	B	0,10	2
3	0,10	8,00	A	0,11	2
4	0,10	8,00	B	0,11	2
5	0,18	8,20	C	0,18	1
6	0,12	9,80	C	0,12	1
7	0,08	9,00	C	0,09	1
8	0,00	6,70	D	0,02	2
9	0,00	6,70	F	-0,01	2
10	0,15	9,30	D	0,19	2
11	0,20	9,00	E	0,14	1
12	0,16	6,10	E	0,17	1
13	0,14	4,60	F	0,17	1
14	0,09	5,10	F	0,10	2
RMSE				0,02	
REP%				10	

^a La letra identifica el tipo de suero utilizado para la preparación de la muestra.

^b Número de componentes utilizados en la descomposición de MCR de la matriz aumentada, determinados con PCA (ver texto).

UN NUEVO PROCEDIMIENTO DE RBL PARA DATOS CON DEPENDENCIA LINEAL. DETERMINACIÓN DE CIPROFLOXACINA EN ORINA Y SUERO

Como ya se ha mencionado, la cuantificación de un analito en presencia de componentes no contemplados en la calibración, puede realizarse empleando métodos de segundo orden, entre los que podemos mencionar U-PLS/RBL. Sin embargo, al igual que N-PLS/RBL y PARAFAC, este algoritmo falla cuando el analito y el interferente presentan perfiles idénticos en una de las dimensiones de

los datos. Hasta el momento sólo MCR-ALS y PARALIND pueden resolver el problema de dependencia lineal. Sin embargo, en la presente Tesis se desarrolló un nuevo procedimiento denominado RBL-LD que tiene en cuenta la dependencia lineal de los datos. Este procedimiento se aplicó a datos simulados y a dos sistemas experimentales que involucran la determinación del antibiótico ciprofloxacina. Los datos obtenidos con el nuevo procedimiento se compararon con los algoritmos que solventan la dependencia lineal.

Datos simulados

En el sistema simulado, en las muestras de calibración sólo está presente el analito, mientras que todas las muestras de validación contienen ambos componentes, es decir que para cuantificar con exactitud al analito, se requiere de la ventaja de segundo orden. El procesamiento de los datos usando los diferentes algoritmos se realizó considerando que el sistema presenta dos componentes: un analito calibrado y un agente interferente. Sin embargo, en los casos reales el número de componente debió ser establecido usando un análisis estadístico de los datos experimentales.

Al aplicar PARAFAC y U-PLS/RBL de la manera usual para determinar al analito en las 100 muestras de validación del sistema simulado, se obtuvieron recuperaciones pobres. Los resultados se muestran en el gráfico de *Box and Whisker* (Figura 36, algoritmos 1 y 2), donde se comparan con los demás algoritmos.

Como se discutió previamente, MCR-ALS puede ser aplicado a este tipo de problema, en el modo de aumentación espectral. En este caso, la dependencia lineal de los perfiles espectrales entre el analito y el interferente es convenientemente eliminada, ya que el interferente sólo aparece en la matriz de validación, mientras que el analito está presente en todas las muestras. La matriz de datos aumentada se creó con cada muestra de validación y las matrices de calibración, de tal manera que la misma presentó un tamaño de 50x200 (que resulta de ubicar cinco matrices adyacentes una a otra en la dimensión espectral). Luego se realizó la descomposición imponiendo restricciones de no-negatividad para ambos componentes en ambas dimensiones. Otra restricción impuesta al

modelo durante la minimización de ALS fue la correspondencia entre especies, suministrando información de la ausencia del interferente en las muestras de calibración. Finalmente, también se aplicó la restricción de concentración, la cual correlaciona la concentración nominal del analito en las muestras de calibración con sus correspondientes *scores* durante la fase de ajuste de cuadrados mínimos. Los resultados muestran similitud entre los valores de concentraciones nominales y las predichas (Figura 36, algoritmo 3).

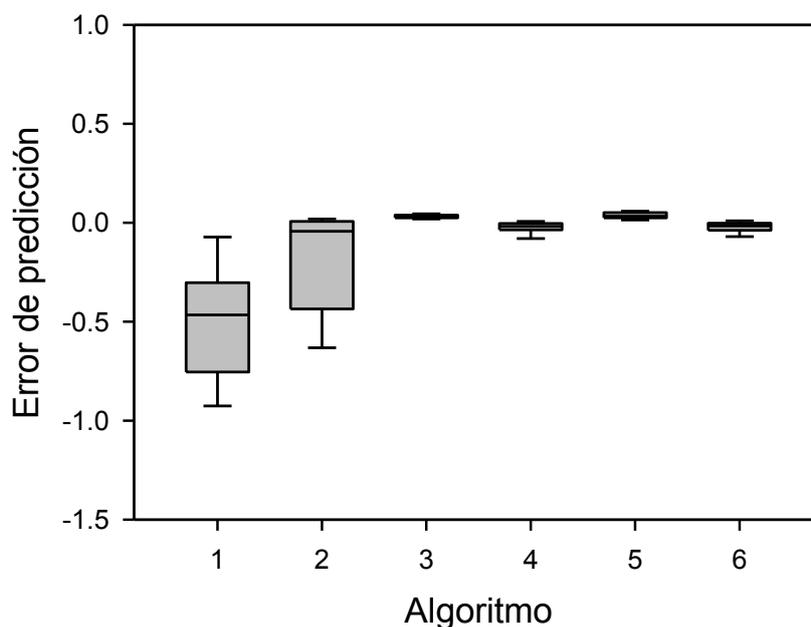


Figura 36. Gráfico de *Box and Whisker* para los resultados de las predicciones de las 100 muestras de validación del sistema de datos simulados. Los algoritmos se enumeran en el eje horizontal de la siguiente manera: (1) U-PLS/RBL, (2) PARAFAC, (3) MCR-ALS, (4) PARALIND, (5) U-PLS/RBL-LD (versión MCR-ALS) y (6) U-PLS/RBL-LD (versión PARALIND). Para cada algoritmo, la caja gris contiene entre el 25% y 75% de los cuartiles, con la mediana dentro de la misma. Los niveles extremos corresponden al 5% y 95% de los cuartiles.

Del mismo modo, se aplicó el modelo PARALIND al conjunto de las 100 muestras simuladas de validación. En este caso, se introdujo una matriz de interacción \mathbf{H} (ver Ecuación (6), página 55) que permite la descomposición de los datos tridimensionales formados por cada matriz de validación y por las cuatro de calibración, en términos de un único *loading* espectral y dos *loadings* en la dimensión del tiempo. Los *scores* contenidos en la matriz \mathbf{A} se emplean luego para predecir la concentración del analito por medio de un gráfico de calibración

pseudo-univariado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 36 (algoritmo 4) e indican una buena habilidad de predicción de este modelo para los datos simulados.

Finalmente, se aplicó el nuevo modelo RBL-LD en combinación con U-PLS a los datos simulados. En este caso, la calibración fue realizada usando una única variable latente para construir el modelo U-PLS ($A=1$) y se consideró un único componente de RBL-LD para modelar la contribución del agente interferente ($N_{\text{RBL-LD}}=1$). Para aplicar el procedimiento RBL-LD, se utilizó por separado MCR-ALS y PARALIND. En el caso de la versión de MCR-ALS, la matriz residual \mathbf{E}_p (Ecuación (21), página 63), se aumentó con las matrices de calibración en la dirección espectral.

Es importante analizar los perfiles recuperados por el procedimiento RBL-LD, ya que el éxito de esta etapa es crucial para lograr la ventaja de segundo orden en este modelo. La Figura 37 muestra los perfiles recuperados en la dimensión espectral en el análisis de una típica muestra de validación. Como se puede observar, se recuperan de forma correcta los espectros, con un comportamiento esperado en términos de ausencia y presencia de un componente dado en cada una de las muestras analizadas con la metodología RBL-LD, como se indica en la Figura 37.

Cuando se aplica la versión de PARALIND, la matriz residual y las matrices de calibración se unen en una única matriz tridimensional. Los perfiles recuperados por la descomposición de esta matriz son similares a los usados para construir los datos simulados (Figura 14, página 50).

Los resultados de predicción de este nuevo modelo (Figura 36, algoritmos 5 y 6) son similares a los obtenidos con MCR-ALS y con PARALIND. Se estableció una comparación entre estos algoritmos: los resultados estadísticos (promedios) conducen a los siguientes sesgos y valores de RMSE: MCR-ALS, 0,033 y 0,032; PARALIND, 0,034 y 0,055; U-PLS/RBL-LD (versión MCR-ALS), 0,034 y 0,034; y U-PLS/RBL-LD (versión PARALIND), 0,030 y 0,040 (todos los resultados están expresados en UA de concentración). Estas cifras indican sesgos comparables entre todas las metodologías, siendo ligeramente mejores los valores de RMSE para MCR-ALS y para el nuevo método U-PLS/RBL-LD usando la versión MCR-ALS.

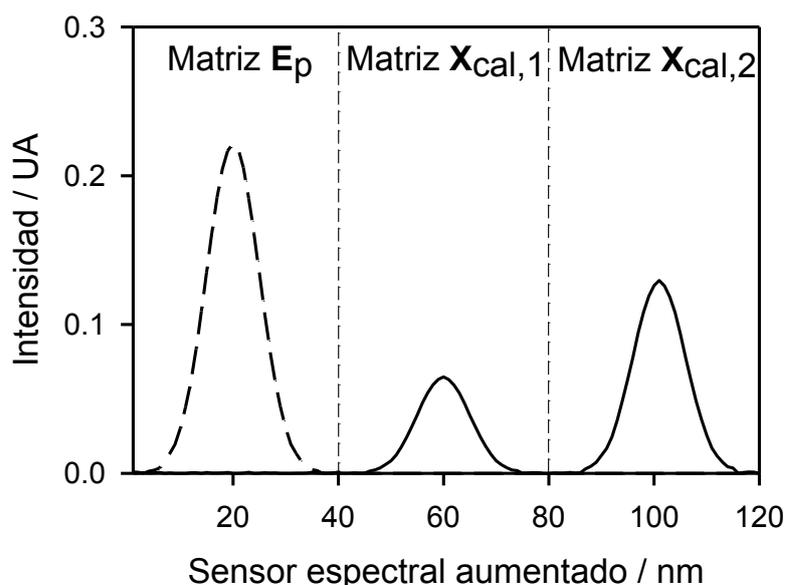


Figura 37. Perfiles recuperados por U-PLS/RBL-LD de una típica muestra de validación aumentada en la dimensión espectral, usando datos simulados. Como se indica sólo se muestra la sub-matriz residual E_p y las dos primeras matrices de calibración. La línea sólida corresponde al analito y la línea de guión al potencial interferente. Los perfiles aumentados muestran la contribución relativa del analito en las muestras de calibración y la contribución del interferente en una muestra particular de validación.

Datos experimentales

Determinación de ciprofloxacina en orina a partir de señales quimioluminiscentes

Si bien en la literatura se han publicado numerosos trabajos de análisis de fluoroquinolonas en fármacos y en muestras biomédicas^{77,102-104} empleando señales de quimioluminiscencia,¹⁰⁵ en ninguna de ellas se usaron señales de segundo orden tal como las que a continuación discutiremos.

En este sistema experimental se analizó un nuevo tipo de señal de segundo orden para la determinación del antibiótico ciprofloxacina en muestras orina, en presencia de la interferencia producida por el fondo del fluido biológico. Los datos matriciales comprenden como primera dimensión el tiempo de evolución de quimioluminiscencia de un complejo de rutenio y en la segunda dimensión el espectro de emisión quimioluminiscente del rutenio, que es común a todos los constituyentes.

Selección del sistema quimioluminiscente

Para la obtención de la señal quimioluminiscente se seleccionó $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$, debido a que se trata de un sistema de detección muy sensible para compuestos que contienen aminas alifáticas secundarias o terciarias.¹⁰⁶ La fluoroquinolona analizada, ciprofloxacina, contiene una amina secundaria en su estructura molecular. El esquema de la Figura 38 resume la secuencia de reacciones que conducen a la generación de quimioluminiscencia en el sistema experimental en estudio:

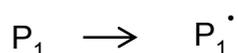
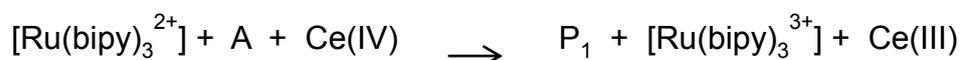


Figura 38. Esquema de reacciones quimioluminiscentes, donde A corresponde al analito, P_1 y P_2 a los productos de oxidación del analito.

Antes de comenzar con la aplicación del método de calibración multivariado de segundo orden, se estudiaron las condiciones experimentales para obtener las señales óptimas de quimioluminiscencia. Se realizaron optimizaciones univariadas con diferentes orinas, obteniéndose las siguientes concentraciones óptimas: (1) $8,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ para $[\text{Ru}(\text{bipy})_3^{2+}]$, (2) $5,0 \times 10^{-1} \text{ mol L}^{-1}$ para H_2SO_4 y (3) $9,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ para cerio (IV). Estas condiciones óptimas se utilizaron para todos los experimentos.

Perfiles espectrales y tiempos de reacción

La Figura 39 muestra una superficie típica de datos de señal quimioluminiscente en función del tiempo y de la longitud de onda de emisión para una muestra de orina conteniendo ciprofloxacina.

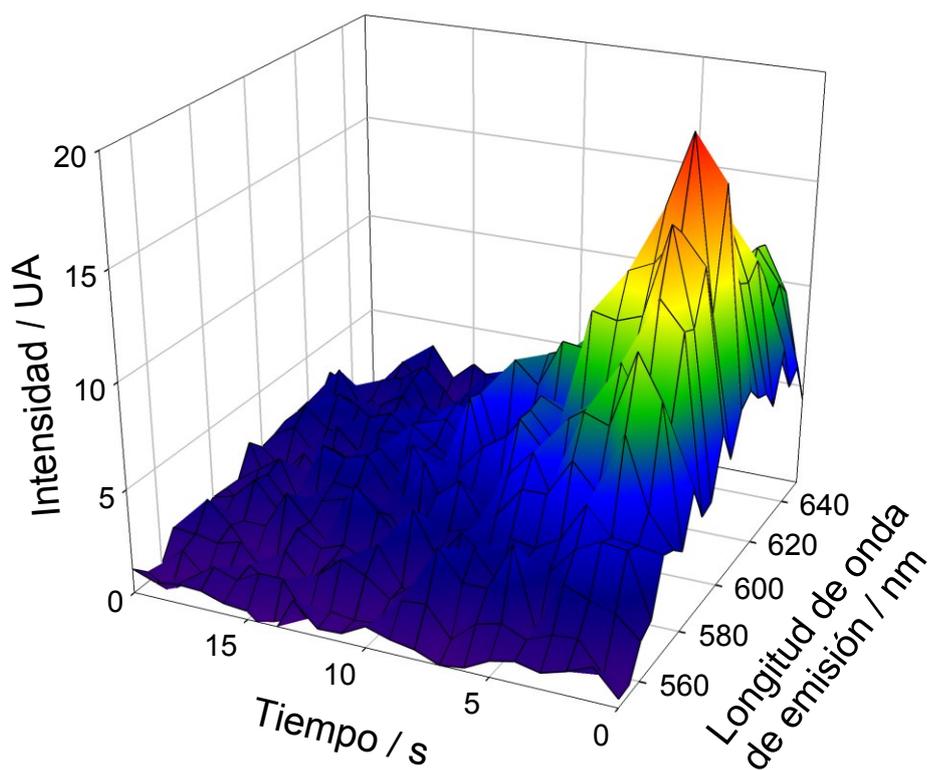


Figura 39. Matriz tridimensional quimioluminiscente en función del tiempo y de la longitud de onda de emisión, correspondiente a una muestra de orina que contiene 15 mg L^{-1} de ciprofloxacina.

Como ya se ha discutido, un requerimiento importante para la aplicación de la mayoría de los algoritmos de calibración multivariada de segundo orden es que la selectividad entre el analito calibrado y el interferente en ambos modos de medición sea adecuada. En este sistema experimental, el modo temporal presenta una buena selectividad entre el analito y la orina (Figura 40A), mientras que en el modo emisivo la selectividad que se obtiene es bastante pobre, como se muestra en la Figura 40B, debido a que la emisión siempre se consigue a partir de un estado excitado del complejo de rutenio.

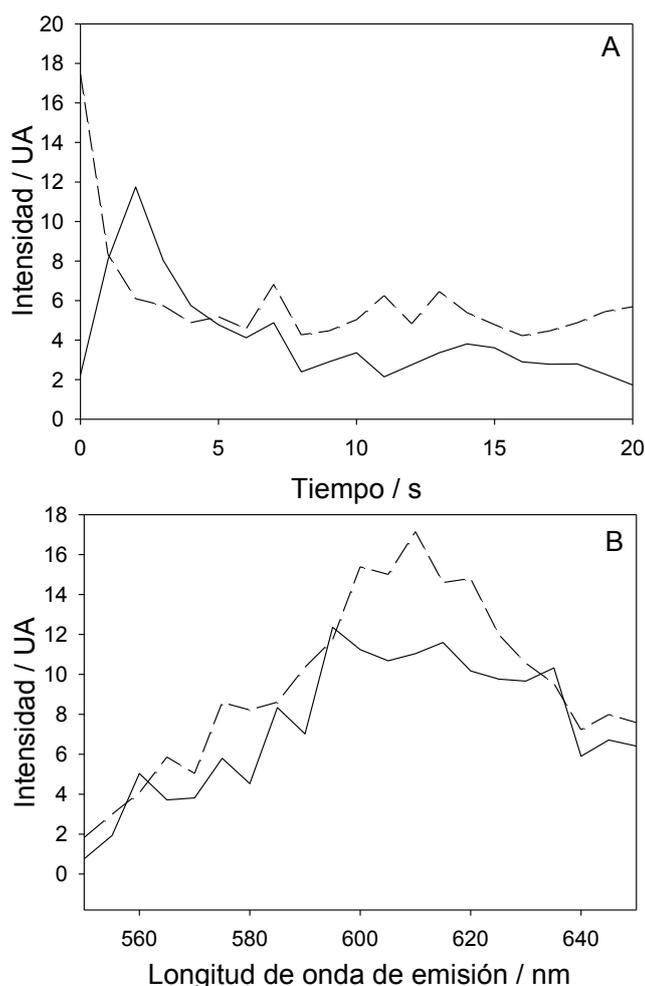


Figura 40. (A) Curvas de tiempos de evolución de la señal quimioluminiscente de la ciprofloxacina (15 mg L^{-1}) y de la orina. (B) Espectros de emisión quimioluminiscente para los componentes mostrados en la parte (A). En todos los casos la línea sólida representa a la ciprofloxacina y la línea de guión a la orina.

Resultados de predicción

Como ya se ha discutido, hasta el momento no hay en la literatura referencias que mencionen el empleo de este novedoso tipo de señal de segundo orden, de manera de aprovechar la ventaja de segundo orden.

Como en los sistemas evaluados anteriormente para cuantificar fluoroquinolonas en suero utilizando señales de luminiscencia sensibilizada de terbio (III), a causa del cambio significativo de pendiente de la recta que relaciona la intensidad de la señal con la concentración del analito en presencia de orina, fue necesario implementar el método de adición de patrón. En este caso el

análisis de los datos también se realizó empleando el modo de adición de patrón modificado o modo 2.

Antes de realizar el análisis específico se evaluó el número de variables latentes de calibración necesarias para el procedimiento U-PLS. Para esto se realizó la validación cruzada, a partir de la cual estableció que el número óptimo de componentes es 1. Durante el análisis de una muestra típica de orina que contiene ciprofloxacina, se estimó el número de componentes RBL-LD, calculando los residuos finales s_u (Ecuación (24), página 66) para un número creciente de interferentes. Este análisis llevó a la conclusión de que s_u se estabiliza con un único componente de RBL-LD.

Cuando una muestra típica de orina se procesa con el método U-PLS/RBL-LD en la versión MCR-ALS, que dio los mejores resultados en el análisis de los datos simulados, se recuperan perfiles adecuados en la dimensión aumentada espectral (Figura 41A) y en la del tiempo (Figura 41B). Estos perfiles muestran una similitud aceptable con los perfiles experimentales (Figura 40A y B). Además en la Figura 41 podemos apreciar la habilidad de este nuevo modelo para separar la contribución de la señal de fondo de la orina de la del analito en la matriz \mathbf{E}_p y en las matrices de calibración virtuales generadas por el modo de adición de patrón 2.

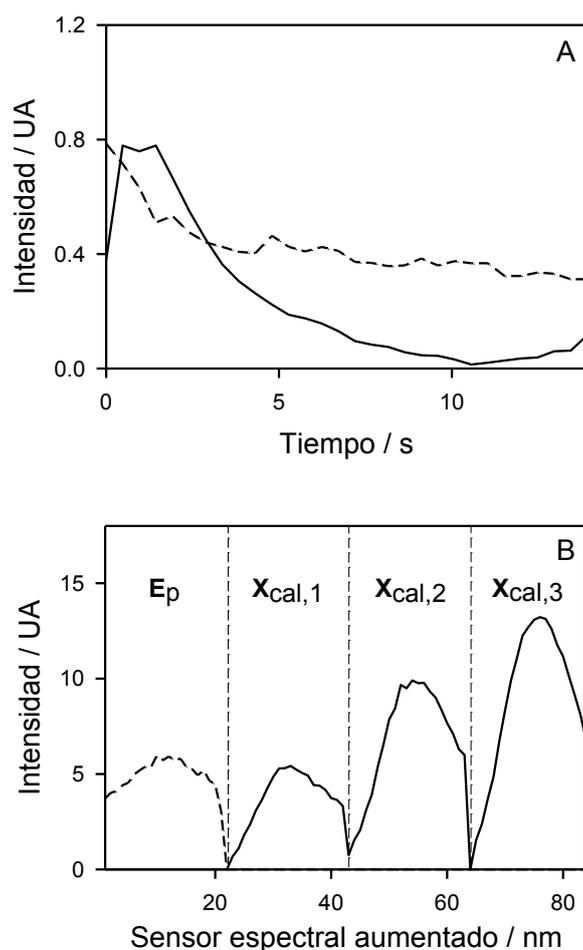


Figura 41. Perfiles recuperados por U-PLS/RBL-LD (versión MCR-ALS) durante el análisis de una muestra típica de orina que contiene ciprofloxacina. (A) Perfiles de tiempo de evolución de la señal quimioluminiscente. (B) Perfiles de emisión aumentados. En ambos casos, la línea sólida corresponde al analito y la línea de guión al interferente. Se indica la sub-matriz, E_p y las tres matrices de calibración virtual.

Cuando se aplicaron los restantes algoritmos, MCR-ALS, PARALIND y U-PLS/RBL-LD (versión PARALIND) a este sistema, la recuperación de los espectros y de los perfiles de tiempo fue cualitativamente similar a los obtenidos por PLS/RBL-LD en la versión MCR-ALS.

Los resultados de predicción se muestran en la Tabla 15. En general, los resultados sugieren que en este sistema experimental, el nuevo modelo U-PLS/RBL-LD utilizando la versión MCR-ALS proporciona las mejores cifras de mérito para un conjunto de 14 muestras de orinas, obteniendo un valor de RMSE de 10 mg L^{-1} , con un REP% asociado de 11%. Para el nuevo modelo U-PLS/RBL-LD se aplicó la prueba t de pares descrita anteriormente en la página 91.⁷³ Debido a que $t_{\text{exp}} = 1,7$ resultó ser menor que $t_{\text{crit}} = 2,16$ (con un 95% de nivel de confianza

y 13 grados de libertad), los valores predichos por U-PLS/RBL-LD no difieren estadísticamente de los valores nominales.

Tabla 15. Resultados de predicción para las muestras de orina que contienen ciprofloxacina usando diferentes modelos de segundo orden.

Orina	Nominal ^a	MCR-ALS	PARALIND	U-PLS/RBL-LD	
				MCR-ALS ^b	PARALIND ^b
A	100	108	112	100	88
A	0	24	32	18	24
B	150	166	145	151	112
B	50	53	90	67	68
C	80	81	84	77	65
C	120	109	103	127	93
D	140	164	150	139	136
D	30	55	79	48	49
E	180	190	11	178	195
E	90	121	121	101	101
F	130	99	82	117	76
F	40	65	61	50	47
G	40	74	57	46	51
G	110	167	151	104	129
	RMSE^c	26	53	10	23
	REP^d	29	59	11	26

^a Concentraciones en mg L⁻¹ referidos a las muestras originales de orina. Las concentraciones medidas en la cubeta son 10 veces menores. Las letras identifican a las diferentes orinas usadas.

^b Versión específica en la que el procedimiento RBL-LD es llevado a cabo.

^c RMSE = raíz cuadrada del error medio en mg L⁻¹.

^d REP% = error relativo de predicción en %.

A diferencia de lo obtenido con los datos simulados, en los cuales se logró un éxito similar tanto con MCR-ALS como U-PLS/RBL-LD utilizando la versión de MCR-ALS, en este sistema experimental los mejores resultados sólo se obtuvieron con el nuevo algoritmo U-PLS/RBL-LD en la versión de MCR-ALS, ya que con MCR-ALS y con U-PLS/RBL-LD en la versión de PARALIND se obtuvieron resultados ligeramente más pobres y al aplicar el algoritmo PARALIND se obtuvieron los peores resultados. Se puede decir que este sistema experimental representa un mayor desafío para los algoritmos de segundo orden debido a: 1) un mayor grado de solapamiento en la dimensión selectiva (en este caso la del tiempo) y 2) desviaciones de la bilinealidad debidas al corto tiempo requerido para medir el espectro durante la evolución temporal de la señal quimioluminiscente. La combinación de la flexibilidad de la calibración U-PLS con la configuración específica de MCR-ALS para la dependencia lineal adaptada al procedimiento RBL permite solucionar este tipo de problemas.

Determinación de ciprofloxacina en suero a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos

Este sistema ha sido previamente analizado empleando MCR-ALS (Tabla 12, página 117). En esta ocasión se compararán los resultados obtenidos anteriormente con los obtenidos al utilizar PARALIND y el nuevo modelo U-PLS/RBL-LD. Debemos recordar que este sistema también requirió de adición de patrón, por lo tanto U-PLS/RBL-LD también se aplicó en combinación con adición de patrón en modo 2.

A continuación se describen los resultados obtenidos con U-PLS/RBL-LD en la versión de MCR-ALS, la cual dio los mejores resultados al analizar los datos simulados. Se evaluó el número de variables latentes de calibración necesarias para el procedimiento U-PLS realizando la validación cruzada, la cual estableció que el número óptimo de componentes es 1. Durante el análisis de una muestra típica de suero que contiene ciprofloxacina y salicilato, se estimó el número de componentes RBL-LD, calculando los residuos finales s_u (Ecuación 24, página 66) para un número creciente de interferentes, el cual llevó a la conclusión de que s_u se estabiliza con un único componente de RBL-LD.

Los perfiles de excitación y tiempo de decaimiento (dimensión de aumentación) recuperados para ambos componentes, se muestran en la Figura 42A y B, respectivamente. Estos perfiles coinciden con los perfiles experimentales del analito y de la interferencia, los cuales se muestran en la Figura 34 (página 112). Además, como se puede observar en la Figura 42B, la contribución del analito y del interferente son claramente separadas, el agente interferente está presente únicamente en la matriz residual \mathbf{E}_p , mientras que el analito está presente en las matrices de calibración virtuales generadas por el modo 2. Por lo tanto, en términos de perfiles recuperados para este sistema espectroscópico, U-PLS/RBL-LD parece dar resultados tan satisfactorios como MCR-ALS. Esta capacidad de recuperar adecuadamente los perfiles del analito y del interferente es fundamental para lograr la ventaja de segundo orden, como se ha comentado anteriormente.

Sin embargo, más importantes son los resultados obtenidos en la predicción del analito en las muestras de suero analizadas, que se muestran en la Tabla 16. Como se puede observar, la capacidad predictiva del nuevo modelo es comparable a la de MCR-ALS, presentando un valor de RMSE similar ($0,4 \text{ mg L}^{-1}$) al de este último algoritmo. Este valor de RMSE se puede considerar como satisfactorio si tenemos en cuenta la complejidad de las muestras analizadas y la estructura de los datos, que presentan un desafío considerable a los diferentes algoritmos empleados. El REP% asociado al valor de RMSE obtenido es de 13%, calculado con respecto a la concentración nominal media del analito.

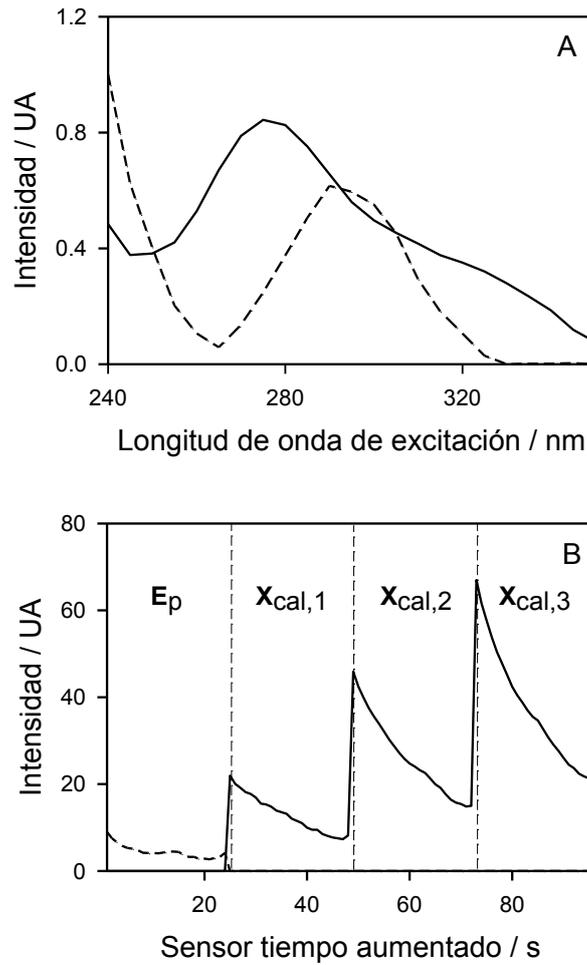


Figura 42. Perfiles recuperados por U-PLS/RBL-LD (versión MCR-ALS) durante el análisis de una muestra típica de suero que contiene ciprofloxacina y salicilato. (A) Perfiles de excitación. (B) Perfiles de tiempo de decaimiento aumentados. En ambos casos, la línea sólida corresponde al analito y la línea de gui3n al interferente. Se indica la sub-matriz, E_p y las tres matrices de calibración virtual.

Tabla 16. Resultados de predicción para las muestras de suero que contienen ciprofloxacina usando diferentes modelos de segundo orden.

Suero	Nominal ^a	MCR-ALS	PARALIND	U-PLS/RBL-LD	
				MCR-ALS ^b	PARALIND ^b
A	4.4	4.8	4.3	4.6	4.7
D	4.4	3.8	2.4	3.6	3.5
A	4.8	4.6	4.0	4.4	4.2
A	3.8	3.8	3.0	3.6	3.5
B	2.8	3.2	2.6	3.2	3.3
B	0.0	0.4	0.0	0.4	0.4
B	2.6	2.4	2.0	2.4	2.2
D	2.6	3.0	2.4	3.0	3.0
C	3.4	3.4	4.2	3.2	3.0
D	3.4	4.0	6.0	4.0	4.1
C	3.4	2.8	3.4	2.8	2.6
C	3.6	3.0	4.4	3.2	3.2
D	3.6	3.8	5.0	3.8	3.9
E	1.6	1.6	2.0	1.4	1.2
E	1.6	2.0	2.0	1.8	1.7
F	1.6	2.0	3.4	2.0	2.1
	RMSE^c	0.4	1.1	0.4	0.5
	REP^d	13	37	13	17

^a Concentraciones en mg L⁻¹ referidos a las muestras originales de suero. Las concentraciones medidas en la cubeta son 20 veces menores. Todas las muestras contienen salicilato en concentraciones entre 4,00 y 11,80 mg L⁻¹. Las letras identifican a los diferentes sueros usados.

^b Versión específica en la que el procedimiento RBL-LD es llevado a cabo.

^c RMSE = raíz cuadrada del error medio en mg L⁻¹.

^d REP% = error relativo de predicción en %.

El análisis de la exactitud del método puede realizarse mediante la prueba *t* de comparación de pares.⁷³ Debido a que $t_{exp} = 0,11$ resultó ser menor que $t_{crit} = 2,13$ (con un 95% de nivel de confianza y 15 grados de libertad), los valores

predichos por U-PLS/RBL-LD no difieren estadísticamente de los valores nominales.

En este sistema experimental, tanto MCR-ALS como U-PLS/RBL-LD en la versión de MCR-ALS lograron resultados similares a los obtenidos con los datos simulados previamente analizados. Mientras que con U-PLS/RBL-LD en la versión de PARALIND se obtuvieron resultados ligeramente más pobres y con PARALIND se obtuvieron los peores resultados. Es difícil predecir si se trata de un fenómeno general. Por lo tanto, serán necesarios nuevos trabajos para poder comprender en profundidad el comportamiento de estos algoritmos específicos en relación con los fenómenos recientemente analizados.

CONCLUSIONES

Como conclusión, podemos afirmar que se lograron alcanzar satisfactoriamente los objetivos propuestos en este trabajo de Tesis.

➤ Se logró desarrollar un método que permitió la determinación de ácido benzoico en presencia de la sacarina como potencial interferente empleando matrices de excitación-tiempo de decaimiento de luminiscencia sensibilizada de lantánidos conjuntamente con técnicas quimiométricas, lo cual permitió cuantificar adecuadamente al analito en un conjunto de muestras de validación y también en algunas de las muestras reales de jugos analizadas, donde el ácido benzoico es utilizado como conservante y la sacarina como edulcorante. Los resultados obtenidos demostraron que la combinación multidimensional de regresión en cuadrados mínimos parciales (PLS) y la bilinealización residual (RBL) es capaz de competir favorablemente con el análisis paralelo de factores (PARAFAC) en la obtención de la ventaja de segundo orden a partir de matrices de señales instrumentales.

➤ Se modelaron datos simulados y experimentales de segundo orden con solapamiento espectral extremo en una de las dimensiones entre el analito y el interferente. Los resultados obtenidos demostraron que la resolución multivariada de curvas acoplada a cuadrados mínimos alternantes (MCR-ALS) es el método adecuado para el procesamiento de este tipo de datos, y que en el caso de solapamiento espectral extremo, el aumento de las matrices en el modo de la dimensión con menor selectividad permite una adecuada descomposición de los datos, conduciendo de esta manera al aprovechamiento de la ventaja de segundo.

➤ Se desarrolló un método modificado de adición de patrón aplicado a datos de segundo orden, en el cual la matriz de datos de la muestra incógnita se sustrae digitalmente de las matrices obtenidas luego de la adición de patrón, y cuya cuantificación procede mediante una calibración externa clásica. Este método modificado permite la aplicación de algoritmos de segundo orden de variables latentes tales como PLS. El mismo se aplicó a sistemas de datos simulados y experimentales que se analizaron con los diferentes algoritmos quimiométricos de segundo orden, tales como PARAFAC y MCR-ALS, como así también PLS/RBL en sus dos versiones, la desdoblada (U-PL/RBL) y la multidimensional (N-PLS/RBL). Los resultados obtenidos indican que U-PLS/RBL y N-PLS/RBL pueden ser aplicados a datos de adición de patrón con el modo modificado o

modo 2. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con N-PLS/RBL, y son comparables a los obtenidos por los algoritmos clásicos como PARAFAC y MCR-ALS para datos de adición de patrón.

➤ A partir de los resultados obtenidos en los dos sistemas modelo anteriores (segundo y tercer sistema) se utilizó el nuevo método de adición de patrón en el análisis de sistemas que presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos. Para ello, se analizó un conjunto de datos simulados y luego sistemas experimentales en los cuales se determinaron tres antibióticos fluoroquinolónicos (ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina) en suero y en presencia del interferente salicilato, utilizando datos matriciales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos: matrices de excitación-tiempo de decaimiento de los correspondientes complejos con terbio (III). En estos sistemas experimentales, las señales de segundo orden del complejo analito-lantánido y del interferente-lantánido presentan perfiles de tiempo de decaimiento muy similares. Los resultados obtenidos demostraron que MCR-ALS puede implementarse exitosamente usando datos de adición de patrón modificada para sistemas con solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos.

➤ Se desarrolló un nuevo procedimiento de RBL modificado (RBL-LD) que incluye la dependencia lineal causada por el solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos. La nueva propuesta acoplada a U-PLS se aplicó con éxito a un sistema de datos simulados y a dos sistemas experimentales. Entre los sistemas experimentales evaluados se utilizó un nuevo tipo de datos, los cuales son descritos por primera vez en esta Tesis y están basados en señales quimioluminiscentes de segundo orden para la determinación de ciprofloxacina en muestras de orina en presencia de la interferencia producida por el fondo de la muestra de orina. El segundo sistema experimental fue el sistema previamente analizado que involucra la determinación del antibiótico ciprofloxacina en suero en presencia de salicilato como interferente a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos. Los resultados obtenidos con este nuevo modelo U-PLS/RBL-LD son comparables a los de MCR-ALS y a los de PARALIND, demostrando que el nuevo procedimiento de RBL-LD proporciona una buena interpretación analítica aprovechando la ventaja de segundo orden.

RESUMEN

En química analítica se pueden utilizar datos de diferentes estructuras dimensionales para realizar una calibración, es decir, datos puntuales o de orden cero, datos vectoriales o de orden uno y datos matriciales o de orden dos. Al emplear datos de orden dos, es posible obtener la denominada ventaja de segundo orden, que permite la cuantificación del analito en presencia de interferentes y que no han sido modelados en la etapa de calibración. Los algoritmos quimiométricos que presentan la ventaja de segundo orden, dependiendo de su fundamento, pueden clasificarse de la siguiente manera:

1) Modelos basados en un ajuste por cuadrados mínimos alternantes (ALS), como el análisis paralelo de factores (PARAFAC), algunas de sus variantes como PARAFAC2 (que permite variaciones de perfiles en una de las dimensiones entre muestra y muestra) y PARALIND (PARAFAC para sistemas con dependencia lineal), y la resolución multivariada de curvas acoplada a ALS (MCR-ALS).

2) Modelos basados en el uso de variables latentes para el calibrado, como la regresión en cuadrados mínimos parciales desdoblados (U-PLS), multi-vía (N-PLS), siempre y cuando sean combinados con la bilinealización residual (RBL) para proveerles la ventaja de segundo orden.

Cuando se procesan datos de segundo orden para un conjunto de muestras, es importante determinar si el arreglo tridimensional formado por dichos datos cumple o no con la llamada condición de trilinealidad. Una posible causa de desvío de la trilinealidad es el alto (o total) solapamiento de perfiles en una de las dimensiones. Cuando este solapamiento se presenta entre un analito calibrado y un interferente, los dos únicos algoritmos capaces de lograr la ventaja de segundo orden son MCR-ALS y PARALIND, mientras que PLS/RBL fallará, dado que la técnica RBL es incapaz de distinguir entre analito e interferente. Sin embargo, en esta Tesis se presenta un nuevo modelo U-PLS/RBL, en el que el procedimiento de RBL está modificado para incluir dependencia lineal (RBL-LD). Este reciente algoritmo ha demostrado ser capaz de resolver el problema del solapamiento total, con resultados analíticos similares a los logrados con MCR-ALS y PARALIND.

En primer lugar, se desarrolló un método para la determinación de ácido benzoico en muestras reales de jugos de frutas en presencia de una interferencia, la sacarina. Se emplearon matrices de excitación-tiempo de decaimiento de

luminiscencia sensibilizada de lantánidos, datos de segundo orden no utilizados hasta el momento, para obtener la ventaja de segundo orden aplicando técnicas quimiométricas, tales como PARAFAC y N-PLS/RBL. Para ello, las matrices de excitación-tiempo de decaimiento se midieron para un conjunto de calibración que contenía al analito, ácido benzoico, en un rango de concentraciones desde 0,00 hasta 5,00 mg L⁻¹, para un conjunto de validación que contenía al analito y a la interferencia, sacarina, en un rango de concentraciones desde 0,00 hasta 6,00 mg L⁻¹, y para muestras reales de jugos de frutas que contienen ácido benzoico y sacarina. Los resultados obtenidos indican una mejor habilidad de predicción con N-PLS/RBL que con PARAFAC, como puede verse al comparar las concentraciones predichas con las concentraciones nominales del analito en las muestras de validación, y con los resultados provistos por el método de referencia (HPLC) en las muestras reales.

En una segunda etapa se analizaron datos de segundo orden con solapamiento extremo en una de las dimensiones entre el analito y el interferente. A diferencia de otros algoritmos de calibración de segundo orden, MCR-ALS puede resolver convenientemente este problema analítico, empleando matrices aumentadas en el modo de la dimensión que presenta poca selectividad. Se analizaron un conjunto de datos simulados y también un sistema experimental que involucra la determinación de carbidopa en presencia de un potencial interferente, la levodopa. Ambos compuestos reaccionan con cerio (IV) para producir la especie fluorescente cerio (III), presentando diferentes cinéticas. Se midieron las matrices de emisión en función del tiempo para un conjunto de calibración que sólo contiene al analito de interés, en este caso la carbidopa en el rango 0,00-0,50 mg L⁻¹ y para un conjunto de validación que contienen a ambos componentes, el analito analizado y la potencial interferencia, levodopa, en el rango de 0,00-1,20 mg L⁻¹. Como los espectros de emisión producidos por ambos sistemas son idénticos, la cuantificación de carbidopa en las muestras de validación sólo fue posible usando MCR-ALS en el modo de aumentación espectral. Tanto en el sistema simulado como en el experimental, los resultados obtenidos indican una buena respuesta analítica, a pesar del gran solapamiento espectral y de la presencia de constituyentes inesperados en las muestras de prueba.

En presencia de interacciones entre el analito y el fondo de la muestra, y ante una señal de fondo significativa, se requiere tanto de la calibración multivariada de segundo orden como de adición de patrón para lograr la cuantificación del analito aprovechando la ventaja de segundo orden. La adición de patrón corrige las variaciones de señal producidas por interacción con el fondo de la matriz, y la calibración de segundo orden permite la cuantificación en presencia de interferentes. En esta Tesis se presenta un método modificado de adición de patrón de segundo orden, en el cual la matriz de datos de la muestra incógnita se sustrae digitalmente de las matrices obtenidas luego de la adición de patrón, y cuya cuantificación procede mediante una calibración externa clásica.

Con el fin de evaluar este nuevo método de adición de patrón, se analizaron sistemas que requieren adición de patrón con los diferentes algoritmos quimiométricos de segundo orden. Este nuevo modo de adición de patrón permitiría no sólo aplicar PARAFAC y MCR-ALS, sino también PLS/RBL en sus dos versiones. La comparación de los algoritmos de segundo orden se llevó a cabo empleando un conjunto de datos simulados y dos sistemas de datos experimentales. En los sistemas experimentales se determinó salicilato en suero en presencia de naproxeno y danofloxacina en suero en presencia de salicilato, empleando matrices de excitación-emisión de fluorescencia como datos de segundo orden. Los rangos de concentraciones finales para los analitos estudiados fue desde 0,00 hasta 0,60 mg L⁻¹ para el salicilato y desde 0,00 hasta 55,0 ng L⁻¹ para la danofloxacina. Estos rangos de concentraciones están dentro de los valores terapéuticos de las drogas estudiadas en suero. Tanto los datos simulados como los experimentales indican que U-PLS/RBL y N-PLS/RBL pueden ser aplicados para la calibración con adición de patrón. Sin embargo, los mejores resultados se obtuvieron con N-PLS/RBL, que son comparables a los obtenidos por los algoritmos clásicos como PARAFAC y MCR-ALS.

También se utilizó el nuevo método de adición de patrón para sistemas que presentan solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos. En primera instancia se analizó un conjunto de datos simulados y luego sistemas experimentales en los cuales se determinaron tres antibióticos fluoroquinolónicos (ciprofloxacina, norfloxacina y danofloxacina) en suero y en presencia del interferente salicilato. Para esto se procesaron datos matriciales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos: matrices de excitación-tiempo de decaimiento de los

correspondientes complejos con terbio (III). Los rangos de concentraciones finales para cada analito analizado fueron los siguientes: desde 0,00 hasta 0,24 mg L⁻¹ para la ciprofloxacina, desde 0,00 hasta 0,20 mg L⁻¹ para la norfloxacina y para la danofloxacina, y del potencial interferente, salicilato, desde 4,00 hasta 12,00 mg L⁻¹. En estos sistemas experimentales, las señales de segundo orden del complejo analito-lantánido y del interferente-lantánido presentan perfiles de tiempo de decaimiento muy similares. Por lo tanto, MCR-ALS es una de las pocas metodologías que permite aprovechar la ventaja de segundo orden, ya que permite romper la colinealidad en una de las dimensiones de los datos recurriendo a la matriz aumentada, haciendo posible la cuantificación del analito en presencia de interferentes, cuando los perfiles en uno de los modos están fuertemente solapados. Tanto los datos simulados como los experimentales demostraron que MCR-ALS puede implementarse exitosamente usando datos de adición de patrón en modo 2 o modificado para sistemas con solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos.

Finalmente, se desarrolló un nuevo procedimiento de RBL-LD, que incluye la dependencia lineal causada por el solapamiento extremo en una de las dimensiones de los datos, el cual se implementó acoplado a U-PLS. La nueva propuesta se aplicó exitosamente a un sistema de datos simulados y a dos sistemas experimentales. El primer sistema experimental analizado corresponde a datos matriciales quimioluminiscentes de segundo orden para la determinación de ciprofloxacina en muestras de orina en presencia de la interferencia producida por el fondo de la muestra de orina. Estos datos están basados en la reacción de quimioluminiscencia del analito con tris (2,2'-bipiridil) dicloro-rutenio (II) y cerio (IV) en medio ácido y no han sido descritos hasta el momento. Los cuales comprenden como primera dimensión la señal del tiempo de evolución de quimioluminiscencia del complejo de rutenio y como segunda dimensión el espectro de emisión quimioluminiscente del rutenio, que es común a todos los constituyentes, y además requirieron de adición de patrón. El rango de concentración estudiado del analito está dentro de los valores terapéuticos de dicha droga en orina humana (0,00-180 mg L⁻¹). El segundo sistema experimental evaluado involucra la determinación del antibiótico ciprofloxacina en suero en presencia de salicilato como interferente a partir de señales de luminiscencia sensibilizada de lantánidos. Este sistema experimental requiere de adición de

patrón y ha sido previamente analizado empleando MCR-ALS. En esta ocasión se compararon los resultados obtenidos anteriormente con los obtenidos al utilizar PARALIND y el nuevo modelo U-PLS/RBL-LD. Los resultados obtenidos con este nuevo modelo U-PLS/RBL-LD son comparables a los de MCR-ALS y a los de PARALIND. Tanto el sistema simulado como los dos sistemas experimentales demostraron que el nuevo procedimiento de RBL-LD proporciona una buena interpretación analítica aprovechando la ventaja de segundo orden.

BIBLIOGRAFÍA

-
- [1] Booksh K. S., Kowalski B. R. (1994) Theory of analytical chemistry. *Anal. Chem.* 66, 782A-791A.
- [2] Olivieri A. C. (2008) Analytical advantages of multivariate data processing. One, two, three, infinity. *Anal. Chem.* 80, 5713-5720.
- [3] Escandar G. M., Faber N. M., Goicoechea H. C., Muñoz de la Peña A., Olivieri A. C., Poppi R. J. (2007) Second and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications. *Trends Anal. Chem.* 26, 752-765.
- [4] Bro R. (2006) Review on multiway analysis in chemistry - 2000-2005. *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36, 279-293.
- [5] Bro R. (1997) PARAFAC: tutorial & applications. *Chemom.Intell. Lab. Syst.* 38, 149-171.
- [6] Kiers H.A., Ten Berge J.M., Bro R. (1999) PARAFAC2 - Part I. A direct fitting algorithm for the PARAFAC2 model. *J. Chemometrics* 13, 275-294.
- [7] Bahram M., Bro R. (2007) A novel strategy for solving matrix effect in three-way data using parallel profiles with linear dependencies. *Anal. Chim. Acta* 584, 397-402.
- [8] Wu H.L., Shibukawa M., Oguma K. (1998) An alternating trilinear decomposition algorithm with application to calibration of HPLC-DAD for simultaneous determination of overlapped chlorinated aromatic hydrocarbons. *J. Chemometrics* 12, 1-26.
- [9] Chen Z.P., Wu H.L., Jiang J.H., Li Y., Yu R.Q. (2000) A novel trilinear decomposition algorithm for second-order linear calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 52, 75-86.
- [10] Xia A.L., Wu H.L., Fang D.M., Ding Y.J., Hu L.Q., Yu R.Q. (2005) Alternating penalty trilinear decomposition algorithm for second-order calibration with

- application to interference-free analysis of excitation-emission matrix fluorescence data. *J. Chemometrics* 19, 65-76.
- [11] Tauler R. (1995) Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 30, 133-146.
- [12] Linder M., Sundberg R. (1998) Second order calibration: bilinear least squares regression and a simple alternative. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 42, 159-178.
- [13] Linder M., Sundberg R. (2002) Precision of prediction in second-order calibration, with focus on bilinear regression methods. *J. Chemometrics* 16, 12-27.
- [14] Goicoechea H.C., Olivieri A.C. (2005) New robust bilinear least squares method for the analysis of spectral-pH matrix data. *Appl. Spectrosc.* 59, 926-933.
- [15] Sanchez E., Kowalski B. R. (1986) Generalized rank annihilation factor analysis. *Anal. Chem.* 58, 496-499.
- [16] Sanchez E., Kowalski B. R. (1990) Tensorial resolution: a direct trilinear decomposition. *J. Chemometrics* 4, 29-45.
- [17] Wold S., Geladi P., Esbensen K., Øhman J. (1987) Multi-way principal components- and PLA-analysis. *J. Chemometrics* 1, 41-56.
- [18] Bro R. (1996) Multi-way calibration. Multi-linear PLS. *J. Chemometrics* 10, 47-61.
- [19] Czekaj T., Wu W., Walczak B. (2005) About kernel latent variable approaches and SVM. *J. Chemometrics* 19, 341-354.
- [20] Haykin S. (1999) *Neural networks. A comprehensive foundation*. Prentice-hall, upper Saddle River, NJ, Estados Unidos. 2ª Edición.
- [21] Öhman J., Geladi P., Wold S. (1990) Residual bilinearization. Part 1: theory and algorithms. *J. Chemometrics* 4, 79-90.

- [22] Olivieri A. C. (2005) On a versatile second-order multivariate calibration method based on partial least-squares and residual bilinearization: Second-order advantage and precision properties. *J. Chemometrics* 19, 253-265.
- [23] Culzoni M. J., Goicoechea H. C, Pagani A. P., Cabezón M. A., Olivieri A. C. (2006) Evaluation of partial least-squares with second-order advantage for the multi-way spectroscopic analysis of complex biological samples in the presence of analyte-background interactions. *Analyst* 131, 718-723.
- [24] García-Reiriz A., Damiani P.C., Culzoni M.J., Goicoechea H.C., Olivieri A.C. (2008) A versatile strategy for achieving the second-order advantage when applying different artificial neural networks to non-linear second-order data: unfolded principal component analysis/residual bilinearization. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 92, 61-70.
- [25] García-Reiriz A., Damiani P.C., Olivieri A.C. (2010) Residual bilinearization combined with kernel-unfolded partial least-squares: a new technique for processing non-linear second-order data achieving the second-order advantage. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 100, 127-135.
- [26] García-Reiriz A., Damiani P.C., Olivieri A.C., Cañada-Cañada F., Muñoz de la Peña A. (2008) Non-linear four-way kinetic-excitation-emission fluorescence data processed by a variant of parallel factor analysis and by a neural network model achieving the second-order advantage: malonaldehyde determination in olive oil samples. *Anal. Chem.* 80, 7248-7256.
- [27] Zampronio C.G., Gurden S.P., Moraes L.A., Eberlin M.N., Smilde A.K., Poppi R.J. (2002) Direct sampling tandem mass spectrometry (MS/MS) and multiway calibration for isomer quantitation. *Analyst* 127, 1054-1060.
- [28] Bortolato S.A., Arancibia J.A., Escandar G.M. (2009) Non-trilinear chromatographic time retention-fluorescence emission data coupled to chemometric algorithms for the simultaneous determination of 10 polycyclic aromatic hydrocarbons in the presence of interferences. *Anal. Chem.* 81, 8074-8084.

- [29] Bortolato S.A., Arancibia J.A., Escandar G.M., Olivieri A.C. (2010) Time-alignment of bidimensional chromatograms in the presence of uncalibrated interferences using parallel factor analysis: application to multi-component determinations using liquid-chromatography with spectrofluorimetric detection. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 101, 30-37.
- [30] Bohoyo Gil D., Muñoz de la Peña A., Arancibia J.A., Escandar G.M., Olivieri A.C. (2006) Second-order advantage achieved by unfolded-partial least-squares/residual bilinearization modelling of excitation-emission fluorescence data presenting inner filter effects. *Anal. Chem.* 76, 8051-8058.
- [31] García-Reiriz A.G., Damiani P.C., Olivieri A.C. (2007) Different strategies for the direct determination of amoxicillin in human urine by second-order multivariate analysis of kinetic-spectrophotometric data. *Talanta* 71, 806-815.
- [32] Borraccetti M.D., Damiani P.C., Olivieri A.C. (2009) When unfolding is better: unique success of unfolded partial least-squares regression with residual bilinearization for the processing of spectral-pH data with strong spectral overlapping. Analysis of fluoroquinolones in human urine based on flow-injection pH-modulated synchronous fluorescence data matrices. *Analyst* 134, 1682-1691.
- [33] Castells R.C., Castillo M.A. (2000) Systematic errors: detection and correction by means of standard calibration, Youden calibration and standard additions method in conjunction with a method response model. *Anal. Chim. Acta* 423, 179-185.
- [34] Youden W.J. (1947) Technique for testing accuracy of analytical data. *Anal. Chem.* 19, 946-950.
- [35] Saxberg B.E.H., Kowalski B.R. (1979) Generalized standard addition method. *Anal. Chem.* 51, 1031-1038.
- [36] Kalivas J.H., Kowalski B.R. (1981) Generalized standard addition method for multicomponent instrument characterization and elimination of interferences in inductively coupled plasma spectroscopy. *Anal. Chem.* 53, 2207-2212.

- [37] Sena N.M., Trevisan M.G., Poppi R.J. (2005) PARAFAC: a chemometric tool for multi-dimensional data treatment. Applications in direct determination of drugs in human plasma by spectrofluorimetry. *Quim. Nova* 28, 910–920.
- [38] Arancibia J.A., Olivieri A.C., Escandar G.M. (2002) First and second order multivariate calibration applied to biological samples: determination of anti-inflammatories in serum and urine. *Anal. Bioanal. Chem.* 374, 451–459.
- [39] Gómez V., Cuadros R., Ruisánchez I., Callao M.P. (2007) Matrix effect in second-order data: determination of dyes in a tanning process using vegetable tanning agents. *Anal. Chim. Acta* 600, 233–239.
- [40] de Juan A., Casassas E., Tauler R. (2002) *Encyclopedia of analytical chemistry*. R.A. Myers (Ed.), Wiley, Chichester. Vol. 11, 9800–9837.
- [41] Bahram M., Mabhooti M. (2009) Rank annihilation factor analysis for multicomponent kinetic-spectrophotometric determination using difference spectra. *J. Chemom.* 23, 236–247.
- [42] Abdollahi H., Sajjadi S.M. (2009) Evaluation of variation matrix arrays by parallel factor analysis. *J. Chemom.* 23, 139–148.
- [43] Arancibia J.A., Boschetti C.E., Olivieri A.C., Escandar G.M. (2008) Screening of oil samples on the basis of excitation-emission room-temperature phosphorescence data and multi-way chemometric techniques. Introducing the second-order advantage in a classification study. *Anal. Chem.* 80, 2789–2798.
- [44] Damiani P.C., Durán-Merás I., García-Reiriz A., Jiménez-Girón A., Muñoz de la Peña A., Olivieri A.C. (2007) Multi-way partial-least-squares coupled to residual trilinearization: a genuine multi-dimensional tool for third-order data. Simultaneous analysis of procaine and its metabolite p-amino benzoic acid in equine serum. *Anal. Chem.* 79, 6949–6958.
- [45] Skoog D.A., Leary J.J. (1993) *Análisis instrumental*. Ed. McGraw Hill, Madrid, España. 4ª Edición.

- [46] Gómez-Hens A., Aguilar-Caballeros M.P. (2002) Terbium-sensitized luminescence: a selective and versatile analytical approach. *Trends. Anal. Chem.* 21, 131-141.
- [47] Harris D.C., Bertolucci M.D. (1978) *Symmetry and spectroscopy*. Ed. Dover Publications, New York, USA.
- [48] Fifield F.W., Kealey D. (1995) *Principles and practice of analytical chemistry*. Ed. Blackie Academic and Professional, London, England. 4^a Edición.
- [49] Hurtubise R.J. (1997) Solid-matrix luminescence analysis: photophysics, physicochemical interactions and applications. *Anal. Chim. Acta* 351, 1-22.
- [50] García-Campaña A., Baeyens W., Zhang X., Alés F., Gámiz L. (2001) Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. *Ars Pharmaceutica* 42, 81-107.
- [51] Campbell. (1988) *Chemiluminescence. Principles and applications in biology and medicine*. Chichester: Ellis Horwood/VCH.
- [52] Guilbault G. (1990) *Practical fluorescence*. Marcel Dekker, New York. Chapter 10.
- [53] Abbott R., Townshend A. (1986) The chemiluminescence determination of drugs. *Anal. Proc.* 23, 25-26.
- [54] Calokerinos A., Deftereos N., Baeyens W. (1995) Chemiluminescence in drug assay. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 1063-1071.
- [55] Dibella E., Weisman J., Joseph M., Schultz J., Wenzel T. (1985) Lanthanide ions as luminescent chromophores for liquid chromatographic detection. *J. Chromatogr.* 328, 101-109.
- [56] Rieutord A., Prognon P., Brion F., Mahuzier G. (1997) Liquid chromatographic determination using lanthanides as time-resolved luminescence probes for drugs and xenobiotics: advantages and limitations. *Analyst* 122, 59R-66R.

- [57] Georges J. (1993) Lanthanide-sensitized luminescence and applications to the determination of organic analytes. A review. *Analyst* 118, 1481-1486.
- [58] Ocaña J.A., Barragán F.J., Callejón M. (2004) Fluorescence and terbium-sensitised luminescence determination of garenoxacin in human urine and serum. *Talanta* 63, 691-697.
- [59] Rodríguez-Díaz R.C., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. (2004) Sensitive determination of fluoroquinolone antibiotics in milk samples using time-resolved methodology. *Anal. Lett.* 37, 1163-1175.
- [60] Alava-Moreno F., Liu Y.M., Díaz-García M.E., Sanz-Mendel A. (1993) Kalman filtering-aided time-resolved solid-surface room temperature phosphorimetry for simultaneous determination of tetracyclines in solution. *Mikrochim. Acta* 112, 47-54.
- [61] Rodríguez-Díaz R.C., Aguilar-Caballos M.P., Gómez-Hens A. (2003) Simultaneous determination of ciprofloxacin and tetracycline in biological fluids based on dual-lanthanide sensitised luminescence using dry reagent chemical technology. *Anal. Chim. Acta* 494, 55-62.
- [62] Izquierdo P., Gómez-Hens A., Pérez-Bendito D. (1994) Study of the Eu(III)-tetracycline-thenoyltrifluoroacetone system by using the stopped-flow mixing technique: determination of tetracycline in serum. *Anal. Chim. Acta* 292, 133-139.
- [63] Hirschy L.M., Dose E. V., Winefordner J.D. (1983) Lanthanide-sensitized luminescence for the detection of tetracyclines. *Anal. Chim. Acta* 147, 311-316.
- [64] Georges J., Ghazarian S. (1993) Study of europium-sensitized fluorescence of tetracycline in a micellar solution of Triton X-100 by fluorescence and thermal lens spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 276, 401-409.
- [65] Arnaud N., Georges J. (2001) Sensitive detection of tetracyclines using europium-sensitized fluorescence with EDTA as co-ligand and cetyltrimethylammonium chloride as surfactant. *Analyst* 126, 694-697.

- [66] Mahedero M.C., Bohoyo D., Salinas F., Ardila T., Airado D., Roldán B. (2005) Improvements in europium sensitized fluorimetric determination of demeclocycline and methacycline. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 37, 1101-1104.
- [67] Brunton L.L. (2006) Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. McGraw-Hill Inc., New York. 11th Edition.
- [68] Morales-Muñoz S., Luque-García J.L., Luque de Castro M.D. (2004) Continuous microwave-assisted extraction coupled with derivatization and fluorimetric monitoring for the determination of fluoroquinolone antibacterial agents from soil samples. *J. Chromatogr. A.* 1059, 25-31.
- [69] Cañada-Cañada F., Espinosa-Mansilla A., Muñoz de la Peña A. (2007) Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine. *J. Sep. Sci.* 30, 1242-1249.
- [70] Gerardia R., Barnetta N., Jones P. (1999) Two chemical approaches for the production of stable solutions of tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium(III) for analytical chemiluminescence. *Anal. Chim. Acta* 388, 1-10.
- [71] Aguilar-Caballeros M., Gómez-Hens A., Pérez-Bendito D. (1999) Simultaneous determination of benzoic acid and saccharin in soft drinks by using lanthanide-sensitized luminescence. *Analyst* 124, 1079-1084.
- [72] Pylypiw H.M., Grether M.T. (2000) Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *J. Chromatogr. A.* 883, 299-304.
- [73] Miller J.N., Miller J.C. (2005) Statistics and chemometrics for analytical chemistry. Pearson-Prentice Hall, New York. Chapter 2.
- [74] Pagani A., Cabezón M.A., Ibañez G. (2009) Simultaneous kinetic-spectrofluorometric determination of levodopa and carbidopa using partial least-squares regression. *Anal. Sci.* 25, 633-638.

- [75] Messick N.J., Kalivas J.H., Lang P.M. (1996) Selectivity and related measures for nth-order data. *Anal. Chem.* 68, 1572–1579.
- [76] Olivieri A.C., Faber N.M., Brown S., Tauler R., Walczak B. (2009) *Comprehensive chemometrics*. Elsevier, Amsterdam. Vol. 3, 91–106.
- [77] Murillo J. A., Alañón Molina A., Muñoz de la Peña A., Durán Merás I., Jiménez Girón A. (2007) Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine. *J. Fluoresc.* 17, 481-491.
- [78] Leurgans S., Ross R.T. (1992) Multilinear models: applications in spectroscopy. *Statist. Sci.* 7, 289-319.
- [79] Paatero P. (1997) A weighted non-negative least squares algorithm for three-way 'PARAFAC' factor analysis. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38, 223-242.
- [80] Bro R. (1998) Multi-way analysis in the food industry. Doctoral thesis, University of Amsterdam, Netherlands.
- [81] Bro R., Kiers H.A. (2003) A new efficient method for determining the number of components in PARAFAC models. *J. Chemometrics* 17, 274-286.
- [82] Haaland D.M., Thomas E.V. (1988) Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information. *Anal. Chem.* 60, 1193-1202.
- [83] Windig W., Guilment J. (1991) Interactive self-modeling mixture analysis. *Anal. Chem.* 63, 1425-1432.
- [84] Windig W., Stephenson D.A. (1992) Self-modeling mixture analysis of second-derivative near infrared spectral data using the SIMPLISMA approach. *Anal. Chem.* 64, 2735-2742.

- [85] Windig W., Heckler C.E., Agblevor F.A., Evans R.J. (1992) Self-modeling mixture analysis of categorized pyrolysis mass spectral data with the SIMPLISMA approach. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 14, 195-206.
- [86] Maeder M. (1987) Evolving factor analysis for the resolution of overlapping chromatographic peaks. *Anal. Chem.* 59, 527-530.
- [87] Tauler R., Smilde A., Kowalski B.R. (1995) Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *J. Chemometrics* 9, 31-58.
- [88] Bortolato S., Arancibia J.A., Escandar G.M. (2008) Chemometrics-assisted excitation-emission fluorescence spectroscopy on nylon membranes. simultaneous determination of benzo[a]pyrene and dibenz[a,h]anthracene at parts-per-trillion levels in the presence of the remaining EPA PAH priority pollutants as interferences. *Anal. Chem.* 80, 8276-8286.
- [89] MATLAB 7.0. (2007) The mathworks. Natick, Massachusetts, USA.
- [90] Olivieri A.C., Yu R.Q., Wu H.L. (2009) MVC2: a MATLAB graphical interface toolbox for second-order multivariate calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 96, 246-251.
- [91] Olivieri A.C., Goicoechea H.C., Iñón F.A. (2004) MVC1: an integrated MATLAB toolbox for first-order multivariate calibration. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 73, 189-197.
- [92] Jaumot J., Gargallo R., de Juan A., Tauler R. (2005) A graphical user-friendly interface for MCR-ALS: a new tool for multivariate curve resolution in MATLAB. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 76, 101-110.
- [93] Arnaud N., Georges J. (2003) Investigation of the luminescent properties of terbium anthranilate complexes and application to the determination of anthranilic acid derivatives in aqueous solutions. *Anal. Chim. Acta* 476, 149-157.

- [94] Wang Y., Feng L., Jiang C. (2005) Fluorimetric study of the interaction between human serum albumin and quinolones-terbium complex and its application. *Spectrochim. Acta A.* 61, 2909-2914.
- [95] Arnaud N., Georges J. (1999) Improved detection of salicylic acids using terbium sensitized luminescence in aqueous micellar solutions of cetyltrimethylammonium chloride. *Analyst* 124, 1075-1078.
- [96] Panadero S., Gómez-Hens A., Pérez-Bendito D. (1996) Kinetic determination of salicylic acid, diflunisal and their mixture based on lanthanide-sensitized luminescence. *Anal. Chim. Acta* 329, 135-141.
- [97] Rinnan Å., Riu J., Bro R. (2007) Multi-way prediction in the presence of uncalibrated interferents. *J. Chemometrics* 21, 76-86.
- [98] Peré-Trepat E., Lacorte S., Tauler R. (2007) Alternative calibration approaches for lc-ms quantitative determination of coeluted compounds in complex environmental mixtures using multivariate curve resolution. *Anal. Chim. Acta* 595, 228-237.
- [99] Saurina J., Hernández-Cassou S., Tauler R., Izquierdo-Ridorsa A. (1998) Multivariate resolution of rank-deficient kinetic spectrophotometric data from firstorder kinetic decomposition reactions. *J. Chemometrics* 12, 183-203.
- [100] Izquierdo-Ridorsa A., Saurina J., Hernández-Cassou S., Tauler R. (1997) Second-order multivariate curve resolution applied to rank-deficient data obtained from acid-base spectrophotometric titrations of mixtures of nucleic bases. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 38, 183-196.
- [101] Brereton R.G. (2003) *Chemometrics. Data analysis for the laboratory and chemical plant.* Wiley, Chichester, UK.
- [102] Sun H.W., Li L.Q., Chen X.Y., Shi H.M., Lü Y.K. Can, J. (2006) Determination of norfloxacin by flow injection analysis with chemiluminescence detection. *Anal. Sci. Spectrosc.* 51, 100-107.

- [103] Li Y., Lu J. (2006) Flow injection chemiluminescence determination of naproxen based on $\text{KMnO}_4\text{-Na}_2\text{SO}_3$ reaction in neutral aqueous medium. *Anal. Chim. Acta* 577, 107-110.
- [104] Zhuoyong Z., Xia L., Xiaoli W., Shilu C., Baohua S., Huichun Z. (2006) Determination of ciprofloxacin by flow injection analysis based on chemiluminescence system. *J. Rare Earth*. 24, 285-288.
- [105] Francis P.S., Adcock J.L. (2005) Chemiluminescence methods for the determination of ofloxacin. *Anal. Chim. Acta* 541, 3-12.
- [106] Greenway G.M., Dolman S.J.L. (1999) Analysis of tricyclic antidepressants using electrogenerated chemiluminescence. *Analyst* 124, 759-762.