



UNIVERSIDAD DE JAÉN

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

TESIS DOCTORAL

**SENSORES EN FLUJO CONTINUO CON
DETECCIÓN LUMINISCENTE EN FASE
SÓLIDA. IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS
ESTRATEGIAS**

**PRESENTADA POR:
EULOGIO JOSÉ LLORENT MARTÍNEZ**

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

JAÉN, 16 DE SEPTIEMBRE DE 2008

ISBN 978-84-8439-431-0

Nombre y apellidos del autor:

EULOGIO JOSÉ LLORENT MARTÍNEZ

Título de la Tesis Doctoral:

SENSORES EN FLUJO CONTINUO CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN FASE SÓLIDA.
IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS

I.S.B.N.:

978-84-8439-431-0

Fecha de Lectura:

16 DE SEPTIEMBRE DE 2008

Centro y Departamento en que fue realizada la lectura:

FACULTAD DE CIENCIAS EXPERIMENTALES
Departamento de Química Física y Analítica

Composición del Tribunal/Dirección de la Tesis:

Dirección de la Tesis	Dr. D. Antonio Molina Díaz Dra. Dña. Pilar Ortega Barrales
Presidente/a del Tribunal	Dr. D. Alfredo Sanz Medel
Vocales	Dr. D. Petr Solich Dra. Dña. Teresa Galeano Díaz Dr. D. Ramiro Avidad Castañeda
Secretario/a	Dra. Dña. Ana Domínguez Vidal

Calificación Obtenida:

SOBRESALIENTE CUM LAUDE



UNIVERSIDAD DE JAÉN

tesis doctoral

Resumen

En esta Memoria se describe el desarrollo de once optosensores en flujo continuo, en los que se emplea el análisis por inyección en flujo (FIA), el análisis por inyección secuencial (SIA) y la multiconmutación. Todos ellos se han realizado empleando detección luminiscente: Fluorescencia, tanto nativa como obtenida tras reacción derivatizadora; luminiscencia sensibilizada por lantánido y quimioluminiscencia. Se ha evaluado el potencial de estos optosensores para el análisis de compuestos de interés en diferentes campos de aplicación: Farmacéutico, medioambiental y alimentario.

Los optosensores luminiscentes descritos en este trabajo de investigación han sido aplicados a la determinación de:

1. Residuos de pesticidas (carbofurano, benomino, carbendazima, ortofenilfenol y fuberidazol) en aguas superficiales.
2. Residuos de fungicidas (bitertanol) en frutas (bananas).
3. Principios activos de fármacos (norfloxacino, ácido pipemídico, riboflavina, piridoxina, ácido ascórbico, furosemida, triamtereno, ácido salicílico, paracetamol, labetalol) en productos farmacéuticos y fluidos biológicos (orina y suero).

La principal característica de los métodos desarrollados es, además de la rapidez, la sencillez y el bajo coste, la posibilidad de determinar uno o varios analitos de forma selectiva y sensible en una gran variedad de muestras. Las características anteriormente descritas hacen especialmente adecuado su uso en el análisis de rutina y control de calidad, como por ejemplo en los ensayos de contenido de principios activos en productos farmacéuticos y métodos de "screening" para determinar pesticidas en alimentos.

Según el sistema de introducción de muestra y reactivos, el número de analitos o la técnica de detección empleada podrían realizarse diferentes clasificaciones de los métodos descritos en esta Memoria. Una primera clasificación en función del sistema de flujo empleado sería:

- FIA convencional (válvulas rotatorias de seis vías): dos optosensores.
- Multiconmutación (válvulas solenoide de tres vías): cinco optosensores.
- SIA: cuatro optosensores.

El empleo de la multiconmutación o del análisis por inyección secuencial proporciona un mayor grado de automatización, aportando otras ventajas adicionales frente a los sistemas de análisis por inyección en flujo convencionales.

En el caso de la multiconmutación se han usado válvulas solenoides de tres vías. De esta manera, es posible automatizar las distintas etapas de los análisis usando un programa de ordenador adecuado que permite controlar de forma sencilla la apertura o cierre de las válvulas en el momento necesario y durante el tiempo preciso. En el caso del SIA también es posible automatizar completamente el sistema de flujo mediante el *software* apropiado. En todos los sistemas desarrollados empleando esta metodología se consigue un gran ahorro en consumo de muestra y reactivos, así como un menor volumen de residuos generados cuando se compara con el FIA convencional.

El FIA convencional se ha empleado para el desarrollo del sensor monoparámetro para la determinación de norfloxacin y para el sensor triparámetro para los pesticidas carbendazima, carbofurano y benomilo. El SIA ha sido utilizado para el desarrollo de dos sensores fluorescentes, los descritos para la determinación de paracetamol y labetalol, un sensor con detección luminiscente sensibilizada por terbio para determinar ácido salicílico, y un doble sensor luminiscente empleando tanto fluorescencia nativa como quimioluminiscencia para determinación de mezclas de vitaminas. En todos los demás casos se han desarrollado sensores multiconmutados.

En función del número de analitos que permite analizar cada sensor, se puede distinguir entre sistemas "monoparamétricos" (optosensores monoparámetro), que permiten el análisis de un solo analito y sistemas "multiparamétricos" (optosensores multiparámetro), que permiten el análisis simultáneo, mediante

una sola inserción, de varios compuestos en una muestra. En esta Memoria se han desarrollado siete optosensores monoparámetro y cuatro optosensores multiparámetro.

Para llevar a cabo el desarrollo de los optosensores multiparámetro, se emplearon dos estrategias para permitir la separación previa a la llegada a la zona de detección de los compuestos estudiados en cada caso.

Una de ellas estaba basada en el uso de una "precolumna", empaquetada con el mismo soporte sólido empleado en la zona sensora (célula de flujo), que retiene temporalmente los analitos, permitiendo la discriminación y separación de los mismos en base a la diferente interacción de cada analito con el soporte sólido de la precolumna. Esto permite la separación y llegada secuencial de los analitos a la zona de detección y su posterior medida. Con este dispositivo se ha desarrollado el sensor triparámetro para la determinación de benomilo, carbendazima y carbofurano, así como el sensor biparámetro para determinar ortofenilfenol y fuberidazol. Con una sola inserción de muestra, se analizan todos los compuestos de interés, aunque la detección de cada analito esté secuenciada en el tiempo.

La otra estrategia desarrollada en esta memoria es el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido para realizar la separación de las especies de interés. El fundamento es el mismo que en la anterior, ya que se efectúa la separación de los analitos debido a la diferencia de comportamiento de éstos al interaccionar con el soporte sólido empleado, pero esta vez ocurre en la misma célula de flujo, justo por encima del área de detección. Para poder efectuar esta separación con una cantidad adicional de soporte sólido en la célula de flujo es necesario que la polaridad de los analitos a separar sea muy diferente. Mediante el empleo de esta estrategia se ha desarrollado el sensor biparámetro para la determinación fluorescente de furosemida y triamtereno; también se ha empleado para la separación de riboflavina y piridoxina en el sensor multiparámetro para determinación de vitaminas.

Por último, podría realizarse una clasificación de los sensores desarrollados basada en la técnica de detección utilizada. De esta forma podría distinguirse entre el uso de fluorescencia nativa (orto-fenilfenol, fuberidazol, carbendazima, benomilo, carbofurano, bitertanol, furosemida, triamtereno, riboflavina, piridoxina, labetolol), fluorescencia obtenida tras reacción química (paracetamol), luminiscencia sensibilizada por lantánido (norfloxacin, ácido pipemídico, ácido salicílico) y quimioluminiscencia (ácido salicílico, ácido ascórbico).

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

De los resultados obtenidos se puede concluir que el acoplamiento de la espectroscopía en fase sólida con sistemas de flujo es de una gran utilidad para la resolución de un gran número de problemas analíticos en campos muy diversos, como son los siguientes abordados en la presente memoria:

- Control Ambiental (análisis de pesticidas en aguas superficiales)
- Control Alimentario (análisis de residuos de fungicidas post-cosecha en frutas)
- Control Farmacéutico (análisis de rutina de principios activos en fármacos)
- Análisis Clínico (análisis de principios activos en fluidos biológicos)

El empleo de este tipo de métodos analíticos es especialmente recomendable y ventajoso en el caso de muestras sencillas y análisis de rutina, como por ejemplo el ensayo de contenido de principios activos en productos farmacéuticos; aunque como se ha demostrado en esta Memoria, también sirven para abordar problemas analíticos más complejos, como puede ser el análisis de residuos de plaguicidas en alimentos. Se ha desarrollado un método con esta función (análisis de bitertanol en plátanos); este método cumple la normativa europea en cuanto a límite máximo de residuos (LMRs), ya que permite detectar niveles de concentración más bajos que el establecido como máximo en esta normativa. Por otra parte, también hay que subrayar que el empleo de sistemas de flujo con multiconmutación o SIA proporciona ventajas evidentes con respecto a sistema FIA convencionales, permitiendo aumentar la aplicabilidad y versatilidad de los optosensores en flujo.

Abstract

In the present Research Report, the development of eleven flow-through luminescent optosensors is described, making use of flow injection analysis (FIA), sequential injection analysis (SIA) and multicommutation. Fluorescence, lanthanide-sensitized luminescence and chemiluminescence have been employed as detection techniques and applied to the analysis in several research fields: Pharmaceutical, Environmental and Alimentary.

The luminescent optosensors have been applied to the determination of:

- Pesticides residues (carbofuran, benomyl, carbendazim, o-phenylphenol and fuberidazol) in environmental waters.
- Residues of the fungicide bitertanol in fruits (bananas).
- Active pharmaceutical principles (norfloxacin, pipemidic acid, riboflavin, pyridoxine, ascorbic acid, furosemide, triamterene, salicylic acid, paracetamol and labetalol) in pharmaceuticals and biological fluids (serum and urine).

The main characteristics of the developed methods are high sample throughput, simplicity, low-cost and the possibility of determining one or more analytes in a selective and sensitive way in a great variety of complex matrices. These characteristics make the methods suitable for routine analysis, such as screening methods for the determination of pesticides in foods and quality control in pharmaceutical areas.

Taking into account the methodology for handling solutions, the number of analytes determined or the detection technique employed, several classifications for the described methods in this Research Report arise. The first one, depending on the flow system:

- Conventional FIA (rotary valves): two optosensors.
- Multicommutation (three-way solenoid valves): five optosensors.
- SIA: four optosensors.

The implementation of SIA or multicommutation in flow-through luminescence optosensing provides a higher degree of automation when compared with conventional flow injection analysis (employing manual rotary valves). In addition, a great saving in reagents consumption is obtained.

Multicommutation systems employ three-way solenoid valves, making it possible to automate all the steps of the analytical methods developed and control the process from a computer. In the case of making use of SIA, the whole system can also be automated by using the appropriate software. In all the SIA or multicommutated methods here presented, great savings in both sample and reagents solutions were observed when compared to conventional FIA.

The developed optosensors making use of each methodology follow:

- FIA (rotary valves): monoparametric sensor for determining norfloxacin and triparametric sensor for analysis of pesticides carbendazim, carbofuran and benomyl.
- SIA: two fluorescent monoparametric sensors: paracetamol and labetalol; a terbium-sensitized luminescent optosensor for determining salicylic acid and a double luminescent sensor for determining three vitamins
- Multicommutation: fluorescent monoparametric sensor for bitertanol and biparametric sensors for fuberidazol/o-phenylphenol and furosemide/triamterene; terbium-sensitized sensor for pipemidic acid and chemiluminescent sensor for salicylic acid determination.

Another classification can be made taking into account the number of analytes determined by the developed optosensor: monoparametric sensors for just one analyte and multiparametric ones for more than one target compound. In this Research Report, seven monoparametric optosensors and four multiparametric optosensors are described.

When multiparametric optosensors are developed, two different approaches can be used for fulfilling the analytes separation previously to their determination:

- Making use of a precolumn, filled with the same solid support used as sensing zone, placed previously to the detection zone. The analytes

interact with the beads in the precolumn based on their different kinetics of retention/elution and are temporarily retained; therefore, a temporal discrimination is obtained, allowing the sequential arrival of the analytes to the detection zone. This strategy has been employed in the multiparametric sensors for determination of benomyl/carbendazim/carbofuran and o-phenylphenol/fuberidazol. Hence, by means of an only sample insertion, the determination of all the analytes is achieved.

- Filling the flow-through cell with more solid support than the strictly necessary for the detection; this additional solid support allows the separation of the analytes in the same flow-through cell, just above the detection area. This strategy, which needs very different retention/elution kinetics of the analytes to be separated, was employed for the furosemide/triamterene fluorescence sensor and for the separation of riboflavin and pyridoxine in the multiparameter sensor for determination of vitamins.

The last classification would be taking into account the detection technique employed in the sensor:

- Native fluorescence: o-phenylphenol, fuberidazole, carbendazim, benomyl, carbofuran, bitertanol furosemide, triamterene, riboflavin, pyridoxine and labetalol.
- Fluorescence obtained after derivatization reaction: paracetamol.
- Terbium-sensitized luminescence: norfloxacin, pipemidic acid, salicylic acid.
- Chemiluminescence: salicylic acid, ascorbic acid.

In all the sensors here described, a study of the experimental variables has been required: spectral characteristics of the analytes, instrumental variables, selection of solid support, chemical variables (pH, carrier, reagents), flow variables, etc. After careful optimization of all the variables, the analytical parameters of the flow system were obtained. Finally, the selectivity of the method was tested by a proper interference study and it was applied to the determination in real samples.

Based on the obtained results, it could be concluded that the coupling between flow methodologies and solid-phase spectroscopy presents attractive characteristics for applications in several research fields that have been described in this Research Report:

- Environmental Analysis (determination of pesticides in waters)
- Food Security (determination of post-harvest fungicide residues in fruits)
- Pharmaceutical Analysis (routine active principle analysis in pharmaceuticals)
- Clinical Analytical Chemistry (determination of active principles in biological fluids)

The use of the developed analytical methods would be specially recommended for simple samples and routine analysis, such as pharmaceuticals. However, the analysis of more complex samples is also possible, as it has been demonstrated by the analysis of pesticides in food: The determination of bitertanol residues in banana presents a detection limit lower than the maximum residues level allowed by the European Union. In addition, the employment of SIA or multicommutation makes it possible to develop automatic and environmentally-friendly analytical methods, widening the scope of applications of flow-through optosensing.



UNIVERSIDAD DE JAÉN

SENSORES EN FLUJO
CONTINUO CON DETECCIÓN
LUMINISCENTE EN FASE
SÓLIDA: IMPLEMENTACIÓN DE
NUEVAS ESTRATEGIAS

EULOGIO J. LLORENT MARTÍNEZ

tesis doctoral

Indice

I. Justificación e Introducción	5
1. Sistemas automáticos de análisis en flujo	7
2. Análisis por inyección en flujo	11
3. Otras metodologías de análisis por inyección en flujo	27
4. Optosensores en flujo continuo	37
5. Los analitos y su determinación.....	57
II. Objetivos	83
III. Antecedentes	86
IV. Discusión conjunta de resultados	93
1. Reactivos e Instrumentación	94
2. Estudios preliminares. Espectros	101
3. Configuración del sistema de flujo empleado	106
4. Variables Experimentales.....	123
4.1 Variables de la unidad de retención-detección	123
4.2. Variables químicas	128
4.3. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo.....	142
4.4. Variables instrumentales	147
5. Calibración de los sensores. Parámetros analíticos	151
6. Estudio de interferencias	160
7. Aplicaciones analíticas	171

V. Conclusiones. Conclusions	197
VI. Bibliografía	202
VII. Anexo	243

Justificación

I. JUSTIFICACIÓN E INTRODUCCIÓN

La Memoria de Investigación presentada se titula "SENSORES EN FLUJO CONTINUO CON DETECCIÓN LUMINISCENTE EN FASE SÓLIDA: IMPLEMENTACIÓN DE NUEVAS ESTRATEGIAS".

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

Las investigaciones en esta línea van dirigidas a profundizar y desarrollar la espectroscopia en fase sólida (SPS) en modo automático (mediante el uso de multiconmutación o análisis por inyección secuencial), incluyendo el diseño de nuevas estrategias que permitan extender estos sistemas al análisis de varios componentes y a la resolución de problemas analíticos reales. Para ello, se aborda el desarrollo de optosensores tanto mono- como bi-parámetro con aplicaciones en diferentes tipos de muestras, empleando detección luminiscente (fluorescencia, luminiscencia sensibilizada por lantánido y quimioluminiscencia).

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

En 1976, Yoshimura propuso combinar el uso de un soporte sólido para preconcentrar la especie de interés con la medida directa de la absorción de luz de dicha especie retenida sobre la fase sólida, surgiendo así la espectrometría en fase sólida ("Solid-Phase Spectroscopy" (SPS)) [1]. Los

primeros trabajos se dedicaron al análisis de traza metálicas [2] y después se extendieron al de compuesto orgánicos [3, 4].

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

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

Básicamente, un sensor consta de:

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

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

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

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

1. SISTEMAS AUTOMÁTICOS DE ANÁLISIS EN FLUJO

Estos sistemas surgen de la necesidad de realizar los ensayos analíticos con un menor coste de material y tiempo, con las ventajas que ello implica de mayor comodidad, mejora en la productividad, así como disminución de errores, menor participación humana y métodos más respetuosos con el medio ambiente.

1.1. Tipos de sistemas analíticos automáticos

Los sistemas automáticos asignan unas acciones previamente programadas por el operador para ser llevadas a cabo en unos momentos determinados

del proceso sin intervención humana. Estos sistemas no toman decisiones por sí mismos y siguen siempre la misma secuencia de operación.

En función de cómo ocurra el proceso, los métodos automáticos se clasifican en discontinuos y continuos, encontrándose en algunas ocasiones una combinación de ambos:

- Discontinuos, en los que la muestra se mantiene separada en un receptáculo (cubeta) en el que tienen lugar las distintas etapas analíticas (adición de reactivos, agitación, calentamiento, dilución), como se muestra en la Figura II.1. Posteriormente se lleva a la unidad de detección, donde se obtiene una señal analítica puntual para cada muestra, después de haber alcanzado el equilibrio químico o estacionario.

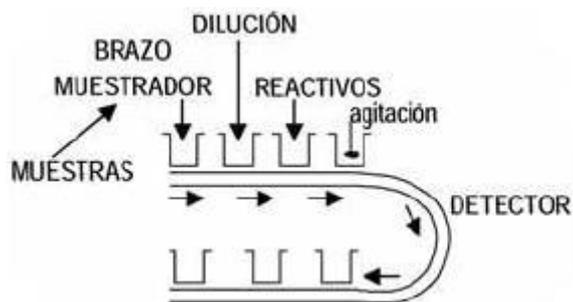


Figura II. 1. Esquema general de un sistema analítico automático discontinuo.

- Continuos, la medida analítica se realiza sin interrumpir el flujo de un líquido o gas. Las muestras se van introduciendo directamente, a intervalos regulares de tiempo, en un canal por el que fluye un portador que puede ser el propio reactivo, en caso de ser necesaria una reacción química, o que confluye con éste. El flujo pasa continuamente por la célula de medida, situada en la zona de detección de un detector apropiado, donde se realizan las medidas.

Las señales analíticas son transitorias en forma de pico. La Figura II.2 muestra un ejemplo de un sistema de este tipo.

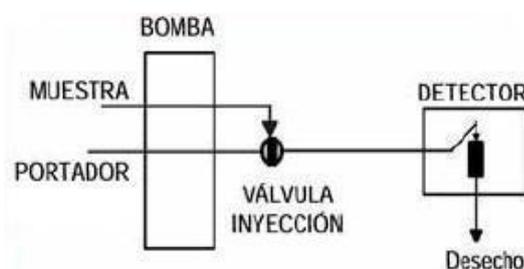


Figura II. 2. Esquema general de un sistema analítico automático continuo (FIA).

1.2. Sistemas analíticos automáticos continuos

Una clasificación general de los métodos automáticos continuos podría establecer dos grupos fundamentales: Sistemas continuos de flujo segmentado y de flujo no segmentado. En la Tabla II.1 se muestra una clasificación de los métodos automáticos continuos basada en el modo en que se elimina la posible interferencia entre las muestras sucesivas [6].

Tabla II.1. Métodos automáticos continuos.

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

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

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

2. ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO (FIA)

El análisis por inyección en flujo es una modalidad de los sistemas en flujo continuo en los que el flujo no está segmentado por burbujas de aire. El FIA ha experimentado un rápido desarrollo desde la introducción del concepto original por Ruzicka y Hansen [7] (Dinamarca) y Stewart [8] (E.E.U.U.) en la década de los setenta, abarcando en la actualidad casi todos los campos analíticos. Aunque resulta difícil formular una definición del FIA que englobe a las diversas modalidades que del mismo han ido surgiendo desde sus comienzos, se podría decir que se trata de un tipo de análisis automático en flujo continuo, que se basa en la inserción y dispersión controlada de un volumen de disolución en una corriente continua de un portador, que lo transporta hasta el detector, donde se genera una señal transitoria en forma de pico, denominada fiagrama. Presenta gran versatilidad, ya que las posibilidades y aplicaciones analíticas son muy numerosas, con un presupuesto reducido y gran sencillez en el manejo, proporcionando resultados de gran rapidez, exactitud y precisión [9]. El término *Flow Injection Analysis (FIA)* se mantiene por razones históricas, debido a que inicialmente Ruzicka y Hansen [10] empleaban una jeringa para introducir la muestra en el flujo, aunque, actualmente se realiza por inserción con válvulas rotatorias.

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

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

Para dar una visión global de las múltiples posibilidades de esta metodología, bastaría decir que todas las operaciones necesarias efectuadas en cualquier modalidad de análisis convencional: filtración y redisolución, extracciones líquido-líquido, reacciones de formación y recogida de gases, utilización de reactivos sólidos o inmovilizados, se pueden realizar con facilidad en la modalidad FIA, mejorando de esta forma su reproducibilidad, tiempo de análisis y permitiendo el ahorro de reactivos.

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

2.1. Características esenciales de la metodología FIA

Las características esenciales de la metodología FIA son [11]:

- Flujo no segmentado por burbujas de aire, diferenciándose en ello de los métodos de análisis en flujo segmentado.
- Inserción o inyección directa de un volumen bien definido de muestra en el flujo, en lugar de aspiración.
- Se realiza un transporte del bolo de muestra insertado a través del sistema. Puede también tener lugar un proceso químico y/o físico-químico adicional al transporte (reacción química, diálisis, extracción líquido-líquido, etc.).
- La dispersión o dilución parcial del analito en ese transporte puede ser perfectamente controlada a través de las características geométricas e hidrodinámicas del sistema.
- Un sistema de detección continua proporciona una señal transitoria, que es convenientemente registrada (fiagrama).
- En el momento de la detección de la señal, no se ha alcanzado el equilibrio físico (que supondría la homogenización de una porción del

flujo) ni el equilibrio químico (reacción completa). Por ello la metodología FIA pueden considerarse dentro de los Métodos Cinéticos de Análisis y en su modalidad de medida a tiempo fijo.

- El tiempo de operación debe ser muy reproducible, pues las medidas se realizan en condiciones de no estabilidad, y por tanto, pequeñas variaciones del mismo pueden producir grandes alteraciones de los resultados.

2.2. Componentes básicos de un sistema FIA

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

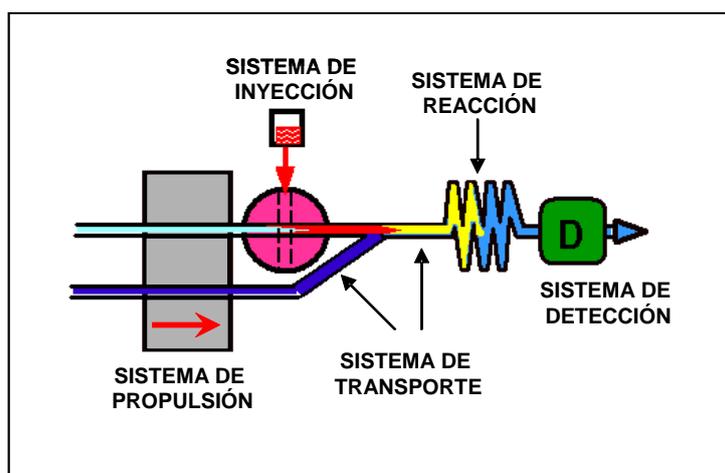


Figura II.3. Elementos básicos de un sistema FIA

A. Sistema de propulsión

Establece un flujo de caudal lo más constante posible de una disolución (o de varias) que lleva disuelto un reactivo o hace de simple portador. Debe

suministrar un flujo constante y regular en el sistema, ausente de pulsos y perfectamente reproducible.

Pueden usarse como sistema de propulsión bombas, sistemas de presión o sistemas de gravedad. El más utilizado es la bomba peristáltica, basada en la presión ejercida por una serie de cilindros rotatorios sobre tubos de plástico flexible. El caudal suministrado por la bomba peristáltica vendrá determinado, entre otros factores, por el diámetro interno de los tubos.

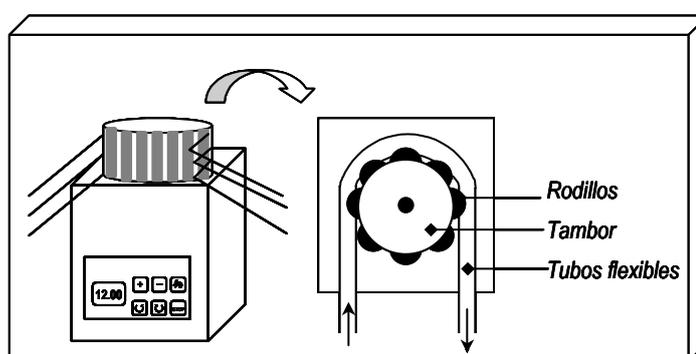


Figura. II.4. Bomba peristáltica y vista esquemática de su parte superior

B. Sistema de inyección

Debe permitir la introducción o inserción de un volumen de muestra exactamente medido en la corriente portadora de forma completamente reproducible, sin crear perturbaciones en el flujo del portador. Los volúmenes deben ser variables en un amplio rango, ampliando la versatilidad del sistema. Estos dispositivos pueden controlarse mediante un motor eléctrico, y en cualquier caso, su utilización debe ser fácil, cómoda y rápida para ampliar la frecuencia de muestreo. Los primeros sistemas de inyección utilizados fueron jeringas y agujas hipodérmicas, pero los más empleados actualmente son las válvulas rotatorias, generalmente de seis vías (Figura II. 5).

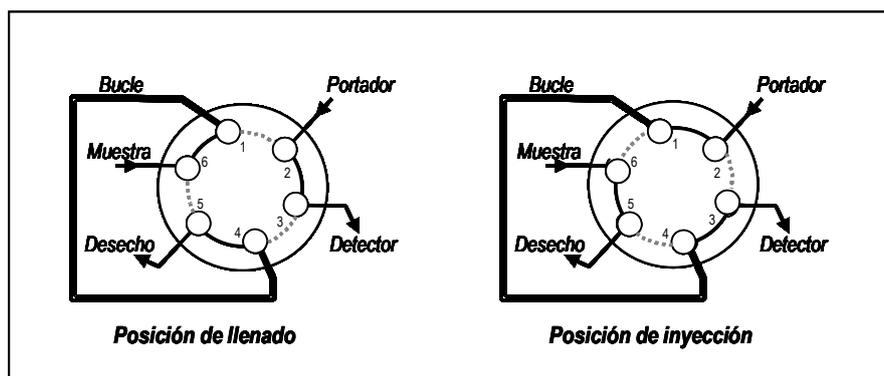


Figura. II.5. Esquema de una válvula rotatoria de seis vías

C. Sistema de transporte

Tiene como misión fundamental conectar entre sí los diferentes elementos y conseguir en el transporte de los fluidos a su través un adecuado grado de dispersión de la muestra con la corriente portadora. La trayectoria del flujo debe ser fácilmente programable para realizar una amplia variedad de ensayos; además, el flujo debe ser totalmente reproducible. Se utilizan tubos de pequeño diámetro (0.1-2 mm) de un material químicamente inerte y termoestable; los más usados son el teflón, polietileno y propileno.

D. Sistema de reacción

Es donde se va a desarrollar la reacción química (en caso necesario) para la posterior detección del analito. Se suelen emplear los mismos tubos que en el sistema de transporte, encontrándose en este caso enrollados en forma helicoidal. Este sistema de reacción puede estar calentado por baños termostatisados o mantas eléctricas.

E. Sistema de detección

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

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

Los sistemas de detección más usados en FIA abarcan diferentes tipos dentro de los métodos analíticos, como los detectores ópticos y electroanalíticos:

Detectores ópticos

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

Estos detectores ópticos se pueden clasificar en función de la técnica que sirve de base a la detección:

Espectrofotometría de absorción molecular UV-visible

La espectrofotometría de absorción molecular es una de las técnicas de detección más empleadas en FIA, debido a la existencia de un gran número de métodos basados en reacciones selectivas coloreadas [12-14] utilizables para todo tipo de compuestos y elementos, y a la gran cantidad de compuestos que presentan bandas representativas en la zona UV del espectro [15].

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

Luminiscencia molecular

La espectroscopia de luminiscencia molecular es otra de las técnicas más empleadas para el desarrollo de métodos de análisis en flujo continuo. El fenómeno de la luminiscencia se basa en la emisión de energía en forma de radiación electromagnética (ultravioleta, visible o infrarroja cercana) por parte de moléculas, átomos o iones, como resultado de la transición desde un estado electrónicamente excitado a un estado de menor energía, normalmente el estado fundamental [16].

Las dos manifestaciones más conocidas de la luminiscencia producida por especies moleculares de utilidad analítica son la fluorescencia y la fosforescencia [17, 18]. Otra manifestación que está adquiriendo cada vez una mayor importancia en analítica es la quimioluminiscencia [19], que en términos sencillos se puede definir como la producción química de radiación: el estado excitado se produce a expensas de la energía resultante de una reacción química. Cuando en este tipo de reacciones intervienen los

seres vivos o sistemas biológicos, el fenómeno recibe el nombre de bioluminiscencia. Por último, también hay que destacar el uso de la luminiscencia sensibilizada por lantánido.

- *Fluorescencia molecular.* La fluorescencia molecular es la fotoluminiscencia de tiempo de vida corto procedente de un singlete excitado. La detección fluorescente presenta muchas ventajas, como alta selectividad, bajo límite de detección, capacidad para la miniaturización y bajo coste, por lo que ha sido ampliamente utilizada. Uno de los inconvenientes es el pequeño número de especies que manifiesta efecto fluorescente [20] aunque puede ampliarse el campo de aplicación mediante el uso de reacciones químicas sencillas [21] o de la fluorescencia fotoinducida [22].

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

La detección espectrofluorimétrica se emplea en siete sensores de esta Memoria.

- *Fosforescencia.* La fosforescencia es otra técnica espectroscópica de emisión molecular, que ha sido usada como detección en sistemas FIA [18]. Se caracteriza por ser una fotoluminiscencia de tiempo de vida largo procedente de un triplete excitado, formado por la absorción de radiación ultravioleta, visible o infrarroja cercana. Aunque se ha aplicado a sistemas FIA, su empleo no está tan generalizado como la fluorescencia o la quimioluminiscencia, ya que se requieren algunas características determinadas para que se

registre una señal fosforescente razonable (soportes sólidos, medios organizados, entornos de metales pesados, etc.)

- *Quimioluminiscencia.* La quimioluminiscencia se define como la producción de radiación electromagnética como resultado de una reacción química, de forma que alguno de los productos de reacción se obtiene en el estado excitado y emite luz al volver a su estado fundamental. El que se produzca este fenómeno no suele ser muy común, ya que si la energía liberada en la reacción química no es lo suficientemente elevada para provocar la excitación, se disipa en forma de calor u ocurre la combinación de ambos. El proceso por el que se produce la quimioluminiscencia es el mismo que para la fotoluminiscencia (fluorescencia y fosforescencia) excepto que no se necesita ninguna fuente de excitación luminosa. Las aplicaciones de la quimioluminiscencia como detección en sistemas de flujo continuo (principalmente FIA) son muy numerosas [23-26]. Existe un gran número de aplicaciones y de revisiones de aplicaciones de quimioluminiscencia en clínica, medioambiente, productos farmacéuticos, etc.

La quimioluminiscencia se ha empleado como técnica de detección en dos sensores de esta Memoria.

- *Luminiscencia sensibilizada por lantánido.* Los iones europio y, especialmente, terbio, pueden formar quelatos o complejos con ligandos orgánicos y producir transferencia de energía intramolecular a través del estado triplete del ligando a niveles de emisión del ion lantánido; es decir, la excitación se produce a la longitud de onda característica del compuesto orgánico (el analito) y la emisión se produce a la longitud de onda característica del lantánido [27, 28]. Las principales ventajas de este proceso son un gran desplazamiento de Stokes, bandas de emisión muy estrechas y larga vida media de luminiscencia (lo que permite las medidas en el espectrofluorímetro

en modo fosforescencia). De esta forma se consigue una gran selectividad en las medidas realizadas. El inconveniente es el pequeño número de compuestos que pueden complejarse con los iones lantánidos para poder utilizar esta técnica de detección, de aquí también su gran selectividad.

Esta técnica de detección se ha empleado en tres sensores de esta Memoria.

Espectroscopia infrarroja

Los mayores inconvenientes de este sistema de detección se centran en la falta de transparencia de los disolventes, así como en las dificultades del montaje y limpieza de las células. En este sentido, el empleo de mezclas de disolventes y el acoplamiento de la espectroscopia IR con técnicas de inyección en flujo han hecho que el análisis cuantitativo de líquidos por IR vaya ocupando un lugar cada día más importante en la literatura científica [29-31], aunque la sensibilidad no sea muy elevada. En particular, debido a su alta velocidad de barrido, se suele emplear la espectrometría IR mediante la transformada de Fourier (FTIR).

Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman también se puede aplicar como sistema de detección en los métodos FIA, tanto para especies inorgánicas como orgánicas. Los espectros Raman tienden a ser menos confusos que los espectros de infrarrojo, por lo que es menos probable la superposición parcial en mezclas y las medidas cuantitativas son más sencillas. Además, la instrumentación Raman requiere pequeños volúmenes de muestra y no está sujeta a la influencia negativa de la humedad.

A pesar de estas ventajas, la sensibilidad obtenida con esta técnica no es muy elevada, lo que se puede mejorar notablemente con otros tipos de

espectroscopia Raman, como la espectroscopia Raman sensibilizada en superficie (SERS) [32, 33]. Esta técnica implica la obtención de los espectros de muestras que se adsorben en la superficie de partículas metálicas coloidales (normalmente plata, oro o cobre) o sobre superficies porosas de piezas de estos metales.

Técnicas espectroscópicas atómicas

En las técnicas atómicas generalmente se utiliza un volumen de muestra de 0.5 a 2 ml, pero para el análisis de muestras de menor volumen se puede conjugar con el FIA para resolver este problema. Una característica fundamental del uso en la metodología FIA de un instrumento de absorción atómica (cualquiera de sus modalidades) [34, 35], fotómetro de llama [36], ICP [37] o fluorescencia atómica [38], es el hecho de no precisar célula de flujo. En estos sistemas, el portador, continuamente bombeado, se aspira hasta el nebulizador, y la inserción de la muestra en el portador da lugar a su aparición en el nebulizador, produciéndose a continuación la atomización o ionización, sin ser necesaria la célula de flujo. Otra característica es la baja dispersión, factor adicional para una mayor sensibilidad. En particular hay que destacar la utilización del ICP-MS como sistema de detección, habida cuenta de la gran sensibilidad, frecuencia de muestreo y versatilidad que proporciona [39].

Espectrometría de masas

Con la aparición del Electrospray (fuentes de ionización API (ESI y APCI)), se ha avanzado mucho en la ionización y detección de compuestos orgánicos en caudales de líquido de alrededor de entre 0.1 y 1 ml/min. La aparición de ésta técnica de ionización de disoluciones líquidas (acuosas) no sólo ha promovido el desarrollo de las técnicas acopladas (principalmente HPLC-MS), sino que ha permitido el desarrollo de aplicaciones "FIA-ESI-MS" [40, 41]. Estas técnicas

permiten unos niveles de selectividad y sensibilidad muy altos, con un grado de confirmación muy elevado.

Detectores Electroquímicos

Los detectores electroquímicos son de gran utilidad en sistemas hidrodinámicos debido a su selectividad, sensibilidad y linealidad de respuesta en un amplio rango de concentración. La propia naturaleza de los procesos electroquímicos, que generalmente ocurren en una superficie en lugar de hacerlo en el seno de la disolución, los hace muy atractivos y convenientes para la detección miniaturizada. El principal inconveniente que plantea este tipo de detectores lo constituye el material del electrodo. El envenenamiento de la superficie en el caso de electrodos sólidos debido a la adsorción se manifiesta en una pérdida de estabilidad a causa de la pasivación y consecuente disminución de la señal.

Los detectores electroquímicos en FIA pueden clasificarse atendiendo a varios criterios:

- a) Según la base de la medida.
- b) Según la situación de la superficie activa o sensor responsable de la señal analítica.
- c) Según la posición del electrodo de referencia.

Técnicas amperométricas

De estas técnicas hay que distinguir entre los diseños que implican electrodos sólidos y los de gotas de mercurio (EGM). Los EGM [42] tienen la ventaja de una superficie continuamente renovada que asegura una sensibilidad y un nivel de la línea base estable.

El campo de aplicación de estos detectores abarca, fundamentalmente, la determinación a muy bajas concentraciones de compuestos fisiológicamente activos, como neurotransmisores y sus precursores, y metabolitos [43, 44]. Han sido propuestos numerosos diseños de células; sin embargo, la geometría de la célula parece no tener gran influencia en parámetros como límites de detección y estabilidad del electrodo.

Técnicas potenciométricas

Un detector electroquímico en un sistema dinámico recibe el nombre de potenciométrico cuando la diferencia de potencial entre dos electrodos en condiciones de corriente constante (generalmente cero) se mide en función de los componentes del flujo. La detección potenciométrica presenta numerosas ventajas, como simplicidad del dispositivo experimental, sensibilidad, selectividad, rápida respuesta y química relativamente simple. Las desventajas más importantes son la difícil interpretación de la medida si el ion a determinar está prácticamente complejado, y ser sensibles a la actividad iónica sólo en la inmediata vecindad de la membrana.

Dentro de esta técnica se distinguen los distintos tipos de medidas [45, 46, 47] que corresponden a: Electrodo redox, electrodo de vidrio, electrodos selectivos de iones (ISFETS) y redisolución potenciométrica.

Técnicas coulométricas

La coulometría por inyección en flujo (FIC) está basada en la medida de la integral del pico corriente-tiempo obtenido en la inyección de un pequeño volumen de disolución que contiene especies electroactivas en un flujo de electrolito-soporte que pasa a través de un detector que opera en condiciones de transporte de masa limitado [48, 49]. El FIC es más efectivo cuando el electrodo tiene una gran superficie y pequeño volumen interno, llamándose entonces electrodo coulométrico.

El aporte de reactivo en esta técnica puede realizarse por generación electrolítica externa, lo que tiene un amplio campo de aplicación, especialmente cuando el reactivo se inserta en la disolución, o por un proceso de electrolisis continuo.

Técnicas conductimétricas

La asociación de esta técnica con el FIA [50, 51] ha dado lugar a un nuevo método de inyección en flujo, donde las muestras se eluyen a través de una célula de conductividad miniaturizada. Una columna de cambio iónico reduce la contribución a la conductividad del ácido o la base por neutralización. La conductividad diferencial es, por tanto, proporcional al contenido de ácido o base no considerando la sal.

2.3. Características analíticas de los métodos FIA

Los métodos FIA muestran una serie de características analíticas destacables:

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

- El empleo de un soporte sólido que permita la retención-preconcentración del analito a partir del bolo de muestra.
- El empleo de sistemas continuos de separación puede mejorar indirectamente la sensibilidad de la determinación.

- La interrupción del flujo cuando el bolo (donde se lleva a cabo la reacción) se encuentra en el reactor, permite el desarrollo de la reacción sin que se produzca dilución.
- Para conseguir una mezcla más eficiente entre el bolo de muestra y el reactivo, se utiliza un punto de confluencia entre un canal de disolvente puro, que recibe al bolo de muestra, y el canal de reactivo.

Selectividad: La adaptación de un método convencional para ser llevado a cabo de manera automática por FIA conlleva, en general, una reducción más o menos notable tanto del número de especies interferentes, como del nivel de perturbación. Este hecho se ha constatado en numerosas determinaciones FIA al establecer la comparación con el respectivo método manual. El mayor nivel de selectividad logrado se debe en muchos casos a que las reacciones paralelas indeseables no se desarrollan en el corto espacio de tiempo de medida (tiempo de residencia en FIA).

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

Rapidez: La rapidez de la metodología FIA tiene su mayor incidencia en la frecuencia o velocidad de muestreo, siendo superior respecto a las técnicas manuales. Esta mayor velocidad de muestreo en FIA puede atribuirse a la existencia de fuerzas de difusión radiales, de gran significación con relación a las de difusión axial y de convección, que ejercen un efecto de lavado

evitando la contaminación mutua entre las muestras al limitar el ancho de banda.

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

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

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

Economía y versatilidad: Al ser el FIA una técnica sencilla y simple, se caracteriza por su bajo coste, en claro contraste con otras metodologías automáticas, tanto continuas segmentadas, como discontinuas. Además, el carácter modular de un sistema FIA permite su adaptación a las diferentes necesidades. La sustitución de cualquiera de sus componentes y la incorporación de otros es tarea sencilla si se tiene en cuenta la ausencia de altas presiones que complicarían estas operaciones.

3. OTRAS METODOLOGÍAS DE ANÁLISIS POR INYECCIÓN EN FLUJO

3.1. Análisis por inyección secuencial

Ruzicka y Marshall introdujeron en 1990 otro tipo de sistemas de flujo no segmentado, el Análisis por Inyección Secuencial, SIA [52], considerado como la segunda generación de las técnicas de flujo. Los componentes de un sistema SIA se detallan a continuación, y como detector puede emplearse cualquiera de los citados anteriormente en el apartado dedicado a sistemas FIA [53-58].

Componentes de un sistema SIA: La parte fundamental de un sistema SIA (mostrado en la Figura II.6.) consiste en una válvula de selección multi-posición, o multiválvula, que es la encargada de controlar la dirección de las disoluciones en el sistema. El sistema consta también de una jeringa de pistón, que realiza la función de aspirar y propulsar las distintas disoluciones a través del sistema. Se coloca un bucle ("holding coil") entre la jeringa y un puerto de la válvula multi-posición; de igual forma, se conectan tanto el detector como el resto de las disoluciones a través de los puertos necesarios de dicha válvula. Tanto el portador como las disoluciones de muestra y/o reactivo/s son aspiradas hacia la jeringa y/o el "holding coil", para posteriormente ser impulsadas hacia el detector [59, 60]. En el caso de que sea necesaria una reacción en el sistema, se emplearán los mismos tubos que en el resto del sistema, enrollados en forma helicoidal. Este reactor se colocaría justo antes del detector.

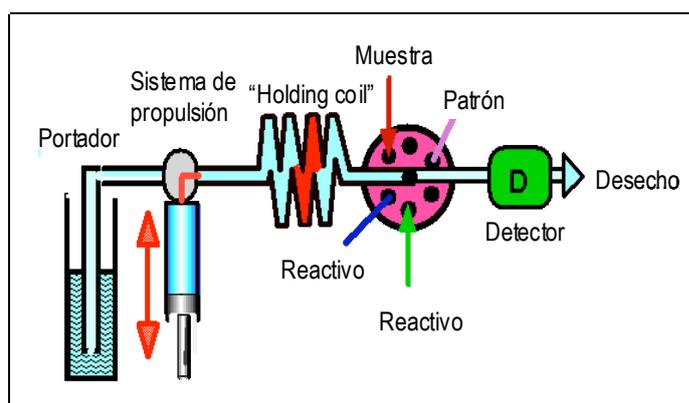


Figura II.6. Esquema general del Análisis por Inyección Secuencial (SIA)

Comparación del SIA con el FIA

Las ventajas relacionadas con el empleo del sistema SIA frente al sistema FIA (válvulas rotatorias de seis vías) son:

1. El SIA emplea un sistema más robusto y sencillo, utilizando sólo un canal incluso en el caso de necesitar producir reacciones químicas, mientras que en el FIA serían necesarios canales adicionales al emplear diferentes reactivos.
2. En los sistemas SIA, las bombas peristálticas multicanal empleadas en el FIA son reemplazadas por bombas de jeringa, mucho más precisas y robustas.
3. El consumo de muestra y reactivos decrece drásticamente al emplear sistemas SIA (en el FIA, las disoluciones están continuamente circulando a través del sistema).
4. La configuración monocanal del SIA permite usar el mismo sistema para una gran diversidad de análisis o ensayos analíticos; es decir, no es necesario modificar físicamente el sistema, al contrario de lo que sucede en el FIA convencional.
5. En el SIA, el uso de la válvula multiposición proporciona una herramienta para realizar calibraciones automáticas.

6. En los sistemas SIA todo el proceso es automáticamente controlado por medio de un software adecuado. De esta forma, es fácilmente programable la introducción de alícuotas de muestra y/o reactivos para conseguir una mayor homogeneización de las disoluciones en el caso de necesitarse una reacción química en el sistema.
7. A diferencia del FIA, donde para la inserción de volúmenes diferentes de muestra es necesario modificar el bucle de la muestra, en el SIA se aspiran volúmenes diferentes de muestra, simplemente indicando el volumen requerido mediante el software del ordenador.

Como único inconveniente, podría citarse el mayor tiempo necesario por análisis al emplear el SIA, disminuyendo, por consiguiente, la frecuencia de muestreo. Esto es debido a que es necesario aspirar en primer lugar las disoluciones antes de impulsarlas hacia el detector.

En esta Memoria se han desarrollado cuatro sensores empleando esta metodología.

3.2. Multiconmutación

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

Con estas válvulas de seis puertos los procesos de carga e inyección de muestra se efectúan por desplazamiento de un elemento móvil entre dos posiciones fijas, quedando definido el volumen de muestra a insertar por la longitud del bucle de muestra y el volumen interno de la válvula rotatoria. Sin embargo, la válvula de inyección de seis puertos es un dispositivo que condiciona el diseño del montaje FIA, exige un consumo extra de muestra y además presenta dificultades en cuanto a su automatización. Estas y otras limitaciones pueden paliarse mediante el diseño de un sistema en flujo, consistente en un conjunto de válvulas solenoide de tres puertos, actuando cada una de ellas como un conmutador independiente [61, 62].

Limitaciones de la válvula rotatoria de seis puertos

Con la válvula rotatoria de seis puertos sólo es posible introducir el volumen de muestra correspondiente al bucle; la introducción de un volumen distinto exige reemplazar la longitud del mismo con la consiguiente interrupción del flujo y consumo de tiempo [61,62]. Por lo tanto, los volúmenes de muestra a inyectar en FIA están estrictamente limitados; los volúmenes más pequeños insertables corresponden al volumen interno de la válvula que suele ser de aproximadamente decenas de microlitros; para volúmenes grandes el perfil de dispersión impone restricciones, ya que la muestra se dispersa en el medio portador sólo a través de los extremos. Por consiguiente, volúmenes grandes no permitirán un mezclado eficiente de la zona central del bolo de muestra con el portador a menos que se prolonguen los tiempos de residencia mediante caudales bajos y reactores de gran longitud, siendo necesario un lavado del bucle después de cada inyección con un volumen adicional de muestra para limpiar las paredes del mismo que han sido bañadas con la disolución portadora.

Empleo de válvulas solenoide

En el modo de multiconmutación [63] con válvulas solenoide de tres vías, el volumen de muestra a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Con

respecto a los sistemas FIA, se sustituye la medida de los *volúmenes* de inserción por la de *tiempos* de inserción, lo que permite desarrollar métodos de muestreo basados en el tiempo y conseguir un sistema en flujo activo, versátil y de fácil reconfiguración. Por tanto, la incertidumbre asociada a las alícuotas de volúmenes de muestra está relacionada principalmente con la precisión en el control del tiempo de muestreo, siendo máxima la reproducibilidad al emplear dispositivos electrónicos.

Las válvulas solenoide no solamente se han utilizado en sistemas FIA, sino que también se han utilizado en Cromatografía de Líquidos para la inserción de muestra, y entrada y salida de disolventes; en Cromatografía de Gases, para la entrada o salida de aire; en Espectrometría de Masas, para la introducción de disoluciones; y en SIA como interfase entre el horno microondas para la digestión de la muestra y el montaje para la determinación de hierro [64].

El dispositivo fundamental en multiconmutación es la válvula solenoide de tres vías. La implementación de una válvula solenoide de tres vías en un sistema en flujo presenta una estructura funcional controlada por el ordenador, como se muestra en la Figura II.7.

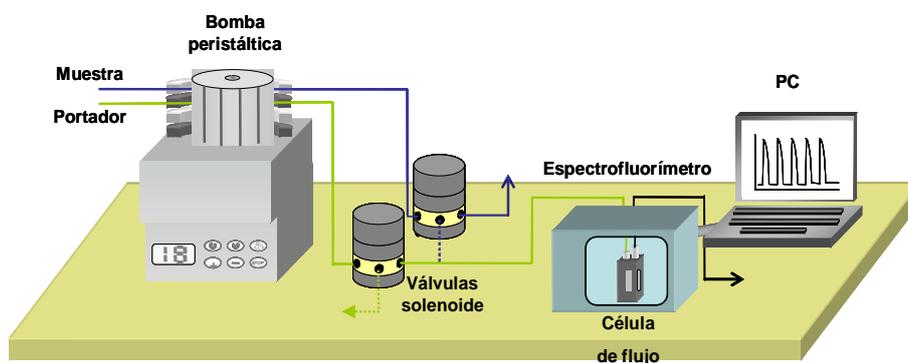


Figura II.7. Esquema de un sistema de flujo empleando válvulas solenoide.

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

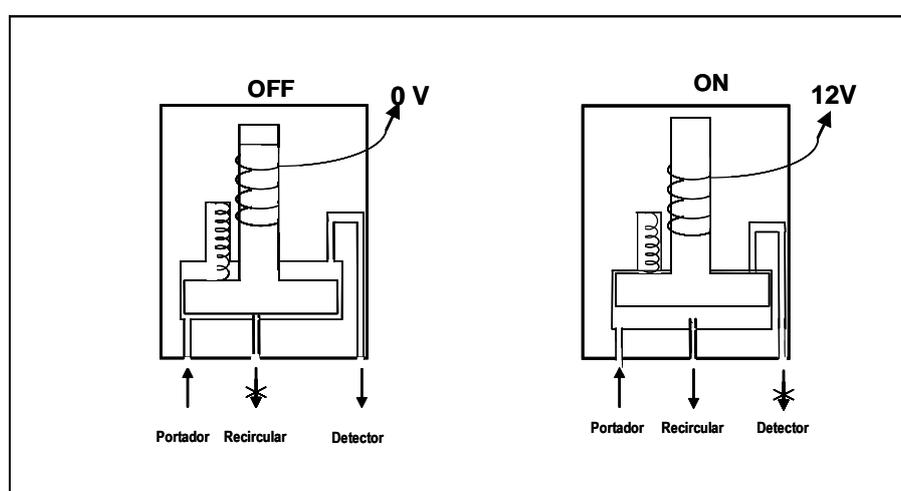


Figura II.8. Esquema del funcionamiento de la válvula solenoide de tres puertos

Las válvulas solenoide de tres puertos se comportan como un conmutador o interruptor entre dos posiciones distintas OFF y ON, permaneciendo en todo momento dos de los tres orificios de la válvula comunicados.

En la Figura II.8 se muestra esquemáticamente el funcionamiento de una válvula solenoide de tres vías; se detalla el funcionamiento para el caso en que la válvula controle el flujo del portador: En posición OFF, el solenoide que está conectado al generador está relajado y la armadura es empujada hacia abajo, circulando el portador hacia el detector. Sin embargo, en posición ON, se le transmite una cierta cantidad de energía proporcional al

pulso eléctrico al solenoide y la armadura (en forma de T invertida) es atraída hacia arriba, de esta forma se bloquea la entrada del portador, que es recirculado hacia el recipiente correspondiente.

Perfil de inserción en multiconmutación

Como ya se comentó anteriormente, mientras la válvula se encuentra inactiva (OFF) la disolución de portador es conducida hacia el detector; en posición ON un pulso electrónico de duración programable permite la inserción de la muestra en el portador. Por tanto, el volumen de muestra insertado es proporcional a la duración del pulso y puede modificarse alterando el perfil de la secuencia de inserción, siendo posible la inserción de un sólo segmento de muestra o de varios segmentos idénticos o de distintas longitudes alternados con disolución portadora. La muestra consumida es insertada en el sistema durante el tiempo que la válvula permanece activa (ON) y no es necesario un consumo adicional en tareas de lavado.

Las microinserciones de pequeños segmentos de muestra “emparedados” entre microsegmentos de portador favorecen un mezclado íntimo de las disoluciones de muestra, portador y reactivos incluso cuando el volumen insertado es grande.

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

Comparación de la multiconmutación con el FIA

El empleo de pequeñas redes con nodos en forma de válvulas solenoide, actuando como conmutadores y controladas por un ordenador a través de un sencillo *software*, permite modificar la configuración del montaje (ciclos

de apertura y cierre) sin necesidad de alterarlo físicamente ni manipularlo, ampliando enormemente las posibilidades analíticas del análisis en flujo, revolucionado en los últimos años por la metodología FIA. Las principales ventajas de la multiconmutación frente al análisis por inyección en flujo (empleando válvulas rotatorias) son [61]:

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

de las válvulas, o modificar la secuencia de conmutación de las mismas.

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

A pesar de estas importantes ventajas, la multiconmutación presenta algunas limitaciones o desventajas frente al FIA:

1. *Limitaciones en los volúmenes de inserción.* Si los segmentos de muestra y reactivos introducidos son muy pequeños se hace necesario sincronizar la unidad de bombeo y las microinserciones para evitar problemas de irreproducibilidad.
2. *Inserción de muestra y reactivos.* Debido a que las válvulas solenoide actúan como un conmutador entre las posiciones ON-OFF, una de las dos posiciones de entrada o salida de las válvulas queda cegada, quedando interrumpido el flujo por ese canal; ello obliga a emplazar en algunas ocasiones la unidad de bombeo después de las válvulas y a aspirar muestra y reactivos en vez de ser bombeados, aumentando de esta manera la irreproducibilidad del caudal. No obstante, una sencilla combinación de las válvulas solenoide permite el emplazamiento clásico de la bomba antes de los puntos de inserción.
3. *Comercialización de equipos.* La no disponibilidad comercial de los equipos (interfases electrónicas y software para el control de las válvulas solenoide) se pone de manifiesto en el hecho de que prácticamente la totalidad de los trabajos publicados relacionados con multiconmutación hacen uso de *hardware* y *software* de fabricación

propia. No obstante, la sencillez de ambos elementos permite la posibilidad de desarrollarlos sin excesiva dificultad.

4. *Mayor desgaste de la válvula solenoide:* En el desarrollo de los optosensores, el empleo del soporte sólido conlleva una cierta sobrepresión, que se hace más patente al emplear válvulas solenoide. Esta sobrepresión produce que las válvulas solenoide se estropeen antes que las válvulas rotatorias, siendo necesario su reemplazo. Aun así, hay que destacar que el desgaste de las válvulas es mínimo, y esta desventaja es menor aún si cabe al comparar el precio de las válvulas rotatorias con el de las válvulas solenoide.

Modalidades de FIA y multiconmutación

La versatilidad y aplicaciones de la multiconmutación surgen como consecuencia de la mayor simplicidad y eficacia en el control de la dispersión de muestra y reactivos en comparación con la metodología FIA. La multiconmutación no es una manera más elegante y automatizada de reproducir las estrategias que el análisis por inyección en flujo ha desarrollado desde 1975, sino que, bajo esta denominación se esconde un nuevo concepto de análisis en flujo, el cual engloba y amplía al FIA como precursor. Es interesante destacar que mediante la combinación de válvulas solenoide y el diseño de redes eficaces y versátiles, se pueden reproducir y llevar a cabo las siguientes operaciones [61]:

- Reproducir el mecanismo de inserción del bolo de muestra en FIA
- Dispersar de manera controlada muestra y reactivos para llevar a cabo una determinación multiparamétrica basada en la discriminación espacial y temporal de los segmentos de disolución insertados.
- Producir perfiles y gradiente de concentración adecuados, indispensables en procesos de dilución o en el diseño de métodos automáticos volumétricos.

- Trabajar bajo modalidades en flujo (flujo detenido, confluencia de zonas, penetración de zonas, muestreo de zonas) que exigen una sincronización perfecta de los ciclos de apertura y cierre de las válvulas, lo cual es difícil de lograr con sistemas de inserción "clásicos".
- Imitar las metodologías de flujo más recientes, como es el análisis SIA.

4 OPTOSENSORES EN FLUJO CONTINUO

4.1 Integración de la espectroscopia en fase sólida y el análisis por inyección en flujo

La espectroscopia en fase sólida (SPS) surge como intento de aplicación al análisis cuantitativo del fundamento de los "*resin spot tests*" (ensayos a la gota sobre resinas intercambiadoras de iones). Esta metodología consiste en ensayos cualitativos de observación visual basados en la aparición de coloración en unos granos de resina de cambio iónico, debido a la fijación en ella del producto de reacción del analito con los reactivos, que debe ser una especie cargada eléctricamente. A pesar de los numerosos trabajos descritos en bibliografía desde que en 1954 Fujimoto [65, 66] propusiera dicha técnica de microanálisis cuantitativo, no fue hasta 1976 cuando Kazuhisa Yoshimura [1] se basara en los "*resin spot tests*" para la determinación cuantitativa de una especie coloreada adsorbida sobre una resina sólida. Yoshimura denominó a esta técnica "*Colorimetría de Cambio Iónico*", y actualmente se suele denominar como "*Espectroscopia en Fase Sólida*" (SPS).

La espectroscopia en fase sólida es una técnica que ha sido ampliamente aplicada a la determinación de analitos orgánicos [4, 67] e inorgánicos [2], siendo métodos que presentan una alta sensibilidad y selectividad, utilizan

una metodología sencilla, barata y muestran una gran aplicabilidad a muestras reales.

Esta metodología se basa en el uso combinado de un soporte sólido para preconcentrar el analito (o su producto de reacción) con la medida directa de la absorción de radiación de la especie de interés retenida sobre el mencionado soporte sólido. Una vez retenida la especie de interés sobre la fase sólida, ésta es separada del resto de la disolución por filtración y trasvasada a una cubeta (generalmente de 1 mm de paso óptico) donde se lleva a cabo la detección espectroscópica.

Una gran ventaja de la SPS es la elevada sensibilidad que se consigue, pudiendo aplicarse al análisis de elementos traza sin la necesidad de realizar pasos previos de preconcentración, como en el caso de la espectroscopia convencional.

Por otra parte, es interesante destacar la elevada selectividad obtenida con esta metodología, debido a la retención selectiva del analito (o su producto de reacción) sobre el soporte sólido, así como la sencillez de la técnica y el bajo coste de la instrumentación que requiere.

Inicialmente la técnica se aplicó a un amplio conjunto de elementos y compuestos [4, 68-70], y más tarde se expandió el abanico de posibilidades que presenta dicha técnica cuando se introdujo la fluorimetría como método de detección [71, 72].

Posteriormente la SPS se combinó con el FIA incorporando el sólido activo a una célula de flujo. Una superficie sólida activa rodeada por una corriente que fluye a su través, combinada con la monitorización de la interacción entre dicho flujo y la superficie fue llamada por primera vez sensor óptico en flujo (flow-through sensor) por Ruzicka y Hansen [5]. Estos sistemas también denominados optosensores en flujo, pueden realizar simultáneamente la detección con la reacción y la separación en la misma

célula de medida. En la siguiente figura se esquematiza la implementación de ambas metodologías:

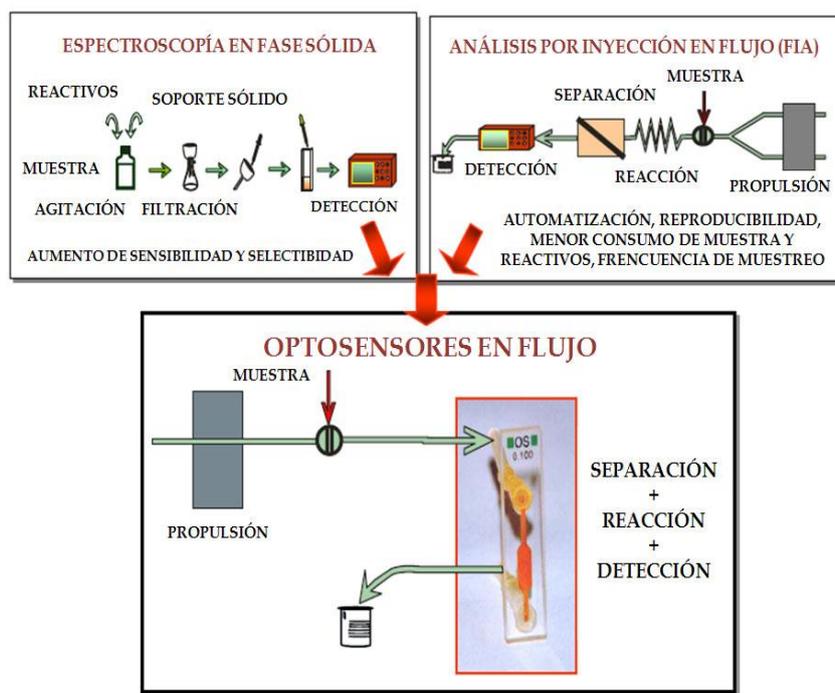


Figura II. 9. Esquema de la espectroscopia en fase sólida (SPS)

4.2 Fundamento de los optosensores en flujo continuo

Un sensor químico (o bioquímico) ideal puede definirse como un dispositivo analítico (miniaturizado) que responde de manera directa, reversible, continua, rápida, exacta y precisa a los cambios de concentración de una (o más) especie(s) de una muestra [73]. Consta de una microzona sensora, donde tiene lugar una reacción química (o bioquímica) y/o un proceso de separación, que está conectada con (o integrada en) un transductor, que en el caso de los optosensores se trata de un transductor óptico. La amplia variedad existente de sensores hace difícil describir su comportamiento en términos generales; no obstante, establecer sus propiedades genéricas, indispensables unas, deseables otras, resulta mucho más fácil. Algunas de

ellas coinciden con características esenciales de la metodología FIA, como son exactitud, precisión, sensibilidad y selectividad; otras, se refieren al tipo de funcionamiento: reversibilidad y reutilizabilidad en procesos irreversibles o regenerables. Otras características básicas son aquellas relacionadas con el tiempo: respuesta lo más próxima posible a tiempo real y rapidez en los procesos reversibles y en los de regeneración y estabilidad (duración y tiempo de vida operacional). Finalmente, otras características destacables son: simplicidad de construcción y operación, robustez, bajo costo, posibilidad de utilización con muestras complejas o sistemas en evolución y, por último, necesidad de no interpretación por parte del operador.

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

4.2.1. Sensores espectrofotométricos

La señal analítica medida en los optosensores en flujo continuo está directamente relacionada con la concentración de analito de la muestra inyectada. La absorbancia (en realidad atenuación) **A**, medida sobre el soporte sólido consta de varios componentes [74]:

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

donde,

A_A es la absorbancia del analito o su derivado retenido en el sólido.

A_R es la absorbancia del sólido (soporte sólido + reactivo, si lo hay).

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

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

La absorbancia neta del analito viene dada por

$$\mathbf{A}_A = \epsilon_R l_R \mathbf{C}_R$$

Donde

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

l_R = longitud media de paso óptico

\mathbf{C}_R = concentración de analito en la fase sólida (mol kg^{-1})

Cuando se inyectan en el sistema \mathbf{V} (l) de una muestra conteniendo una concentración \mathbf{C}_0 (mol l^{-1}) de analito, la concentración sobre la fase sólida (\mathbf{C}_R , mol kg^{-1}) será:

$$\mathbf{C}_R = \mathbf{C}_0 \mathbf{V} / m_r$$

(m_r = masa de sólido, kg) suponiendo un valor alto del coeficiente de distribución (como suele ser lo habitual). Por tanto,

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

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

De esta ecuación se desprende una importante característica de estos optosensores en flujo: manteniendo C_0 constante, A_A crece conforme crece V . Por tanto, cabe esperar una relación lineal entre A_A y el volumen de muestra inyectado, es decir, la sensibilidad es proporcional al volumen de muestra usado para el análisis y, por tanto, puede incrementarse aumentando éste. Esto se cumple en un intervalo de valores de V (hasta, generalmente, unos 1500-2000 μ l), por encima del cual la señal tiende a estabilizarse.

4.2.2. Sensores (foto)luminiscentes

En sensores fluorimétricos puede encontrarse una relación similar entre la señal analítica y la concentración de analito en la solución problema. La señal de fluorescencia de la especie de interés retenida en el soporte sólido viene dada por la siguiente expresión [74]:

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

Φ_F = rendimiento cuántico de fluorescencia

I_0 = intensidad del haz de excitación

ϵ_R, I_R, C_R igual que en sensores espectrofotométricos

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

b = espesor del soporte

Por tanto,

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

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

Relaciones similares de proporcionalidad entre la señal y la concentración de la especie de interés pueden encontrarse para sensores fosforescentes, luminiscentes sensibilizados por lantánido y quimioluminiscentes.

4.3. Componentes de los optosensores en flujo continuo

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

4.3.1. Soportes sólidos

El soporte sólido es el elemento más importante en este tipo de sensores. La elección del soporte entre la gran variedad de materiales sintéticos y naturales que pueden emplearse, constituye una parte esencial del diseño del sensor, ya que sobre la superficie del mismo se va a producir la

integración de reacción y/o retención y la detección espectroscópica. El soporte sólido empleado debe reunir ciertos requisitos:

- a) El tamaño de las partículas debe ser adecuado (entre 40 y 120 μm generalmente), ya que tamaños de partícula menores podrían generar sobrepresiones en el sistema.
- b) El material escogido debe ser químicamente inerte a los componentes de las soluciones del flujo y resistente al flujo continuo, garantizando reproducibilidad en la respuesta del sensor.
- c) Debe ser compatible con el sistema de detección usado (por ejemplo, en los sensores fotométricos, la absorción de fondo debe ser suficientemente baja para permitir realizar las medidas sin saturar el detector).

Dos son los grupos principales de soportes empleados:

A. Polímeros de intercambio iónico

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

B. Sólidos adsorbentes no polares

De este grupo, conocido también como resinas macroporosas, las resinas XAD son bastante empleadas. Generalmente, se emplea en los sensores luminiscentes, dada su alta absorción de fondo tanto en el visible como en el ultravioleta. La retención es por adsorción. También se usa como soporte

sólido gel de sílice C₁₈, que también presenta un mecanismo de naturaleza adsortiva.

Los cuatro tipos de materiales más usados son:

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

Cambiadores iónicos derivados de polímeros de estireno.

Estos polímeros de cambio iónico están constituidos por una matriz hidrófoba formada por cadenas lineales de poliestireno unidas entre sí por puentes de divinilbenceno (tipo Dowex 1, Dowex 50W, etc.). Unidos al anillo aromático, se hallan los grupos cambiadores, que pueden ser de ácido fuerte o débil para los cambiadores catiónicos (tipo Dowex 50) y de base fuerte o débil para los aniónicos (tipo Dowex 1).

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

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

Cambiadores iónicos derivados de polímeros de dextrano

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

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

Resinas adsorbentes sin grupos funcionales

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

Las resinas adsorbentes son capaces de retener gran cantidad de reactivos aromáticos por adsorción, de este modo los grupos activos de dichos reactivos

quedan libres y éstos no pierden su capacidad de complejación. No obstante, su alta opacidad en toda la región del Visible (y UV) limita fuertemente su uso en SPS.

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

Sílice con fases enlazadas

Se trata de soportes constituidos por microesferas de sílice que poseen cadenas lineales hidrocarbonadas enlazadas a los grupos silanol exteriores. La cadena suele ser de 2, 8 ó 18 átomos de carbono. Son materiales no porosos, por lo que presentan gran resistencia a los cambios físico-químicos del medio. Son soportes extremadamente útiles para la retención de compuestos orgánicos, aromáticos o no (ya sean reactivos formadores de complejos o analitos de naturaleza orgánica), ya que retienen débilmente a estos compuestos, en medio acuoso o hidro-orgánico y la elución puede conseguirse fácilmente aumentando el porcentaje de disolvente orgánico del medio. No obstante, hay que tener en cuenta que son menos selectivos que los cambiadores iónicos.

Otras fases sensoras

Además de estos soportes sólidos, se han descrito optosensores con otro tipo de fases sensoras como ciclodextrinas [75], vidrio de tamaño de poro controlado (CPG) [76], materiales de procesos sol-gel [77] y polímeros de impresión molecular [78].

Los polímeros de impresión molecular (MIPs) son materiales macroporosos con puntos de unión selectivos capaces de reconocer a una determinada molécula. Son diversos los usos que se han dado hasta ahora a estos polímeros. Estos materiales son capaces de simular, en términos de afinidad y selectividad, los anticuerpos y/o enzimas sintetizados por los sistemas biológicos. El uso de MIPs en sensores ópticos está aún en sus comienzos a pesar de la creciente atención que viene recibiendo en los últimos años [78, 79]. La incorporación de MIPs como soportes activos en sistemas de flujo aportará importantes condiciones de selectividad a estos sistemas, particularmente en la determinación de especies orgánicas, donde los soportes tradicionalmente usados en optosensores (resinas de intercambio iónico, C₁₈-gel de sílice) ejercen con estas moléculas interacciones (electrostáticas, adsorción) de carácter inespecífico.

Los MIPs ofrecen un extraordinario potencial analítico para la determinación selectiva y altamente sensible de especies, tanto iónicas como moleculares. La investigación en el campo de polímeros impresos se halla en pleno desarrollo, precisándose un enorme esfuerzo investigador [78] no sólo desde el punto de vista básico, ensayando nuevas vías de preparación, sino de nuevas aplicaciones prácticas especialmente en el campo de sensores ópticos, donde esta tecnología está en sus comienzos.

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

4.3.2. Células de flujo

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

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

El nivel de sólido en la célula es una variable clave: debe llenarse hasta una altura tal que el haz de luz incida completamente sobre el soporte sólido y sin que éste apenas llegue a exceder el límite superior del haz de luz, pues alturas crecientes a partir de este límite originan la fijación de la especie de interés por encima del haz (fuera de la zona de detección) o bien una dispersión del bolo de muestra a lo largo de una mayor cantidad de sólido, con pérdida de sensibilidad y disminución de frecuencia de muestreo. Niveles más bajos del indicado, producen, por su parte, también, una disminución de la señal, pues la luz pasa total o parcialmente a través del flujo de solución. En definitiva, la parte superior del sólido debe mantenerse tan próxima al límite superior del haz como sea posible, pero por encima de él.

4.3.3. Técnicas de detección

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

Espectrofotometría de absorción molecular

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

Por otra parte, aunque la espectrofotometría de absorción UV adolece de escasa selectividad para poder usarse en análisis espectrofotométrico convencional, el empleo de soporte sólido activo en los sensores espectrofotométricos mejora sensiblemente la selectividad. Existen un gran número de ejemplos de aplicaciones de optosensores UV especialmente para el análisis de principios activos en productos farmacéuticos [74].

Luminiscencia molecular

Espectroscopia de fotoluminiscencia molecular. La fluorescencia también ha sido aplicada al desarrollo de optosensores [74, 80, 81]. Esta técnica de detección ofrece alta sensibilidad, buena selectividad y excelentes límites de detección. El inconveniente de la misma respecto de la fotometría es el menor número de sustancias que presentan fluorescencia nativa. Por consiguiente, a menudo es necesario el empleo de reactivos derivatizadores. Otra alternativa empleada recientemente para extender las posibilidades de los optosensores fluorescentes es el empleo de fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF) [82]. Esta técnica está basada en la conversión de analitos no fluorescentes en fotoproductos fuertemente fluorescentes. La principal ventaja que presenta frente a la derivatización química es el empleo de fotones para la derivatización del

analito en lugar de un reactivo químico, no siendo necesario un sistema de mezcla y por tanto el sistema de inyección en flujo se simplifica, ya que el montaje que se requiere para desarrollar este tipo de reacciones es muy sencillo.

Por otra parte, también se han descrito optosensores que emplean detección fosforescente para una gran variedad de analitos (contaminantes orgánicos, iones metálicos, sensores de humedad y pH, etc) [83, 84].

La luminiscencia sensibilizada por lantánidos está basada en las propiedades luminiscentes de iones lantánidos (terbio (Tb (III)) y europio (Eu (III))), que se ven incrementadas, cuando interaccionan con distintas especies químicas orgánicas (fármacos, pesticidas, etc.). Esta mejora de la intensidad luminiscente que se consigue al formar este tipo de quelatos, permite el desarrollo de métodos muy sensibles, ya que la selectividad de este tipo de medidas luminiscentes es mayor que la de las medidas fluorimétricas convencionales. Son bastante escasos los optosensores de este tipo encontrados en bibliografía, habiéndose puesto a punto sensores para la determinación de fármacos como tetraciclinas y antraciclinas monitorizando la emisión luminiscente de sus complejos con Eu(III) [85-87].

Quimioluminiscencia. El uso analítico de la quimioluminiscencia (CL) está experimentando un creciente interés, gracias a su elevada sensibilidad y selectividad, bajos límites de detección e intervalos dinámicos amplios. Además, la instrumentación necesaria para llevar a cabo medidas de quimioluminiscencia es muy sencilla. En 1985, fue descrito el primer sensor en flujo con detección quimioluminiscente [76]. Empleaba luminol inmovilizado en un soporte sólido de vidrio de tamaño de poro controlado. A partir de entonces, se han desarrollado varios optosensores de este tipo principalmente para el análisis de fármacos [88- 90].

Espectroscopia vibracional

La espectroscopia vibracional es otra de las técnicas que se han implementado en el desarrollo de optosensores en flujo. Las características que aporta la espectroscopia vibracional es información específica relacionada con grupos estructurales. El desarrollo de optosensores en flujo que empleen espectroscopia vibracional con fines analíticos (cuantitativos) es muy escaso. Solamente hay algunos ejemplos en la literatura que describen el empleo de espectroscopia NIR [29], MIR [91-93] y espectroscopia Raman sensibilizada por superficies (SERS) [32, 94]. Estas técnicas de detección pueden aportar información estructural de grupos específicos y característicos de los compuestos estudiados, y esto ha sido ya explorado en el estudio de azúcares, hidratos de carbono, ácidos orgánicos, etc. También se han desarrollado recientemente un optosensor con detección por espectroscopia Raman para el análisis de antibióticos del grupo de las sulfonamidas [95].

4.4. Desarrollo de los optosensores en flujo: variables experimentales.

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

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

A. Selección del soporte sólido: variables de la unidad de retención / detección

La selección del soporte sólido es una de las etapas más importantes en el desarrollo de un optosensor en flujo. Para llevar a cabo la selección se tienen en cuenta propiedades físicas y químicas de la especie a retener. En general, se suelen usar resinas de intercambio iónico, cuando el analito presenta un equilibrio ácido-base, que permita que pueda estar cargado en un intervalo de pH determinado en función del valor de los pK_a . No obstante, cuando la molécula es apolar o no presenta grupos funcionales que permitan su retención en un intercambiador de iones, se puede recurrir al empleo de soportes sólidos sin grupos funcionales, o que permitan la retención de la especie de interés mediante un mecanismo principalmente de adsorción. Por tanto, a la hora de seleccionar el soporte sólido es necesario prestar especial atención a variables químicas como el pH de la muestra o del portador, ya que pueden tener gran influencia en el comportamiento del analito en la fase sólida.

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

B. Variables químicas

El pH y la naturaleza de la solución portadora es la primera de las variables a estudiar. Es una variable especialmente crítica, sobre todo cuando se trabaja con resinas de intercambio iónico. Cuando dicha disolución sólo hace la función de portador y no actúa como eluyente de la especie retenida, debe escogerse de forma que origine la máxima señal del analito por permitir su retención en la zona irradiada, normalmente en la parte superior de la zona sensora. El pH tiene influencia especialmente en las especies que poseen comportamiento ácido – base, careciendo de efecto significativo, generalmente, cuando el analito no sufre equilibrios protolíticos.

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

Generalmente se usan como eluyentes adicionales disoluciones ácidas, básicas, salinas, agentes complejantes, oxidantes, etc. Para gel de sílice C₁₈ suelen emplearse soluciones metanólicas. Cuando se usa el reactivo inmovilizado en el soporte, otra variable adicional a considerar es la cantidad de reactivo por gramo de soporte. Si, por otro lado, la reacción se efectúa antes de que el analito llegue al detector, el proceso de optimización del reactivo es similar al de un sistema FIA convencional.

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

C. Variables de flujo

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

Volumen de muestra: Una de las características más destacables de los sensores en flujo continuo es la posibilidad de incrementar sustancialmente la sensibilidad incrementando el volumen de muestra insertado, como consecuencia del incremento de la cantidad de analito retenido en la zona de detección. Cuando el coeficiente de distribución es alto, la dependencia de la señal con el volumen de muestra es lineal. Esto dota a estos sensores de una gran versatilidad para trabajar en un amplio rango de concentraciones, simplemente cambiando el volumen de muestra insertado. En este apartado habrá que tener en cuenta que en los sensores desarrollados empleando válvulas rotatorias o un sistema SIA se hablará de volumen de muestra, mientras que en los sensores multiconmutados hay que hablar de tiempo de inserción de muestra (conocido el tiempo de inserción y el caudal se puede calcular el volumen insertado).

D. Regeneración del soporte

La etapa de regeneración es crucial en este tipo de sensores ya que va a determinar la rapidez, sencillez del montaje, reproducibilidad, vida media del soporte sólido, etc. Dependiendo del tipo de analito y de sus propiedades físicas y químicas (polaridad, equilibrios ácido-base, grupos funcionales característicos, mecanismo de retención del soporte sólido

elegido, etc.) se optará por una determinada estrategia para llevar a cabo la elución del analito y proceder a otra nueva determinación.

Tras la medida, la zona sensora tiene que ser regenerada para la siguiente determinación, haciendo así que el sensor sea reutilizable. Llevar a cabo este paso de regeneración es un requisito clave e importante. Se puede conseguir de dos formas:

- El procedimiento más simple de regeneración se da en aquellos casos en los que la propia disolución portadora actúa como eluyente. Entonces, el proceso de regeneración comienza justo en el momento en el que el extremo posterior del bolo de muestra alcanza el soporte sólido. En este caso se obtendrá una señal transitoria. Es el procedimiento más sencillo y permite frecuencias de muestreo altas y asegura una mayor duración del soporte cuando éste es una resina de intercambio iónico.
- En los casos en los que no es posible la regeneración del sensor con el propio portador se emplea una solución eluyente adicional, que se hace llegar a la zona sensora mediante la inyección de un volumen definido en el sistema, o usando una válvula de selección. Proporciona una mayor sensibilidad al no haber elución simultánea al proceso de retención, siendo la preconcentración más efectiva, pero ofreciendo menor frecuencia de muestreo y acortando la vida del sensor si el soporte es una resina de intercambio iónico.

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

Si la retención del analito es muy fuerte, se han de emplear soluciones salinas, ácidas o básicas muy concentradas para conseguir la elución del mismo en un tiempo adecuado, lo cual conlleva que el soporte experimente hinchamientos y deshinchamientos que además de alterar la línea base acortan sustancialmente su vida. Además no siempre es posible la elución de este analito o su producto de reacción. En estos casos se justifica el uso de la renovación de la superficie sensora mediante inyección en flujo, que evita la necesidad de un mecanismo de funcionamiento reversible del sensor. Esta metodología está basada en el concepto de espectroscopia con inyección de partículas o microesferas ("*Bead Injection Spectroscopy*") [96, 97].

5. LOS ANALITOS Y SU DETERMINACIÓN

Los analitos seleccionados para desarrollar los optosensores descritos en esta Memoria de Investigación se enmarcan en el campo medioambiental, clínico y farmacológico. A continuación se realizará una breve introducción de cada uno de ellos, así como las técnicas de análisis descritas previamente en bibliografía para su determinación.

5.1. Pesticidas

La Agencia de Protección Medioambiental estadounidense define pesticida como cualquier sustancia o mezcla de sustancias, de carácter químico o biológico (virus o bacterias), destinada a prevenir, destruir, repeler o mitigar una plaga [98].

Durante las últimas décadas la lista de estas sustancias en la agricultura, ha crecido rápidamente debido al desarrollo de la química orgánica de síntesis y la urgente necesidad por el empleo de la agricultura intensiva. El uso masivo de estos compuestos para la producción, almacenamiento, manipulación y transporte de alimentos tiene como principal consecuencia

la presencia de los mismos tanto en el medio ambiente como en el producto final (alimentos). La necesidad de controlar los niveles de residuos de plaguicidas, presentes tanto en los alimentos que tomamos como en el medio ambiente, es la causa principal de que el análisis de pesticidas sea uno de los campos de mayor interés de la Química Analítica.

Los principales grupos de pesticidas de acuerdo a la especie a la que van destinados son: bactericidas, para el control de bacterias; herbicidas que protegen a las plantas de malas hierbas; fungicidas, para evitar el crecimiento de hongos; e insecticidas, para proteger a las plantas y frutos de los daños causados por insectos. Además existen otros grupos como acaricidas, nematocidas, molusquicidas, rodenticidas, virucidas y reguladores del crecimiento.

Benomilo

El **Benomilo** [1-(butilcarbamoil)bencimidazol 2-il carbamato de metilo] (Figura II.10) es un fungicida empleado en una gran variedad de cultivos. Presenta actividad preventiva y curativa sobre numerosas enfermedades de los cultivos y plantaciones agrícolas ocasionadas por hongos [99]. Su campo de actividad incluye ecto y endoparásitos; en cuyo control se recomienda tanto en tratamientos preventivos como curativos. Se consideran enfermedades controlables, entre otras, la antracnosis de los cítricos, cercospora de la remolacha, chancro del manzano y de los frutales de hueso, fialófora, mal del esclerocio de diversas hortícolas, podredumbre del pie de los cereales, podredumbre gris de la uva, repilo y otras enfermedades fúngicas. Recomendado en cereales, cítricos, champiñón, florales, fresa, frutales, hortícolas, ornamentales, platanera, remolacha y vid.

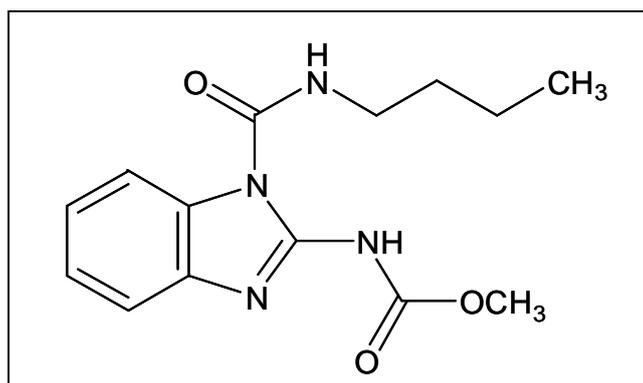


Figura II.10. Estructura del benomilo

Carbendazima

La **carbendazima** [(Bencimidazol 2-il carbamato de metilo)] es un fungicida del grupo de los benzimidazoles, que es ampliamente usado en una gran variedad de cultivos. Es el principal producto de degradación del benomilo, ya que en disoluciones orgánicas o acuosas a pH no ácidos, el benomilo se convierte en carbendazima [100].

La carbendazima posee efecto preventivo y curativo sobre enfermedades fúngicas producidas por endo y ectoparásitos. Su uso se recomienda para el control de antracnosis de la judía y del plátano, añublo del trigo, chancro del almendro y melocotonero, moteados o roñas del manzano y peral, oídio de la vid, oídio del albaricoquero, almendro, melocotonero, rosal, cerezo, ciruelo, espino blanco, manzano, cereales, etc., podredumbre gris de la uva, etc. en apio, arbustos ornamentales, cereales de invierno, fresa, frutales, leguminosas grano, lúpulo, ornamentales leñosas, ornamentales herbáceas, pepino, piña, platanera, remolacha azucarera, tomate, vid para vinificación y en la desinfección de semillas. Se le reconoce actividad secundaria sobre huevos de ácaros. Se aconseja alternar con otros fungicidas de distinto grupo químico.

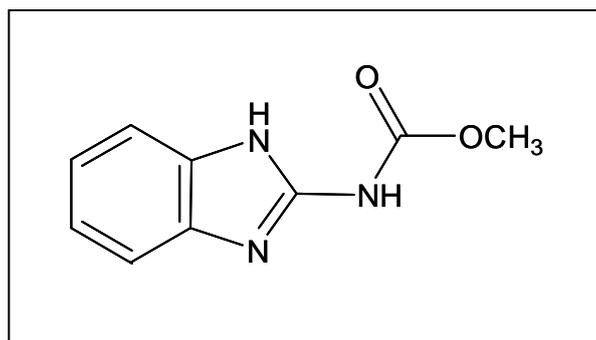


Figura II.11. Estructura de la carbendazima

Carbofurano

El carbofurano (2,3-dihidro-2,2-dimetil-7-benzofuranilo-metilcarbamato) es un pesticida ampliamente utilizado en todo el mundo para controlar nematodos e insectos del suelo [101]. Se muestra su estructura en la Figura II.12.

Su toxicidad es muy alta tanto en humanos como en aves, puesto que es un potente inhibidor de la colinesterasa, uniéndose a residuos de serina [102]. Debido a su amplio uso, puede encontrarse como contaminante en el aire, agua, suelo y alimentos.

Se recomienda su uso para los cultivos de algodón, girasol, maíz, patata, platanera, sorgo, remolacha azucarera, tabaco, tomate, ajos, brécol, coliflor y cebolla.

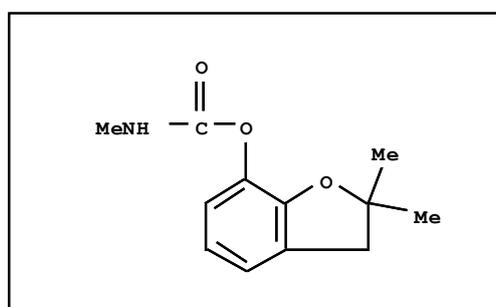


Figura II.12. Estructura del carbofurano

Métodos para la determinación de benomilo, carbendazima y carbofurano

Benomilo. Debido a la inestabilidad del benomilo en disoluciones acuosas, los métodos de análisis desarrollados están basados en la medida de su principal producto de degradación, la carbendazima [103]. Hay escasos métodos que hayan determinado benomilo de forma directa. No obstante, Singh et al. describieron mediante una serie de experiencias con distintos medios ácidos, unas condiciones en las que el benomilo permanecía estable [104]. Esto permitía la posibilidad de analizarlo individualmente (sin previa degradación a carbendazima) y/o en presencia de carbendazima.

La mayoría de los métodos fluorimétricos descritos para la determinación de benomilo se han centrado básicamente en la determinación de benomilo como carbendazima [105]. Se han desarrollado varios métodos espectrofluorimétricos para la determinación de este pesticida [106-108], incluyendo la espectrofluorimetría en fase sólida [81, 109-111]. La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de benomilo en muestras de agua están basados en HPLC con detección fluorescente [112], y/o UV [113, 114] o por espectrometría de masas [115, 116].

Carbendazima. Debido a su fluorescencia nativa [117], se han desarrollado un gran número de métodos analíticos empleando esta característica. Se ha usado fluorescencia nativa en disolución [118, 119], fluorescencia sensibilizada con micelas [120] y la combinación de micelas y ciclodextrinas [121]. También se han desarrollado métodos para la determinación de carbendazima basados en quimioluminiscencia [122] y técnicas electroquímicas [123, 124]. Además se ha empleado cromatografía de líquidos en fase reversa [125] (RP-HPLC) con detección UV o fluorescencia [112], cromatografía de líquidos con detección mediante espectrometría de masas en tandem [115] y cromatografía capilar electrocinética micelar con detección UV [126] (MEKC) para la determinación de residuos de carbendazima en aguas.

Carbofurano. La fluorescencia nativa del carbofurano ha sido empleada para el desarrollo de algunos métodos analíticos en disolución empleando métodos de calibración multivariante para evitar la interferencia de otros compuestos [127], así como empleando ciclodextrinas para aumentar al sensibilidad del método [128]. También se han desarrollado métodos empleando inmunoensayos [101, 129] o técnicas electroquímicas [130]. De igual forma, se han desarrollado un gran número de métodos empleando HPLC con detección fluorescente tras reacción derivatizadora post-columna [131] o detección por espectrometría de masas [132-134]. Por último, hay que comentar un método cromatográfico empleando UPLC con detección mediante espectrometría de masas en tándem [135].

Para la determinación simultánea de *carbofurano*, *carbendazima* y *benomilo* se ha empleado la cromatografía de líquidos con detección por espectrometría de masas [116, 136, 137].

Fuberidazol

El **fuberidazol** (2-(2-furil)-bencimidazol) es un fungicida de la familia de los bencimidazoles (Figura II.13). Es un fungicida de amplio espectro con actividad frente a una gran variedad de hongos. Se usa para el tratamiento de semillas contra enfermedades causadas por los hongos del género *Fusarium* (*Fusarium nivale* en centeno y *F. culmorum* en guisante). Se suele comercializar en productos que también contienen bitertanol e imidacloprid.

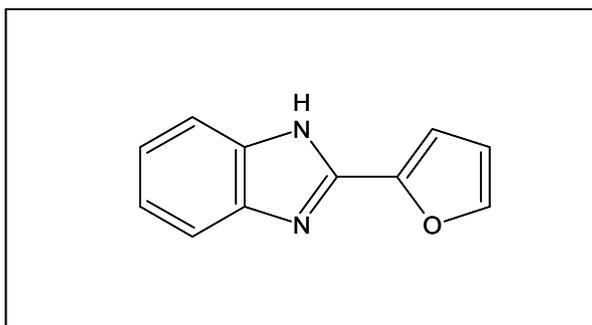


Figura II.13. Estructura del fuberidazol

Ortofenilfenol

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

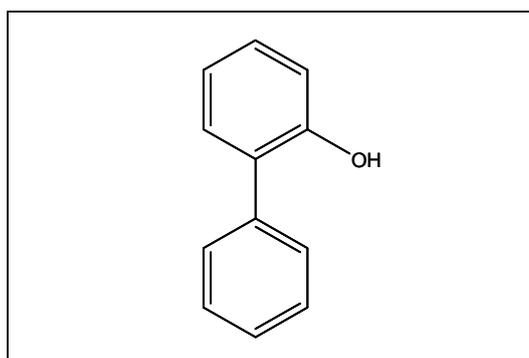


Figura II.14. Estructura del ortofenilfenol

Las asociaciones de ortofenilfenol con «ceras» y/o resinas (de coníferas, cumarona indeno, etc.), han sido desarrolladas para su empleo en el tratamiento post-recolección de frutos cítricos con el fin de protegerlos de las podredumbres de almacén de origen fúngico (aspergilliosis, diplodiosis,

peniciliosis, etc.), retrasar su envejecimiento, evitar pérdidas de peso por reducción de la respiración y transpiración y mejorar su aspecto por aumento del brillo. Las emulsiones cera-agua y cera-disolvente son de aplicación directa, mediante aparatos pulverizadores adecuados seguidos de máquina de cepillos, mientras que los líquidos solubles están indicados en el sistema de inmersión en balsa; los formulados que contienen detergentes pueden ser aplicados mediante máquinas de espuma y por inmersión en balsa.

Métodos para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol

Fuberidazol: El fuberidazol presenta fluorescencia nativa. Para su determinación se han desarrollado métodos espectroscópicos empleado espectrofotometría de absorción molecular [138], fluorescencia en disolución [118, 139, 140] o empleando ciclodextrinas [141] y fosforescencia inducida por átomos pesados [142]. También se han desarrollado métodos empleando cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [143] o HPLC con detección fluorescente [112].

Orto-fenilfenol: Este analito también presenta fluorescencia nativa. Se han descrito varios métodos para su determinación basados en HPLC con detección fluorescente [144], electroquímica [145] y por espectrometría de masas [146, 147]. También se ha empleado la fosforimetría en papel [148] y la espectrofluorimetría en fase sólida [149,150].

Para la determinación conjunta de *fuberidazol* y *orto-fenilfenol* se ha empleado la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [151, 152].

Bitertanol

El bitertanol (β -(1,1'-bifenilo)-4-iloxi- α -(1,1-dimetiletil)-1H-1, 2, 4-triazol-1-etanol) es un fungicida sistémico de la familia de los triazoles. Se usa para

la protección de diferentes cultivos, pero principalmente para el control de Sigatoca en plantaciones de plátanos. El límite máximo permitido en plátanos es de 3 mg kg^{-1} [153]

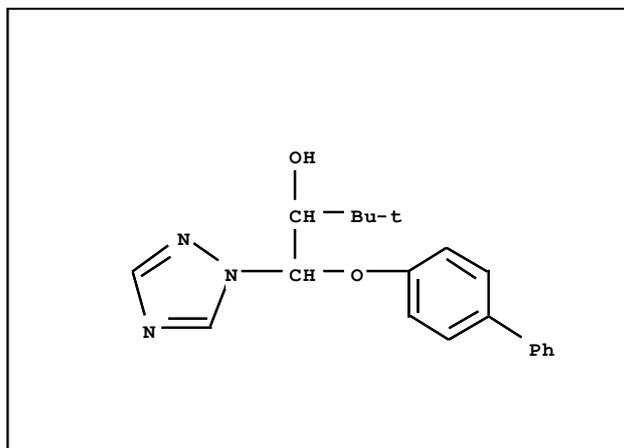


Figura II.15. Estructura del bitertanol

Métodos para la determinación de bitertanol

Para la determinación del *bitertanol* se han desarrollado métodos de cromatografía líquida con detección fluorescente [154] y, principalmente, espectrometría de masas [155-159]. También se ha empleado la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [160-163].

5.2 Principios activos

Norfloxacinó

El norfloxacinó (ácido 1- etil - 6 fluor - 1, 4 - dihidro - 4 - oxo - 7 - (1 - piperazinil) - 3 - quinolín carboxílico) es un fármaco que pertenece a la segunda generación de los antibióticos denominados quinolonas, las fluoroquinolonas. Estos antibióticos se caracterizan por tener un amplio

espectro antimicrobial, y han demostrado una excelente actividad en el tratamiento de bacterias tanto Gram negativas como Gram positivas. El norfloxacinó se emplea principalmente en el tratamiento de infecciones del tracto urinario [164]. La estructura del norfloxacinó se muestra en la Figura II.16.

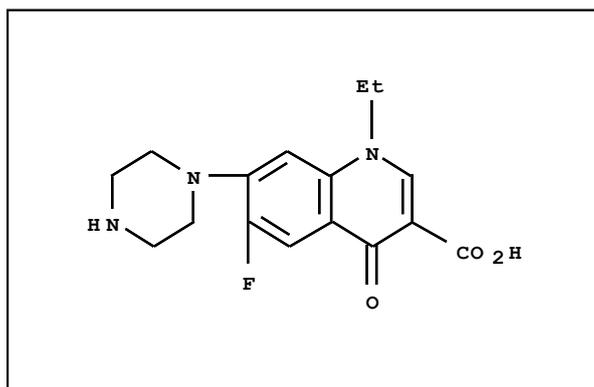


Figura II.16. Estructura del norfloxacinó

El esqueleto común de las fluoroquinolonas es 4-oxo-1, 4- dihidroquinolina, donde la unidad farmacológica consiste en un anillo de piridona con un grupo carboxílico, un grupo piperazinil y un átomo de flúor situados en las posiciones 3, 7 y 6 respectivamente. Su acción bacteriana resulta de la interferencia con la enzima ADN-girasa, necesaria para la síntesis del ADN bacteriano [165].

Métodos para la determinación de norfloxacinó

Debido a su fluorescencia nativa, diversos métodos han hecho uso de esta característica para la determinación del norfloxacinó, ya sea empleando surfactantes [166, 167] o la espectrofluorimetría en fase sólida [168]. Además de la fluorescencia nativa, también se ha hecho uso de la formación de quelatos fluorescentes empleando iones metálicos como zirconio, molibdeno, vanadio o tungsteno [169]. También se ha hecho uso de otras técnicas de detección luminiscentes, como la quimioluminiscencia [170-172] o la luminiscencia sensibilizada por lantánido [173, 174].

Además de los métodos anteriormente comentados, se han desarrollado un gran número de trabajos empleando HPLC con detección fluorescente [175, 176], quimioluminiscente [177] o por espectrometría de masas [178-181].

Furosemida

La furosemida (ácido 2-furfurilamino-4-cloro-5-sulfamoilbenzoico) es un derivado del ácido antranílico. Pertenece a la clase de los diuréticos de asa; actúa en la parte ascendente del asa de Henle, interfiriendo en el mecanismo de intercambio de iones de sodio, potasio y cloro. Además, posee capacidad inhibidora de la actividad de la anhidrasa carbónica. Su estructura se muestra a continuación.

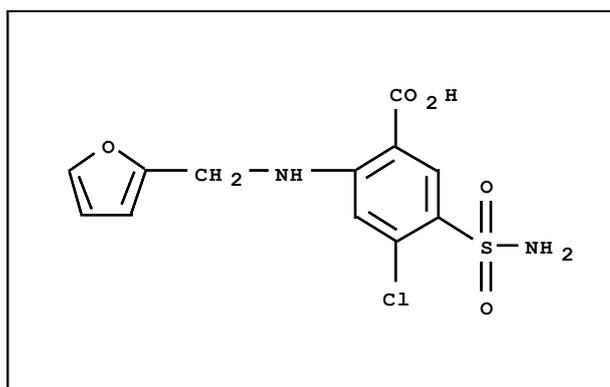


Figura II.17. Estructura de la furosemida.

Triamtereno

El triamtereno (6-fenil-2, 4, 7-triaminoteridina) es un diurético suave, de la familia denominada ahorradores de potasio. Actúa directamente en las células del túbulo distal, aumentando la excreción del sodio y disminuyendo la eliminación del potasio.

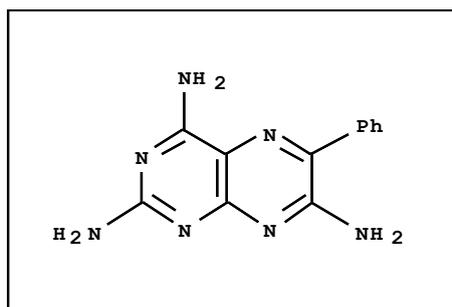


Figura II.18. Estructura del triamtereno

El triamtereno por sí solo es relativamente ineficiente como hipertensivo; de ahí que normalmente se asocie con otro diurético más potente (como una tiazida o un derivado del ácido antranílico). Por tanto, el uso conjunto de furosemida y triamtereno proporciona este efecto sinérgico en la acción diurético e hipertensiva de estas drogas, haciendo su uso conjunto bastante habitual [182].

Determinación de furosemida y triamtereno

Para la determinación de *furosemida* se han empleado una gran variedad de técnicas de detección: Fluorescencia [183], luminiscencia sensibilizada por lantánido [184], quimioluminiscencia [185, 186], espectrofotometría [187-189] y detección electroquímica [190]. Además se han desarrollado métodos empleando HPLC con detección fluorescente [175, 191, 192], espectrofotométrica [193] o por espectrometría de masas [194, 195]. También se ha empleado la electroforesis capilar con detección por espectrometría de masas [196].

En el caso del *triamtereno*, se ha empleado detección fluorescente tanto en disolución, usando calibración multivariante [197], como en fase sólida [198, 199]. También se ha empleado la espectrofotometría con calibración multivariante [200, 201] y detección electroquímica [202]. También se ha empleado detección por espectrometría de masas tras un sistema de HPLC [203].

Debido al gran uso de esta combinación de principios activos, se ha desarrollado un gran número de métodos para la determinación de ambos principios activos. Aunque hay alguna excepción, como es un método por detección fluorescente en disolución [182], en la mayor parte de los casos los métodos implican separación por HPLC con detección por espectrometría de masas [194, 203, 204] o cromatografía líquida micelar con detección espectrofotométrica [205, 206]. Por último hay que destacar un método basado en electroforesis capilar con detección por espectrometría de masas [207].

Ácido pipemídico

El ácido pipemídico (ácido 8-etil-5, 8-dihidro-5-oxo-2-(1-piperazinil)pirido [2,3-d] pirimidina-6-carboxílico) es una quinolona sintética, empleada como agente antibacteriano. Las propiedades antibacterianas de las quinolonas se asocian a su capacidad para inhibir la topoisomerasa II (ADN girasa) de las bacterias, con un tipo diferente de acción dependiendo de la estructura de la quinolona. El ácido pipemídico se emplea de forma frecuente para el tratamiento de enfermedades del tracto urinario, mostrando una gran actividad frente a las bacterias tanto Gram positivas como Gram negativas. Su estructura se muestra a continuación.

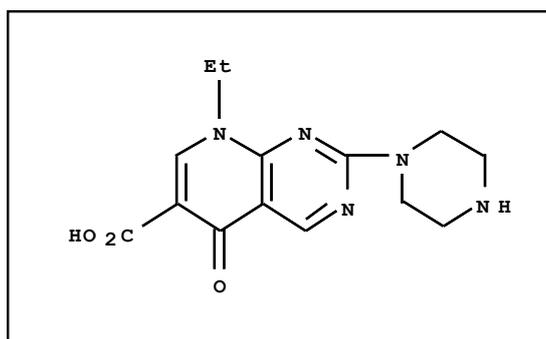


Figura II.19. Estructura del ácido pipemídico

Se han desarrollado diversos métodos para la determinación de este analito tanto en fármacos como en fluidos biológicos. Se ha desarrollado un método espectrofotométrico tras reacción con Fe (III) [[208], así como diversos métodos luminiscentes: Determinación fluorescente nativa [209, 210] o tras complejación con ligandos [211], detección quimioluminiscente [212, 213] y detección luminiscente sensibilizada por lantánido empleando europio [214] o terbio [215].

También se ha desarrollado un método empleando HPLC con detección UV y fluorescente [176], así como métodos de electroforesis capilar con detección amperométrica [216], o espectrofotométrica [217].

Ácido salicílico

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

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

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

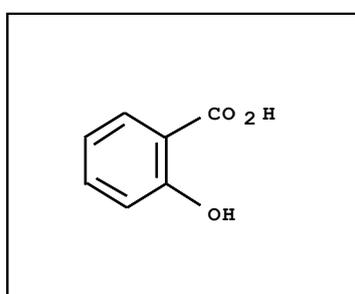


Figura II.20. Estructura del ácido salicílico

Determinación de ácido salicílico

Debido a la gran importancia de este principio activo, se han desarrollado numerosos métodos de análisis, empleando como técnicas de detección la espectrofotometría [218, 219], la fluorescencia [220, 221], la quimioluminiscencia [222, 223] o la luminiscencia sensibilizada por lantánido [27, 224].

También se han desarrollado métodos empleando HPLC con detección fluorescente [225], quimioluminiscente [226, 227] y usando espectrometría de masas [228, 229]. De igual forma, se ha empleado la electroforesis capilar con detección fluorescente [230].

Labetalol

El hidrocloreto de labetalol (hidrocloreto de 5-[1-hidroxi-2-(1-metil-3-fenilpropilamino) etil] salicilamida) es un bloqueador adrenérgico con efecto leve de bloqueo alfa-1 y predominantemente bloqueador beta. La proporción de bloqueo alfa:beta es de 1:7 por vía intravenosa y 1:3 por vía oral. También inhibe la captación neuronal de noradrenalina. El labetalol produce reducción en la presión arterial sin haber taquicardia compensatoria o refleja y sin presentar bradicardia. El bloqueo beta-2 que produce puede propiciar broncoconstricción en pacientes con antecedentes de broncoespasmo. El flujo sanguíneo cerebral y la presión intracraneana permanecen inalterados. Se emplea, además, para inducir hipotensión durante intervenciones quirúrgicas.

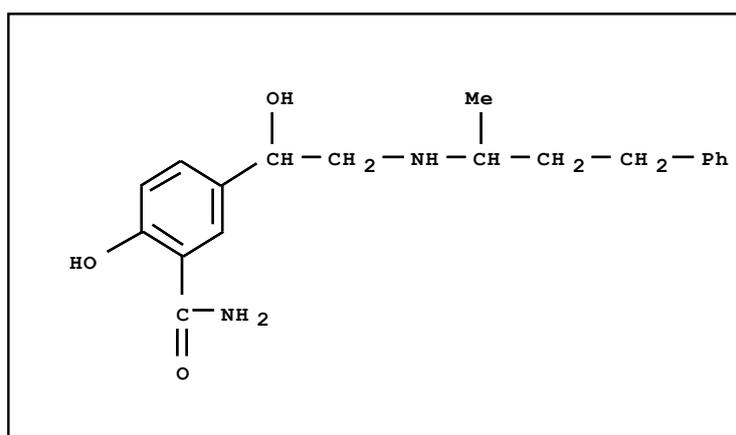


Figura II.21. Estructura del labetalol

Cuando se administra por vía intravenosa, se administran 0.25 mg/kg, dosificándolos hasta obtener respuesta antihipertensiva. El efecto máximo se obtiene entre 5 y 15 minutos tras su administración, durando el efecto hasta las 4 horas aproximadamente.

En el caso de administrarse por vía oral, se administra en dosis de 100-400 mg dos veces al día. El efecto máximo se produce a partir de la hora de administración, obteniéndose una biodisponibilidad del 20 al 40%, y

continuando el efecto hasta unas 8 horas aproximadamente desde la administración.

Determinación de labetalol

Se han descrito diferentes metodologías analíticas para determinar labetalol tanto en fármacos como en fluidos biológicos, empleando espectrofotometría [231], fluorescencia [232], técnicas electroquímicas [233] o cromatografía líquida con detección espectrofotométrica [234], amperométrica [235] o por espectrometría de masas [236, 237, 238]. También se han descrito trabajos empleando la cromatografía de gases con detección por espectrometría de masas [239, 240]. De igual forma, se ha empleado la electroforesis capilar adicionando beta-ciclodextrinas sulfatadas como selectores quirales [240] o empleando polímeros micelares basados en los aminoácidos leucina e isoleucina [241].

Paracetamol

El paracetamol, o acetaminofén, es un compuesto con propiedades analgésicas, sin propiedades antiinflamatorias clínicamente significativas. Actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas, mediadores celulares responsables de la aparición del dolor. Además, tiene efectos antipiréticos. En la actualidad es uno de los analgésicos más utilizados al ser bastante seguro y no interactuar con la gran mayoría de los medicamentos; por tanto, se usa normalmente para el alivio de la fiebre, dolor de cabeza y otros dolores menores. Su estructura se muestra en la Figura II.22.

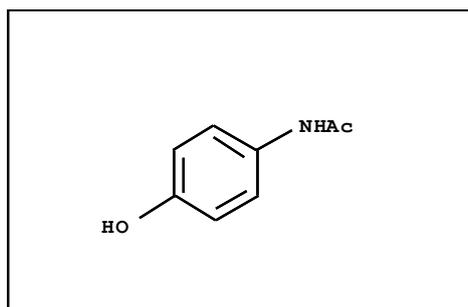


Figura II.22. Estructura del paracetamol

El paracetamol se metaboliza principalmente en el hígado, donde la mayor parte se convierte en compuestos inactivos por formación de sulfatos y glucuronida, y posteriormente es excretado por los riñones. Sólo una pequeña proporción se metaboliza mediante el sistema enzimático del citocromo P-450 en el hígado.

Los efectos hepatotóxicos del paracetamol se deben a un metabolito alquilado menor, la imina N-acetil-p-benzoquinona, que reacciona con grupos sulfhidrilo. En dosis normales, es neutralizado rápidamente combinándolo irreversiblemente con el grupo sulfhidrilo del glutatión, para producir un conjugado no tóxico que es excretado por los riñones.

Administrados en dosis adecuadas, el paracetamol es un fármaco muy seguro. Sin embargo, una sobredosis de paracetamol (dosis superior a 10 gramos en el caso de adultos) puede producir daños importantes en el hígado, incrementados aún más si se consume alcohol. El hígado, cuando está metabolizando el alcohol, no puede metabolizar simultáneamente el paracetamol, aumentando así el riesgo de hepatotoxicidad. El acetaminofén carece de efectos sobre el sistema de la ciclooxigenasa; por lo tanto, no tiene efectos negativos sobre el esófago, estómago, intestino delgado o intestino grueso.

Determinación de paracetamol

Debido a la gran importancia de este principio activo, se han desarrollado un gran número de métodos analíticos para su determinación. El empleo de la espectrofotometría UV-Visible como técnica de detección es común en la determinación de principios activos de fármacos, y en el caso del paracetamol no es una excepción. Sin embargo, la medida directa del paracetamol no es posible por el solapamiento espectral que existe debido a otros compuestos que aparecen conjuntamente en los fármacos con el paracetamol y que también absorben en la región ultravioleta del espectro. Por tanto, se han empleado distintas estrategias para evitar este inconveniente, como el empleo de reacciones derivatizadoras [242, 243], tratamientos matemáticos [244-246] o empleo de un optosensor en flujo continuo [247, 248]. También se ha empleado la fluorescencia tras reacción derivatizadora [249] o empleando tratamiento estadístico [250]. Además, se pueden destacar métodos que emplean FTIR [251] y técnicas de detección electroquímicas [252, 253].

Por otra parte, también se han desarrollado diferentes métodos cromatográficos con distintas técnicas de detección: cromatografía líquida con detección espectrofotométrica [254] o por espectrometría de masas [255, 256]; cromatografía de gases-espectrometría de masas [257, 258]; electroforesis capilar con detección espectrofotométrica [259], amperométrica [260] o por espectrometría de masas [261].

Ácido ascórbico

El ácido ascórbico es una vitamina esencial para el organismo, también denominada vitamina C, que se oxida de modo reversible hacia ácido deshidroascórbico. Es soluble en agua y se oxida con facilidad en disolución, especialmente expuesta al calor, acelerándose en presencia de hierro, cobre o pH alcalino. Se le dio el nombre químico de ácido ascórbico para designar su función preventiva del escorbuto.

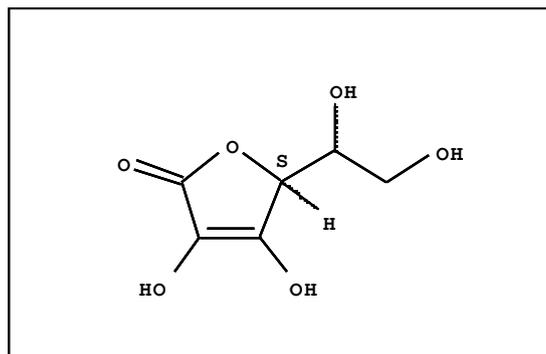


Figura II.23. Estructura del ácido ascórbico

El ácido ascórbico puede ser sintetizado a partir de glucosa y galactosa por las plantas y muchos mamíferos, pero no por el hombre, ya que carece de la enzima hepática necesaria para convertir L-gulonolactona en ácido L-ascórbico. Por lo tanto, tiene que tomarlo de los alimentos que lo contienen, siendo las mejores fuentes frutas y vegetales. Se absorbe en el intestino en un 90%.

El ácido ascórbico tiene múltiples funciones como coenzima o cofactor. Tiene una potente función antioxidante, protegiendo al organismo de los "radicales libres". Participa en la hidroxilación de la prolina para formar hidroxiprolina en la síntesis de colágeno, en la síntesis de hormonas esteroideas, en el metabolismo de lípidos y de algunos fármacos y aumentala absorción de hierro cuando ambos se ingieren juntos. También interviene en numerosas reacciones enzimáticas y, concretamente, en el transporte del hierro desde la transferrina plasmática a la ferritina del interior de los órganos. Es esencial para la oxidación de ciertos aminoácidos (fenilalanina y tirosina), en el metabolismo del triptófano y en la síntesis de noradrenalina. Tiene influencia sobre la actividad de los leucocitos, macrófagos, respuesta inmune y reacciones alérgicas. Ayuda en el desarrollo de dientes y encías sanos, así como en la cicatrización de heridas y fracturas.

Es una vitamina que se debe consumir diariamente, ya que no es liposoluble y no se puede almacenar para uso posterior, aunque las recomendaciones específicas dependen de la edad, género y otros factores (como puede ser

el embarazo). Se elimina a las tres horas de ingerirla, por lo que debe tomarse varias veces al día.

La deficiencia grave de vitamina C produce el escorbuto; sus síntomas son hiperqueratosis folicular, tumefacción e inflamación gingival, hemorragia en las encías, aflojamiento de los dientes, resequedad de la boca y los ojos, pérdida de pelo y piel seca, incluso conducir a la muerte. Por la deficiencia de colágeno, las heridas no cicatrizan, siendo además comunes alteraciones neuróticas.

Además de su participación en la nutrición, el ácido ascórbico suele emplearse como un antioxidante para proteger el sabor y color naturales de muchos alimentos, como fruta procesada, verduras y productos lácteos.

Determinación de ácido ascórbico

Debido a su gran importancia como vitamina fundamental para el organismo, se han descrito un gran número de métodos de determinación hasta la fecha. En los últimos años se han desarrollado numerosos trabajos empleando, principalmente, técnicas de detección electroquímicas [262-265].

También se han desarrollado métodos espectrofotométricos. Sin embargo, la determinación de este compuesto por medida directa de su absorbancia en la región UV es muy difícil de realizar, ya que normalmente se encuentra asociado a otras sustancias que también absorben en esta zona. Se han empleado reactivos que reaccionen con el ácido ascórbico y den lugar a productos que absorben a otra longitud de onda, evitando el solapamiento espectral con los posibles interferentes [266-268]; otra estrategias han sido el desarrollo de un optosensor en flujo continuo [269] o una extracción en fase sólida on-line [270]. También se han descrito métodos que emplean diferentes reactivo para producir compuestos fluorescentes y eliminar las posibles interferencias en la determinación de la vitamina C [271, 272]. Por último, se han empleado tanto la cromatografía líquida con detección por

espectrometría de masas [273], como la electroforesis capilar con detección electroquímica [274-276].

Riboflavina

La riboflavina, o vitamina B₂, es una vitamina hidrosoluble de color amarillo constituida por un anillo complejo de isoaloxacina al que se une el ribitol, un alcohol derivado de la ribosa.

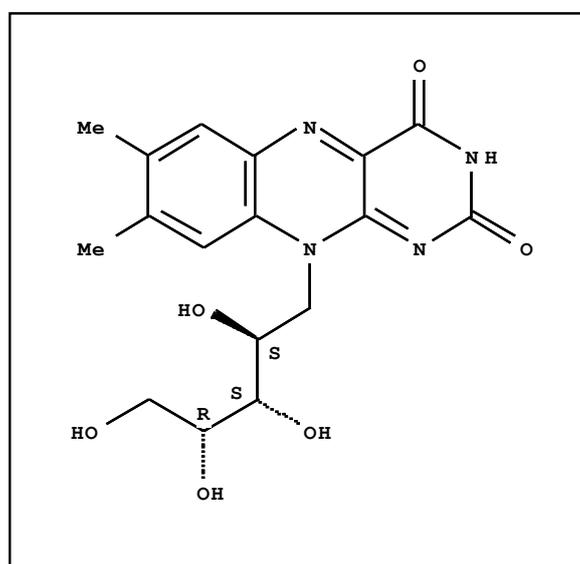


Figura II.24. Estructura de la riboflavina

La riboflavina se halla mayoritariamente combinada formando parte de dos coenzimas, el flavín adenín dinucleótido (FAD) y el flavín mononucleótido (FMN), denominados comúnmente coenzimas flavínicos, y como tales intervienen en los procesos enzimáticos relacionados con la respiración celular: reacciones de óxido-reducción de los glúcidos (ciclo de Krebs) y ácidos grasos (beta-oxidación).

La riboflavina es necesaria para la integridad de la piel, las mucosas y por su actividad oxigenadora de la córnea, imprescindible para la buena visión. Su presencia se hace más necesaria cuantas más calorías incorpore la dieta.

Sus fuentes naturales son las carnes y lácteos, cereales, levaduras y vegetales verdes.

Su carencia genera trastornos oculares, bucales y cutáneos, cicatrización lenta y fatiga. La carencia de vitamina B₂ puede ser causada por regímenes no equilibrados, alcoholismo crónico, diabetes, hipertiroidismo, exceso de actividad física, estados febriles prolongados, lactancia artificial, estrés, calor intenso y el uso de algunas drogas.

Las necesidades diarias de riboflavina son de 1.5 y 1.7 miligramos para niños y adultos respectivamente. Por otra parte, esta vitamina no es almacenada por el organismo, por lo que el exceso de consumo se elimina por vía urinaria.

Es una vitamina sensible a la luz solar y a ciertos tratamientos, como la pasteurización, proceso que hace perder el 20% de su contenido. La Unión Europea permite su empleo como aditivo alimentario.

Determinación de riboflavina

Se han desarrollado métodos espectrofotométricos para la determinación de riboflavina; sin embargo, al igual que con los anteriores analitos, se emplean distintas estrategias por el problema del solapamiento espectral, como son reacciones derivatizadoras [277] o tratamientos matemáticos [278-280]. Otros métodos se han basado en la medida de la fluorescencia de la vitamina en disolución [281] sobre un soporte sólido [282], su señal en la región NIR y tratamientos matemáticos [279] o la reacción quimioluminiscentes empleados distintos reactivos [283, 284].

Por otra parte, destacar el desarrollo de métodos empleando cromatografía de líquidos con detección fluorescente [285], quimioluminiscente [286] o por espectrometría de masas [273, 287] así como de métodos de

electroforesis capilar, en los que se han empleado métodos de detección fluorescentes [288, 289] y quimolumiscentes [290].

Piridoxina

La piridoxina, junto con el piridoxal y la piridoxamina, es uno de los tres compuestos que forman la denominada vitamina B₆. Se basa en un anillo de piridina, con sustituyentes hidroxilo, metilo e hidroximetilo. La vitamina B₆ es una vitamina hidrosoluble que se elimina por la orina y hay que reponer diariamente.

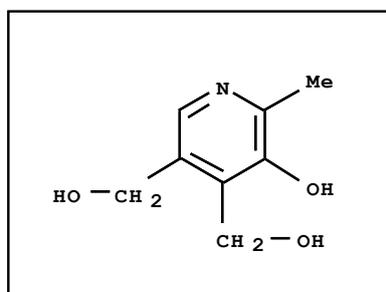


Figura II.25. Estructura de la piridoxina.

La piridoxina ayude al mantenimiento del equilibrio de sodio y potasio en el organismo, así como es vital para la formación de glóbulos rojos. Favorece la salud cardiovascular disminuyendo la formación de homocisteína. La piridoxina se transforma en el hígado a fosfato de piridoxal, que circula en el plasma unido a la albúmina. El fosfato de piridoxal actúa como coenzima en varias transformaciones metabólicas de los aminoácidos. Debido a ser precursor del fosfato de piridoxal, la piridoxina interviene en la síntesis de los neurotransmisores siguientes: ácido gammaaminobutírico, dopamina, serotonina, dopamina, noradrenalina y adrenalina.

La piridoxina se encuentra en la yema de los huevos, las carnes, el hígado, el riñón, los pescados, los lácteos, granos integrales, levaduras y frutas secas. La vitamina B₆ es muy frágil en lo que respecta a la conservación de

los alimentos. Los congelados disminuyen su contenido en un 40%, las conservas en un 45% y la molienda de cereales lo disminuye en un 70%.

La carencia de vitamina B₆ es muy rara debida a su abundancia, pero su carencia se puede ver reflejada en anemia, fatiga, depresión, disfunciones nerviosas, pseudoseborreas, boqueras, vértigo, conjuntivitis, nauseas y vómitos. Su carencia se puede producir por el consumo de ciertas drogas, mayor demanda metabólica durante el embarazo, errores del metabolismo o por consumo excesivo de proteínas.

Su ingesta por vías suplementarias en forma inadecuada puede llevar a reacciones como somnolencia y adormecimiento de miembros. Los requerimientos diarios promedio de vitamina B₆ son de 0.5 mg para niños y 1.6 mg para adultos.

Determinación de piridoxina

La determinación de piridoxina por espectrofotometría conlleva el problema de la existencia de interferencias espectrales por parte de otros compuestos presentes en la matriz. Por ello, se han descrito métodos que hacen uso de tratamientos estadísticos [291- 293] o el empleo de un soporte sólido para fijar la piridoxina [294, 295] y eliminar dichos interferentes. En el caso de realizar la determinación de la piridoxina por métodos fluorescentes, se requiere, de igual forma, eliminar la interferencia de posibles interferentes. Para ello se han llevado a cabo, fundamentalmente, tratamientos matemáticos [293, 296]. Recientemente se ha descrito un método que emplea detección potenciométrica [297].

En el caso de la cromatografía líquida, se han empleado como técnicas de detección la espectrofotometría [298, 299], la fluorescencia [300, 301] y la espectrometría de masas [273, 287]. También se ha descrito un método de cromatografía de gases empleando la espectrometría de masas como técnica de detección [302]. Por último, se han desarrollado diversos

métodos empleando electroforesis capilar con detección espectrofotométrica [303, 304], fluorescente [289] o espectrométrica de masas empleando resonancia de ion ciclotrón por transformada de Fourier [305].

Objetivos

II. Objetivos

El objetivo general del presente trabajo es el desarrollo y aplicación de nuevos enfoques y estrategias tendentes a incrementar la potencialidad, versatilidad y aplicabilidad de los optosensores luminiscentes basados en el empleo de soportes sensores comerciales ubicados en el interior de células de flujo convencionales tanto para fluorimetría como para espectroscopia UV-Visible (caso de sensores quimioluminiscentes).

Se prestará especial atención a los siguientes aspectos:

- Explorar la potencialidad de la implementación del principio de los optosensores con el de la multiconmutación, que aportará mayor automatización, reproducibilidad y menor consumo de reactivos y muestra. De igual forma, se pretende emplear el análisis por inyección secuencial (SIA), que también proporcionaría las características anteriormente mencionadas de la multiconmutación, proporcionando además mayor robustez al sistema.
- Implementar nuevas estrategias basadas en detección luminiscente, no empleadas hasta la fecha de comienzo de esta Memoria, en el desarrollo de optosensores en flujo continuo. De esta forma, se intentará conseguir desarrollar métodos más sensibles, selectivos y que requieran el empleo del menor número posible de reactivos.
- Aplicar los optosensores desarrollados a matrices complejas, como pueden ser alimentos o fluidos biológicos. Para ello se llevará a cabo el tratamiento de la muestra que sea necesario previamente al análisis.

Este trabajo pretende, por tanto, contribuir al desarrollo de métodos analíticos sencillos, que ofrezcan características analíticas atractivas en términos de sensibilidad, selectividad, reproducibilidad, etc. y a su vez resulten rápidos, económicos y versátiles, mostrando su aplicabilidad a

muestras reales en diversos campos (control ambiental, industrial, alimentario, clínico).

Parte del trabajo de esta Memoria se enmarca dentro de un proyecto de investigación financiado por el Ministerio de Educación y Ciencia, "*Aplicación de nuevas estrategias en el desarrollo de sensores espectroscópicos multiparámetro en flujo continuo*" (BQU-2002-02872; período de ejecución Noviembre 2002 – Abril 2006).

Antecedentes

III. ANTECEDENTES

Los primeros optosensores en flujo descritos datan de mediados de los años ochenta y sus primeras aplicaciones estaban enfocadas fundamentalmente a la determinación espectrofotométrica de cationes inorgánicos [306, 307] a nivel de trazas utilizando reactivos cromogénicos. Después se desarrollaron otros optosensores en flujo sencillos para la determinación de analitos orgánicos, como principios activos y pesticidas, que estaban basados en la medida de una propiedad intrínseca del analito como su absorción UV o fluorescencia [308].

En los últimos años se han propuesto otras técnicas de detección espectroscópicas, como la luminiscencia sensibilizada por lantánido [87], quimioluminiscencia [309], fosforescencia [310], espectroscopia IR [29], Raman [96] y fluorescencia inducida fotoquímicamente (PIF) [82], aunque la espectroscopia de absorción molecular y la fluorescencia siguen siendo las técnicas más usadas. La siguiente figura ilustra la proporción de uso de cada una de estas técnicas de detección:

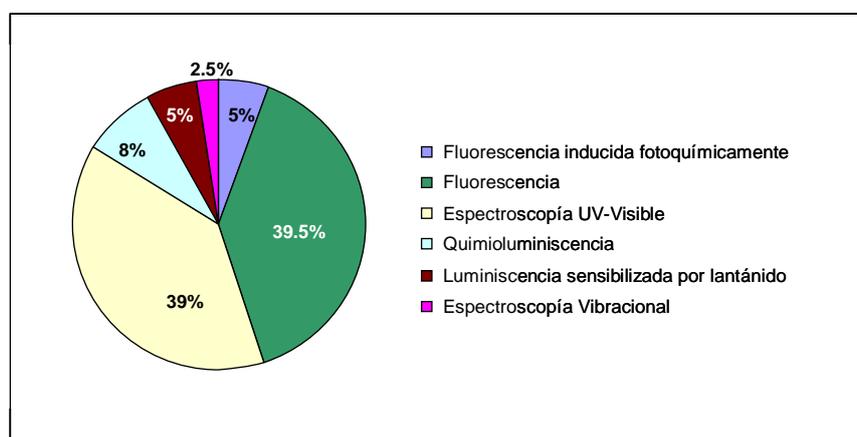


Figura IV.1. Proporción (%) entre los distintos tipos de técnicas de detección que se utilizan en optosensores en flujo continuo.

El amplio rango de aplicación de la espectroscopia de absorción molecular ha hecho que sea, junto con la fluorescencia, la técnica de detección más utilizada en el desarrollo de sensores. La escasa selectividad que muestra

esta región en sistemas en disolución homogénea es su hándicap más importante. No obstante, se consigue una considerable mejora en la selectividad en los optosensores debido a la retención selectiva del analito (o el producto de reacción) sobre un soporte sólido, y a su consecuente aislamiento de la matriz en la que se encuentra.

La fluorescencia molecular es también una técnica de detección ampliamente utilizada. Esto se debe a que su alta selectividad y sensibilidad se ven potenciadas por la preconcentración y retención selectiva del analito (o producto de reacción) sobre un soporte sólido adecuado, presentando de esta forma características analíticas más interesantes aún que la espectroscopia de absorción molecular.

En los últimos años el desarrollo de los optosensores en flujo ha tenido un gran auge, siendo un área de investigación muy prometedora conducente a métodos analíticos simples y baratos, con características analíticas muy destacadas en relación con los respectivos métodos espectroscópicos convencionales (sobre todo en sensibilidad y selectividad). El creciente número de trabajos publicados en las últimas décadas sobre desarrollo y aplicaciones de este tipo de optosensores en flujo es un claro índice de la vitalidad de esta área de investigación. Prueba del gran desarrollo de esta metodología es el número creciente de publicaciones relativas a este tipo de sistemas. Así, más de 100 artículos referentes a optosensores en flujo continuo han sido publicados en los últimos 5 años (2003 – 2007). La Figura IV.2. muestra la evolución del número de optosensores descritos en revistas del "Journal Citation Report" (JCR).

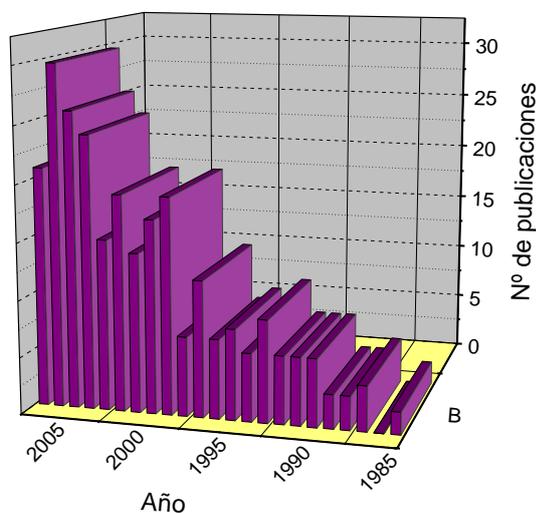


Figura IV.2. Publicaciones de optosensores en flujo continuo en revistas incluidas en el "Journal Citation Report" en el periodo 1985-2007.

Por otra parte, son muchas y variadas las matrices en las que se ha llevado a cabo la determinación de diferentes especies mediante optosensores en flujo. En la Figura IV.3. se recogen los datos de las aplicaciones más comunes en el período anteriormente citado.

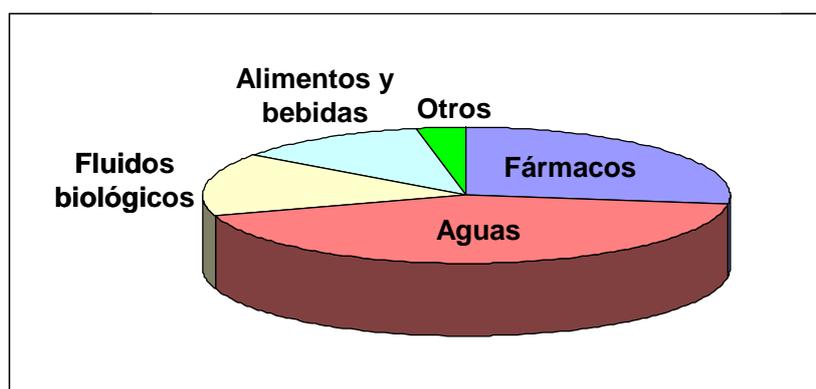


Figura IV.3. Proporción (%) entre los distintos tipos de matrices donde se llevan a cabo las aplicaciones de los optosensores en flujo continuo.

En el gráfico anteriormente citado puede observarse como la gran mayoría de las aplicaciones se han centrado en fármacos, fluidos biológicos y agua. Las especies analizadas pertenecen a un abanico muy amplio de compuestos, entre los que se pueden destacar cationes [97], preparados farmacéuticos [74], pesticidas [81], contaminantes orgánicos [311], aniones [312] y cationes [313] entre otros:

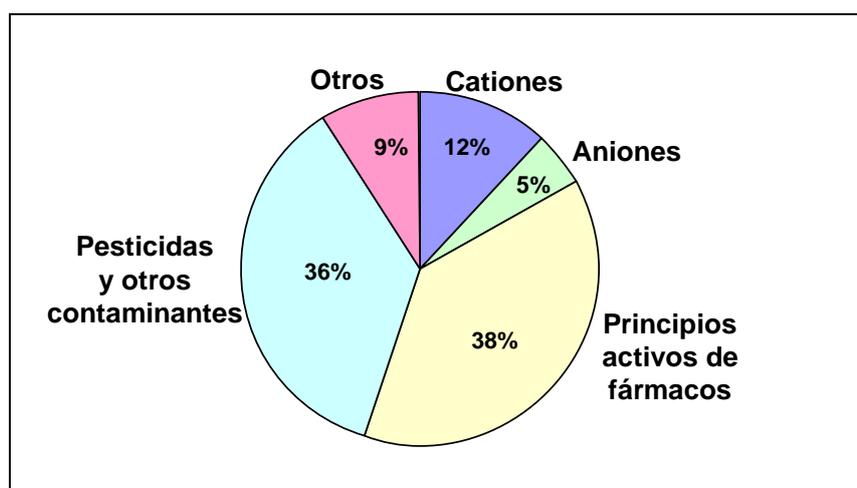


Figura IV.4. Proporción (%) entre los distintos tipos de analitos que se determinan en optosensores en flujo continuo.

La mayor parte de los optosensores en flujo descritos hasta la fecha son del tipo monoparámetro, es decir, responden sólo a un determinado analito, siendo escasos los optosensores multiparámetro, también llamados "multisensores", que son aquellos que permiten la detección de más de un analito. La razón de esto es que su desarrollo es de mayor complejidad que el de los sensores monoparámetro. La determinación de dos o más analitos sobre una misma muestra puede ser secuencial (varias inyecciones de muestra) o simultánea (una sola inyección). En el caso de llevar a cabo una sola inyección se puede usar un detector que permita multidetección simultánea (como por ejemplo un detector de diodo array) o un tratamiento quimiométrico de la señal [314], o separar los analitos previamente a la detección, usando un soporte sólido adicional antes del detector [248]. En otros multisensores se realiza la determinación secuencial de los analitos,

llevando a cabo tantas inyecciones de muestra como analitos se quieren determinar [315].

Son muy escasos los multisensores descritos en bibliografía, pudiéndose clasificarse según se realice o no una separación de los analitos previa a su determinación:

- Multisensores sin secuenciación temporal

Esta estrategia se emplea cuando los analitos no pueden separarse o diferenciarse mediante un dispositivo de separación en línea, antes de alcanzar la zona sensora. En este caso, el bolo de muestra avanza por la zona sensora haciéndose la adquisición espectral periódica a su paso por el detector. Se emplea un sistema de ecuaciones a partir de los datos registrados a distintas longitudes de onda, o bien calibración multivariante mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) [314].

- Multisensores con secuenciación temporal

Esta modalidad se basa en la separación sucesiva en línea de los analitos: uno alcanza el detector y desarrolla una señal transitoria, mientras la(s) otra(s) especie(s) son retenidas fuertemente en una precolumna, que puede encontrarse antes del detector [248] o bien integrada en la propia célula de flujo, mediante una cantidad adicional de soporte sólido en la misma [81]. Después se hacen pasar uno o varios eluyentes adicionales, que transportan las especies retenidas en la precolumna hacia la zona sensora, y generan también la correspondiente señal transitoria en el detector. Obviamente, la optimización de la longitud de la columna es fundamental para conseguir la adecuada separación.

Multiconmutación para el desarrollo de optosensores

Las características fundamentales de los sistemas basados en multiconmutación han sido apuntadas en el Capítulo II de esta Memoria. El empleo de multiconmutación para el desarrollo de métodos automáticos con detección en disolución mediante técnicas espectroscópicas está descrito en la literatura [61, 62]. En cambio, el desarrollo de optosensores en flujo empleando multiconmutación ha sido descrito en un trabajo de nuestro grupo en colaboración con el grupo del Prof. De la Guardia de la Universidad de Valencia [294]. En esta Memoria se ha continuado con esa línea de trabajo y se han desarrollado cinco nuevos métodos basados en optosensores en flujo empleando multiconmutación.

Análisis por inyección secuencial para el desarrollo de optosensores

Las características de los sistemas que emplean análisis por inyección secuencial (SIA) han sido descritas anteriormente en el Capítulo II de esta Memoria. La metodología SIA se ha empleado anteriormente para el desarrollo de optosensores con regeneración de la fase sensora [317], su empleo en el desarrollo de optosensores en flujo continuo sin regeneración de soporte sólido no ha sido empleado hasta la fecha. En esta Memoria se han desarrollado cuatro optosensores empleando el análisis por inyección secuencial, empleándose en uno de ellos dos técnicas de detección diferentes para la determinación de los analitos.

Discusión de resultados

IV. DISCUSIÓN CONJUNTA DE RESULTADOS

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

1. REACTIVOS E INSTRUMENTACIÓN

Para todos los experimentos realizados en esta Memoria se usaron reactivos de calidad "para análisis", disolventes puros y agua desionizada. Las disoluciones estándar de los analitos fueron preparadas disolviendo una cantidad apropiada en metanol, etanol o agua desionizada según las características concretas de cada analito. De igual forma, siempre se emplearon precisiones de 0.1 mg en la pesada y material de vidrio volumétrico para la preparación de todas las disoluciones.

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

1. Sistema de propulsión
2. Sistema de inserción de muestra y selección/manipulación de reactivos
3. Sistema de transporte (y reacción)
4. Sistema de detección

Sistema de propulsión

En todos los métodos desarrollados con sistemas de válvulas rotatorias y válvulas solenoides se empleó una bomba peristáltica de cuatro canales "Gilson Minipuls 3" (Villiers Le Bel (Francia)), que consta de un tambor y una serie de rodillos que comprimen unos tubos flexibles a través de los cuales circula el flujo del sistema. Esta bomba tiene control de velocidad para seleccionar el flujo de los canales y proporciona un flujo libre de pulsos. Ver Figura II.4 (Sección 2.2).

Para los métodos SIA desarrollados, se usaron dos sistemas de propulsión diferentes:

- A. Para los sensores desarrollados para paracetamol y labetalol se usó un equipo comercial FIALab® 3500 (FIALab® Instruments, USA) que disponía de una bomba con pistón y jeringa (capacidad de 5 ml). La bomba impulsora se controlaba por medio de la última versión del programa FIALab para Windows.
- B. Para el resto de sensores: Una bomba Cavro XP 3000 (Cavro Scientific Instrument, Sunnyvale, California, USA) compuesta por un pistón y una jeringa con una capacidad de 5 ml. Por medio del pistón se aspiran o impulsan las disoluciones requeridas (los procesos se controlaban por ordenador mediante el software para Windows Sagittarius version 3.0.25, desarrollado en la Universidad de Viena).

Sistemas de inserción de muestra y selección/manipulación de reactivos

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

La válvula de inyección tiene dos posiciones, llenado e inyección. En la primera se llena el bucle de muestra y en la segunda posición lo inserta en el seno de la corriente de portador, como se mostró en la Figura II.5 (Sección 2.2).

Por otra parte, la válvula rotatoria conectada como válvula de selección permite elegir generalmente entre las corrientes de portador y eluyente. Un esquema se muestra en la Figura V.1.

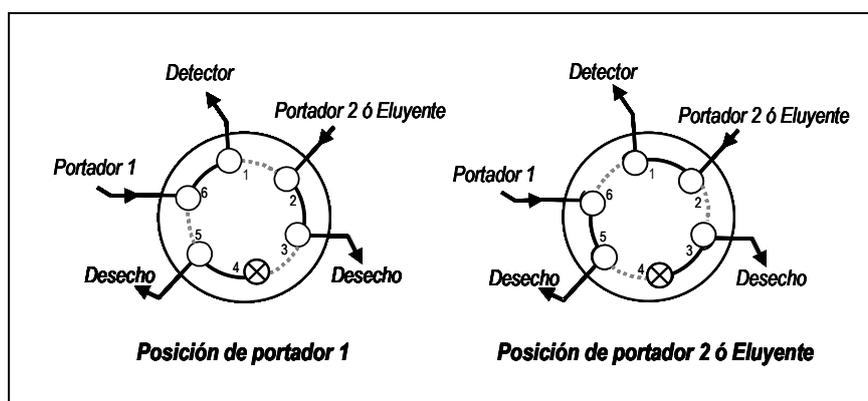


Figura V.1. Esquema de una válvula rotatoria conectada como válvula de selección

B) En el caso de los sistemas basados en "multiconmutación", la inserción de muestra y manipulación de reactivos se lleva a cabo mediante el empleo de válvulas solenoide de tres vías NResearch 161T031 Standard 3w (Neptuno Research, MA, USA) que están conectadas de forma apropiada para llevar a cabo las distintas etapas (inserción de muestra, elución de la especie de interés, re-acondicionamiento de la zona sensora, etc) establecidas en el método.



Figura V.2. Fotografía de válvulas solenoide de tres vías.

Estas válvulas de tres vías tienen dos posiciones: "ON" y "OFF". Según las disoluciones se aspiren o impulsen, las válvulas presentarán dos entradas y una salida o una entrada y dos salidas. El esquema para el caso de impulsar las disoluciones (usado en el desarrollo de todos los sistemas aquí descritos) puede observarse en la Figura II.8 (Sección 3.2). Las válvulas se controlan mediante el software a través de una interfase RS232 vía puerto paralelo. Dicha interfase permite el control de hasta 8 válvulas, merced a un circuito integrado ULM 2803. La corriente de alimentación de cada válvula (100 mA) es proporcionada por una pequeña fuente de alimentación de corriente continua de 12 V y 1 A.

El ciclo de apertura y cierre de las válvulas solenoide que se emplean en cada sistema es programado a través de un software elaborado por nuestro grupo de investigación en colaboración con D. Javier Molina Magaña.

C) En el caso de los sistemas SIA desarrollados se usaron dos sistemas diferentes:

C.1) El equipo comercial FIALab® 3500 anteriormente descrito, que disponía de una válvula multiposición Cheminert de 8 vías ((Valco Instrument Co. Inc., Houston, Texas, USA) para los sensores de paracetamol y labetalol. Este equipo se controlaba por medio de la última versión del program FIALab para Windows.

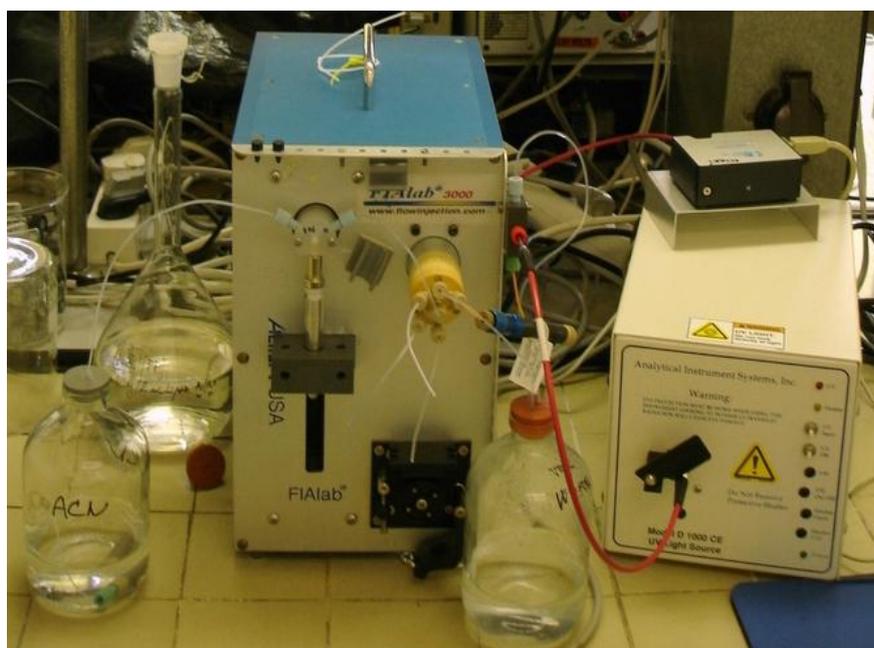


Figura V.3. Fotografía del equipo FIALab® 3500.

C.2.) Una válvula multiposición de 10 vías de Valco (Valco Instruments Co. Inc., Houston, Texas, USA) para el resto de sensores. La válvula se controlaba por medio del software Sagittarius version 3.0.25 (bajo sistema Windows) desarrollado en la Universidad de Viena. En la Figura V.4. puede observarse una fotografía de dicha válvula junto con la bomba de pistón Cavro XP 3000 .

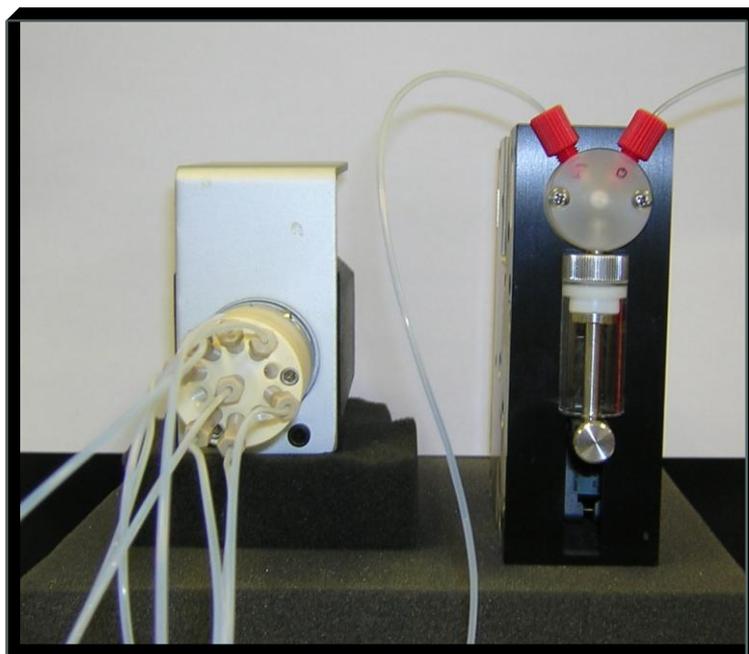


Figura V. 4. Fotografía del sistema SIA compuesto por una válvula multiposición de diez vías Valco y una bomba Cavro XP 3000.

Sistema de transporte

En todas las configuraciones se usaron tubos de teflón de 0.8 mm de diámetro interno como sistema de transporte. Las uniones se realizaron con conectores tipo OMNIFIT.

En el caso de los sistemas FIA desarrollados (ya sea usando válvulas rotatorias o solenoides) los tubos de bomba de silicona utilizados fueron de dos tipos, dependiendo del tipo de disolución portadora empleada. En los casos en los que los portadores eran disoluciones acuosas, se utilizaron tubos Kendall de diámetro interno 0.051 pulgadas. Sin embargo, cuando se emplearon disolventes orgánicos (metanol) como portador se utilizaron tubos de teflón Elkay con el mismo diámetro interno.

Sistema de separación: En los casos en los que hay que realizar una separación de una mezcla de analitos, es necesario introducir un elemento adicional en el sistema de transporte para conseguir este objetivo, como es el caso del sensor desarrollado para la determinación de una mezcla de tres

pesticidas (carbendazima, carborfurano y benomilo); se empleó una precolumna empaquetada con soporte sólido para conseguir la separación de los tres analitos en función de su cinética de retención/elución. Se usó una columna de vidrio, de 1.5 mm de diámetro interno y 5.5 cm de longitud, rellena con 55 mg de soporte sólido para llevar a cabo la separación (C₁₈ silica gel). De igual forma, también se utilizó una precolumna con 20 mg de resina Sephadex SPC-25 para el sensor biparámetro de furosemida y triamtereno.

Sistema de detección

Los once sensores de esta Memoria utilizan detección luminiscente, pero hay que distinguir la utilización de varios instrumentos diferentes:

A) Para detección luminiscente sensibilizada con terbio y detección fluorescente (salvo en el caso del paracetamol y el labetalol): se empleó un espectrofluorímetro "Varian Eclipse" (Mulgrave, Australia) con lámpara de descarga de Xenón de 75 kW, monocromadores Czerny-Turner, tubo fotomultiplicador R-928. El equipo estaba controlado mediante software "Cary Eclipse" para sistemas Windows 95/98/NT. El espectrofluorímetro empleado se caracteriza por poseer una velocidad de barrido espectral muy elevada (hasta 24000 nm min⁻¹). Esto permite llevar a cabo medidas de fluorescencia con gran rapidez, e incluso monitorizar hasta 5 pares de longitudes de onda de excitación/emisión de forma "cuasi" simultánea, en el modo "multi-λ". Con el uso de este equipo la cubeta empleada fue una célula de flujo "Hellma 176.052-QS" (o "Hellma 176.752-QS") para espectrofluorimetría colocada dentro del compartimento de detección.



Figura V.5. Fotografía del espectrofluorímetro "Varian Eclipse".

B) Para los sensores fluorescentes de paracetamol y labetalol se empleó un detector con fibra óptica PMT-FL (Ocean Optics, Inc., USA). La fuente de luz ultravioleta fue un módulo D-1000-CE (Edmund Industry Optic, GmbH, Germany). Como cubeta se usó la célula de flujo "Hellma 176.752-QS".

C) En el caso de detección quimioluminiscente se empleó un luminómetro desarrollado en nuestro laboratorio. El módulo fotosensor H8249-101 se obtuvo de Hamamatsu (sales.hamamatsu.com) y consistía en un tubo fotomultiplicador de 28 mm de diámetro, un circuito de alimentación de alto voltaje y un amplificador de bajo ruido, con una respuesta espectral entre 185 y 900 nm. Los datos se registraron utilizando el software VI Data Logging (Nacional Software). En este caso se empleó una célula de flujo Hellma 138-QS adherida al módulo fotosensor.

2. ESTUDIOS PRELIMINARES.

Teniendo en cuenta que los sensores aquí desarrollados conllevan detección óptica, para comenzar el desarrollo de cada sensor es necesario estudiar las características espectrales de los analitos (o de los productos de reacción) que originan la señal analítica. Se realizaron los espectros de luminiscencia

en disolución y en fase sólida para estudiar las condiciones más adecuadas para la detección de las especies de interés. Dentro de este apartado vamos a dividir los optosensores desarrollados en función de la técnica de detección empleada:

2.1. Detección fluorescente

Para estudiar el espectro de fluorescencia en fase sólida en un sistema de flujo continuo se inserta la muestra conteniendo el analito y, una vez que la señal de fluorescencia de éste es máxima, se detiene el sistema de flujo para poder registrar los espectros de excitación y emisión del analito retenido sobre el soporte sólido. Los sensores desarrollados con detección fluorescente fueron:

A) Sensor triparámetro para la determinación de **carbendazima**, **carbofurano** y **benomilo**: Se registraron los espectros de excitación y de emisión, tanto en disolución como en fase sólida, en medio ácido, empleando una disolución acuosa de HCl 1.5 M. Las longitudes de onda excitación/emisión óptimas en fase sólida fueron 270/301 nm para la carbendazima y el carbofurano y 293/398 nm para el benomilo.

B) Sensor biparámetro para la detección de **furosemida** y **triamtereno**. Las longitudes de onda óptimas se escogieron tras realizar los espectros con los analitos retenidos sobre el soporte seleccionado, Sephadex SPC-25. Las longitudes de onda excitación/emisión óptimas fueron 273/415 nm para la furosemida y 360/436 nm para el triamtereno. En la Figura V.6 puede observarse el solapamiento en las longitudes de onda; éste fue el motivo de que la separación de ambos analitos fuera necesaria para su determinación.

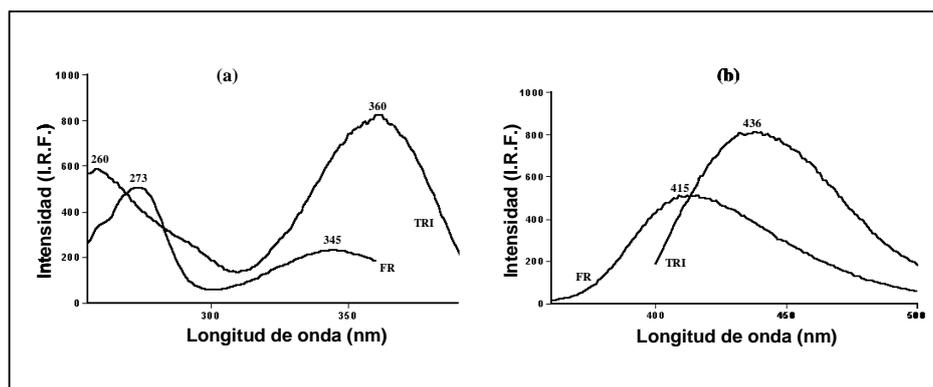


Figura V.6. Espectros de a) Excitación y b) Emisión para furosemida (FR) y triamtereno (TRI).

C) Sensor biparámetro para la determinación de **fuberidazol** y **orto-fenilfenol**. Las longitudes de onda de excitación/emisión escogidas, tras realizar los espectros sobre el soporte sólido, gel de sílice C_{18} , fueron 314/356 y 250/345 nm para fuberidazol y orto-fenil fenol respectivamente.

D) Sensor monoparámetro para la determinación de **bitertanol**. En este caso el soporte sólido escogido fue también gel de sílice C_{18} , y las longitudes de onda óptimas tras realizar los espectros de excitación y emisión fueron 261 y 325 nm respectivamente

E) Sensor monoparámetro para la determinación de **labetalol**. Las longitudes de onda excitación/emisión óptimas fueron 300 y 495 nm respectivamente (fase sólida: gel de sílice C_{18}). En este caso se hizo uso de filtros, tanto para la excitación como para la emisión. Los filtros más adecuados fueron de 340 (300-380) y 435 (390-510) nm como filtros primario (excitación) y secundario (emisión) respectivamente.

F) Sensor monoparámetro para la determinación de **paracetamol**: En este caso no se mide la fluorescencia nativa del analito, sino la fluorescencia de su producto de reacción tras una reacción derivatizadora en medio ácido con nitrito. Es por tanto que los espectros de excitación y emisión se realizaron para el producto de reacción una vez retenido sobre el soporte

sólido, una resina de intercambio aniónico Sephadex QAE-A-25. Las longitudes de onda óptimas observadas fueron 325 y 430 nm para excitación y emisión respectivamente. En este caso, al igual que en el anterior, se usaron filtros para seleccionar ambas longitudes de onda; los filtros usados fueron de 340 (300-380) nm como filtro primario y de 435 (390-510) nm como filtro secundario.

G) Sensor multiparámetro para la determinación de **piridoxina, riboflavina y ácido ascórbico**. En este caso se desarrolló un doble sensor luminiscente, empleando la fluorescencia para la determinación de piridoxina y riboflavina y la quimioluminiscencia para la determinación del ácido ascórbico. En el caso de la detección fluorescente de ambas vitaminas, se realizaron los espectros en fase sólida de ambos analitos (gel de sílice C₁₈) y se escogieron 450/519 y 294/395 nm como longitudes de onda óptimas para piridoxina y riboflavina respectivamente.

2.2. Detección luminiscente sensibilizada por lantánido

En los sensores que se describirán a continuación se empleó la luminiscencia sensibilizada por lantánido, haciendo uso del ión terbio. De igual forma que para la detección fluorescente, se realizaron los espectros de excitación y emisión para los complejos formados por el analito y el ión terbio una vez retenidos sobre el soporte sólido. En todos los sensores desarrollados se escogió un tiempo de retardo de 0.1 ms.

Como ya se comentó con anterioridad, en la luminiscencia sensibilizada por lantánido la emisión es producida por el ión terbio; las tres bandas características de emisión se observan a 490, 545 y 590 nm, correspondiendo a las transiciones $^5D_4 \rightarrow ^7F_6$, $^5D_4 \rightarrow ^7F_5$ y $^5D_4 \rightarrow ^7F_4$ respectivamente. La segunda transición, es decir, la correspondiente a 545 nm, es la más intensa y, por tanto, es siempre la elegida para este tipo de detección.

Los sensores desarrollados empleando esta técnica de detección fueron:

A) Sensor monoparámetro para la determinación de **norfloxacino**. Tras realizar los espectros de excitación y emisión del complejo norfloxacino-terbio sobre gel de sílice C_{18} , se observó que las longitudes de onda óptimas eran 273 y 545 nm para excitación y emisión respectivamente.

B) Sensor monoparámetro para la determinación de **ácido pipemídico**. En la Figura V.7 se puede observar que el complejo ácido pipemídico-terbio tiene dos bandas de excitación. A pesar de que la banda situada a 270 nm es más intensa, se escogió la banda de 320 nm; esto se debe a que la señal neta (señal del complejo menos señal del blanco, es decir, sólo terbio) era mayor escogiendo esta última longitud de onda. Por consiguiente, las longitudes de onda escogidas como óptimas fueron 320 y 545 nm para excitación y emisión respectivamente.

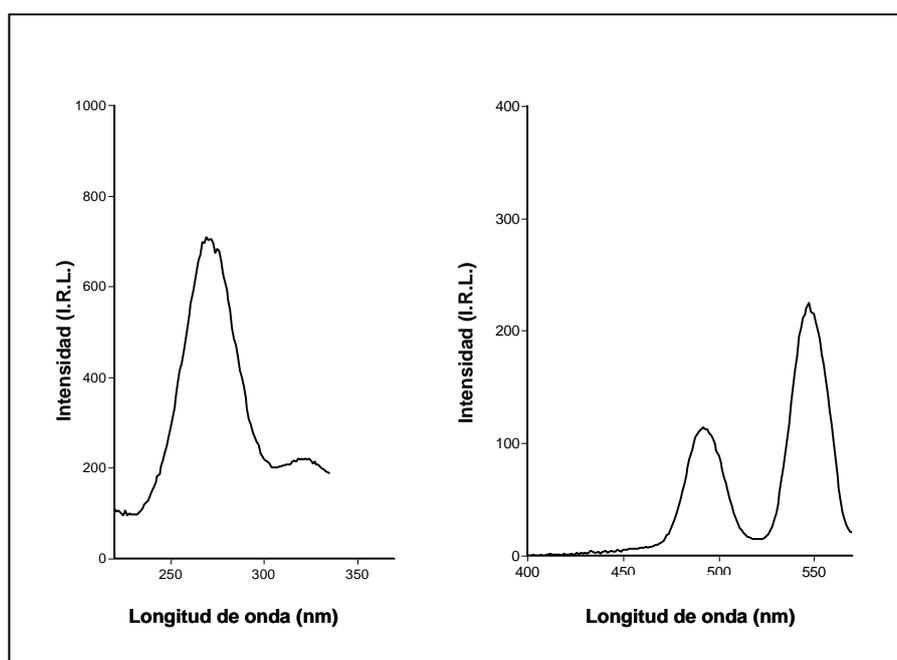


Figura V.7. Espectros de excitación y emisión para el complejo ácido pipemídico-terbio.

C) Sensor monoparámetro para la determinación de **ácido salicílico**. Tras registrar los espectros del complejo ácido salicílico-terbio retenido sobre el

soporte sólido gel de sílice C₁₈, se seleccionaron las longitudes de onda óptimas, 300 y 545 nm para excitación y emisión respectivamente.

2.3. Detección quimioluminiscente

La detección quimioluminiscente se ha empleado en dos sensores desarrollados en esta Memoria. Sin embargo, como dicha técnica de detección no requiere excitar a ninguna longitud de onda, no fue necesario realizar los espectros de excitación y emisión como en los casos anteriores. Esta técnica se empleó en los siguientes sensores:

A) Sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico.

B) Sensor monoparámetro para la determinación de ácido ascórbico. En este caso se desarrolló un doble sensor luminiscente, empleando la fluorescencia para la determinación de piridoxina y riboflavina (como se comentó anteriormente) y la quimioluminiscencia para la determinación del ácido ascórbico.

3. CONFIGURACIÓN DEL SISTEMA DE FLUJO EMPLEADO Y PROCEDIMIENTO GENERAL

Los trabajos desarrollados en esta Memoria implican la integración de la espectroscopia en fase sólida con un sistema en flujo (FIA convencional, multiconmutación o SIA). La configuración del sistema en cada uno de los casos vendrá determinada por diversos factores, como técnica de detección, número de analitos, proceso de elución, etc.

En este apartado vamos a clasificar los sensores desarrollados en función del sistema de introducción de las disoluciones empleado: Sistema FIA

convencional (válvulas rotatorias), sistema de multiconmutación (válvulas solenoides) y sistema SIA.

3.1. Optosensores desarrollados empleando válvulas rotatorias de seis vías

Se desarrollaron dos optosensores empleando esta metodología: Un sensor triparámetro fluorescente para la determinación de tres pesticidas (benomilo, carbendazima, carbofurano) y un sensor monoparámetro empleando luminiscencia sensibilizada por lantánido para la determinación de un principio activo, norfloxacino.

A) El desarrollo del optosensor triparámetro se base en el empleo de un dispositivo de separación en el sistema de flujo, situado justo antes de la célula de detección. Se utilizó una precolumna de vidrio empaquetada con el mismo soporte sólido que la célula de medida (gel de sílice C₁₈). Esta columna permitía, en función de la diferente cinética de retención/elución de los analitos, la retención transitoria de carbofurano y benomilo, mientras que la carbendazima llega a la zona sensora donde se detecta por medida de su fluorescencia nativa, originando una señal transitoria. Posteriormente, mediante el empleo de dos válvulas de selección, se procede a la elución secuencial de las dos especies restantes retenidas en la precolumna mediante el empleo sucesivo de dos eluyentes apropiados, llegando asimismo a la zona sensora y desarrollando sus señales transitorias respectivamente. En la Figura V.8 se muestra la configuración FIA monocal empleada en este sensor.

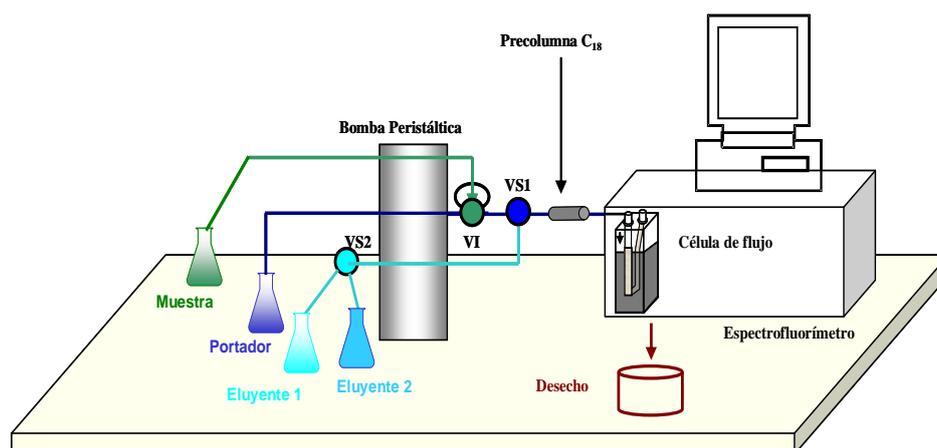


Figura V.8. Configuración del sistema FIA para la determinación simultánea (mediante una sola inyección de muestra) de la mezcla benomilo, carbofurano y benomilo. VI: válvula de inyección; VS1 y VS2: válvulas de selección.

En este caso se emplea como portador una disolución de metanol:agua desionizada al 15 % (v:v), que actúa como portador y eluyente de la carbendazima y que está circulando a través del sistema de forma continua. La solución de muestra (en HCl 1.5 M; volumen 2 ml) conteniendo la mezcla ternaria de analitos, se introduce en el sistema mediante la válvula de inyección y es impulsada hacia la célula de flujo a 1 ml/min. Como se ha comentado anteriormente, los tres pesticidas son separados en la precolumna. Una vez obtenida la señal correspondiente a la carbendazima en la zona sensora, y mediante el giro de la válvula de selección 1, el carbofurano es eluido de la precolumna y transportado hacia la zona sensora mediante una solución eluyente metanol:agua al 40 % (v:v). Una vez obtenida la señal analítica del carbofurano, se gira la válvula de selección 2, introduciendo en el sistema una disolución eluyente metanol:agua al 70 % (v:v), que eluye el benomilo de la precolumna y lo transporta hacia la zona de detección, desarrollando su correspondiente señal analítica; este segundo eluyente produce también la completa regeneración del soporte sólido. Por último, se gira de nuevo la válvula de selección 1, se recupera la línea base y el sensor queda preparado para la siguiente muestra. En la Figura V.9. se muestra un diagrama típico de la determinación simultánea de benomilo, carbofurano y carbendazima.

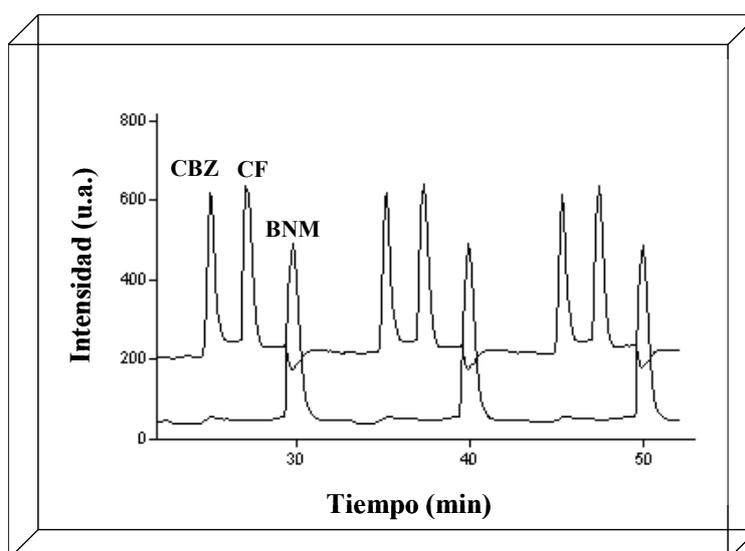


Figura V.9. *Figrama típico del optosensor triparámetro para la determinación de carbendazima (CBZ), carbofurano (CF) y benomilo (BNM) con concentraciones de 1400, 2500 y 1900 ng ml⁻¹ respectivamente, empleando un volumen de inyección de muestra de 2000 µl.*

B) En el caso del sensor monoparámetro para la determinación de **norfloxacino** fue necesario realizar la confluencia de la muestra (en tampón ácido acético/acetato sódico 0.1 M a pH 5.6) con una disolución conteniendo terbio (4×10^{-3} M) previamente a su inserción en la corriente de portador. La mezcla muestra-terbio se introduce en el sistema haciendo girar la válvula de inyección y el complejo norfloxacino-terbio es transportado hacia la zona de detección por medio de la disolución portadora, tampón ácido acético/acetato sódico 0.1 M a pH 5.6. Una vez que el complejo desarrolla su máxima señal analítica, y teniendo en cuenta su fuerte retención sobre el soporte sólido gel de sílice C₁₈, es necesario emplear una disolución eluyente adicional (1 ml de ácido etilendiamintetraacético 0.08 M) para lograr la completa regeneración del soporte sólido; esto se consigue girando la válvula de elución, formándose un complejo ternario aniónico y regenerándose el sensor, permaneciendo preparado para una nueva inserción de muestra. En la Figura V.10 se muestra el sistema de flujo empleado.

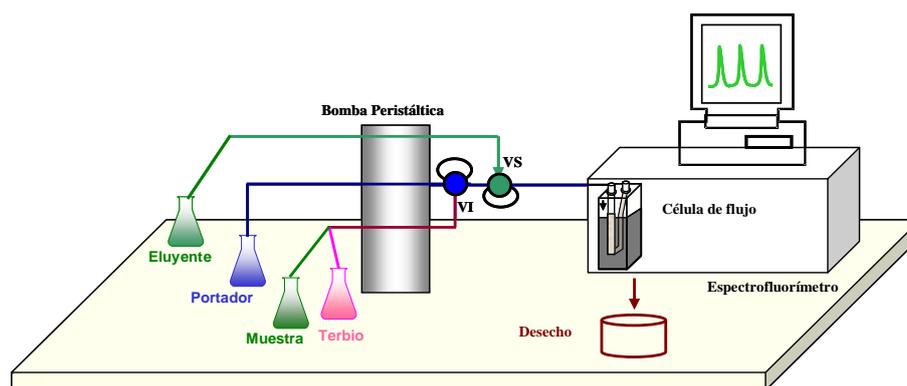


Figura V.10. Configuración del sistema FIA para la determinación de norfloxacin. V.I.: Válvula de inyección; V.S.: Válvula de selección.

3.2. Optosensores desarrollados empleando un sistema de multiconmutación.

En todos los sensores desarrollados empleando multiconmutación se utilizan válvulas solenoides de tres vías. A continuación se describen los sistemas empleados.

A) En el sensor biparámetro para la determinación de **furosemida y triamtereno** (Figura V.11) se empleó una precolumna de vidrio rellena del mismo soporte sólido que la célula de flujo (Sephadex SPC-25) para, en función de la distinta cinética de retención/elución de los analitos, lograr su separación previamente a la llegada a la zona de detección. Al principio, todas las válvulas están desactivadas y el portador, 2×10^{-2} M HCl, está circulando a través de todo el sistema; todas las demás disoluciones son recirculadas a sus correspondientes recipientes. La muestra, preparada también en 2×10^{-2} M HCl, se introduce en el sistema activando simultáneamente las válvulas V_1 y V_2 durante 50 s. La furosemida pasa a través del soporte sólido de la precolumna y desarrolla su señal analítica en la zona de detección, siendo eluida por el propio portador, mientras que el triamtereno queda fuertemente retenido en la precolumna. A continuación, se activan las válvulas V_2 y V_4 durante 150 s. y la disolución eluyente (tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$; 0.12 M, pH 6.5) produce la desorción del

triamtereno del soporte sólido, transportándolo hasta la célula de flujo, donde producirá su señal analítica y será a su vez eluido, quedando el soporte sólido completamente regenerado. Por último, tras cada inserción de muestra, se procede a una rápida etapa de limpieza para evitar contaminación entre muestras.

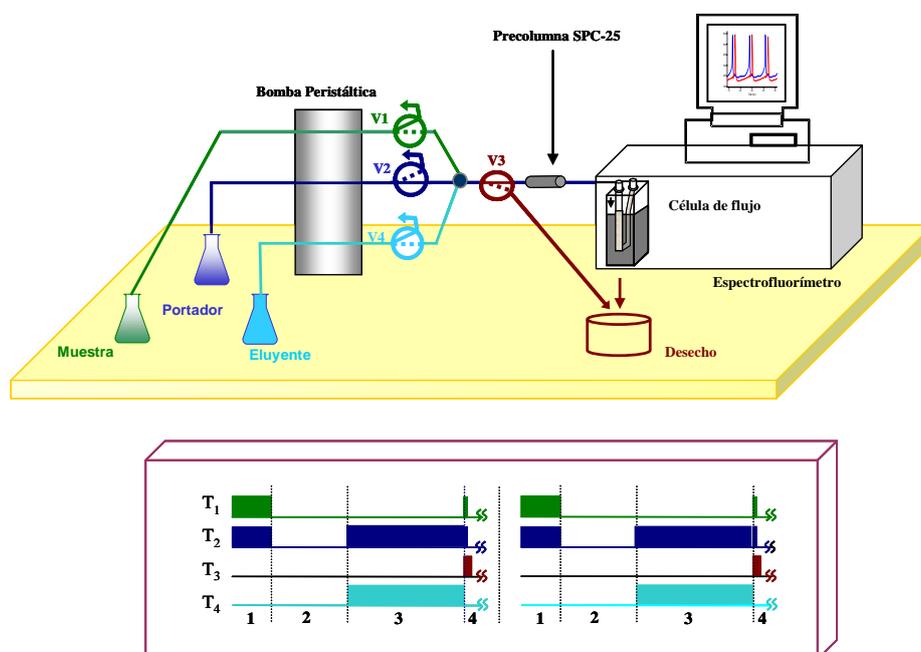


Figura V.11. Configuración del sistema multiconmutado para la determinación de furosemida y triamtereno. Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías.

B) En el sensor monoparámetro desarrollado para la determinación de **ácido pipemídico** se empleó detección luminiscente sensibilizada con terbio. Es por ello que, al igual que el sensor anteriormente descrito para la determinación de norfloxacin, es necesaria una confluencia entre la disolución conteniendo al analito y una disolución de terbio. El portador utilizado en este sistema fue una disolución tampón ácido acético/acetato sódico (0.15 M, pH 5.6) y la disolución de muestra se preparó en 10^{-2} M HCl. El sistema empleado se puede observar en la Figura V.12. Para la introducción de muestra (y confluencia con la disolución acuosa de terbio 4×10^{-3} M) se activaban simultáneamente las válvulas 1, 2 y 3 durante 50 s. El complejo ácido pipemídico-terbio era así transportado hasta la célula de

flujo donde desarrollaba su señal analítica; una vez la señal alcanzaba su máximo, se activaban las válvulas 1 y 4 durante 85 s. para introducir una disolución eluyente adicional de ácido etilendiamintetraacético 0.08 M que permitía la completa elución del complejo y consiguiente regeneración del soporte sólido. En la figura V.13 puede observarse el perfil de señales obtenido.

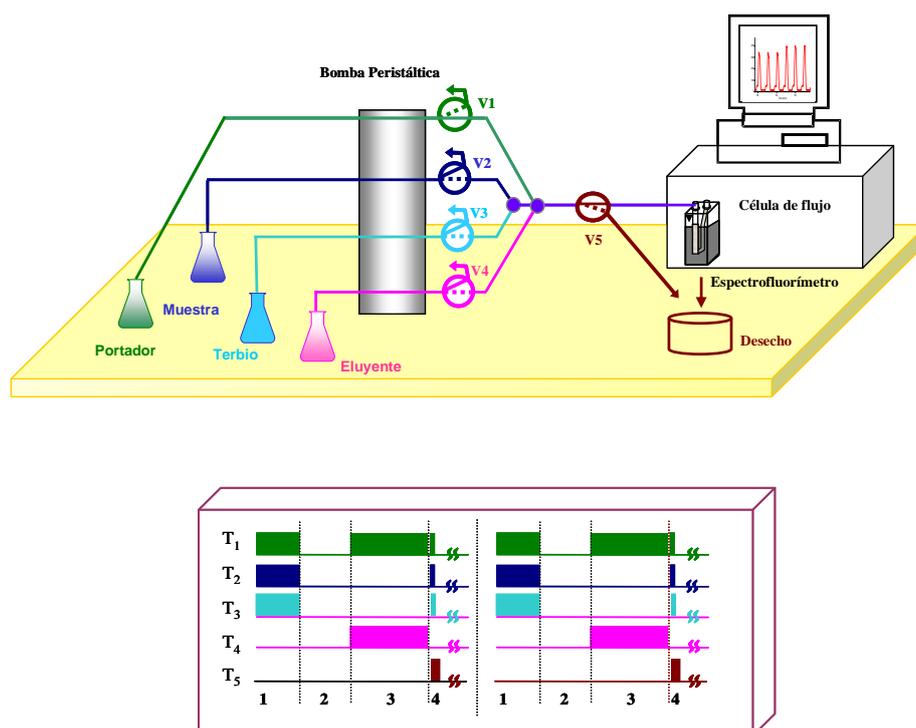


Figura V.12. Configuración del sensor monoparámetro multiconmutado para la determinación de ácido pipemídico. Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías.

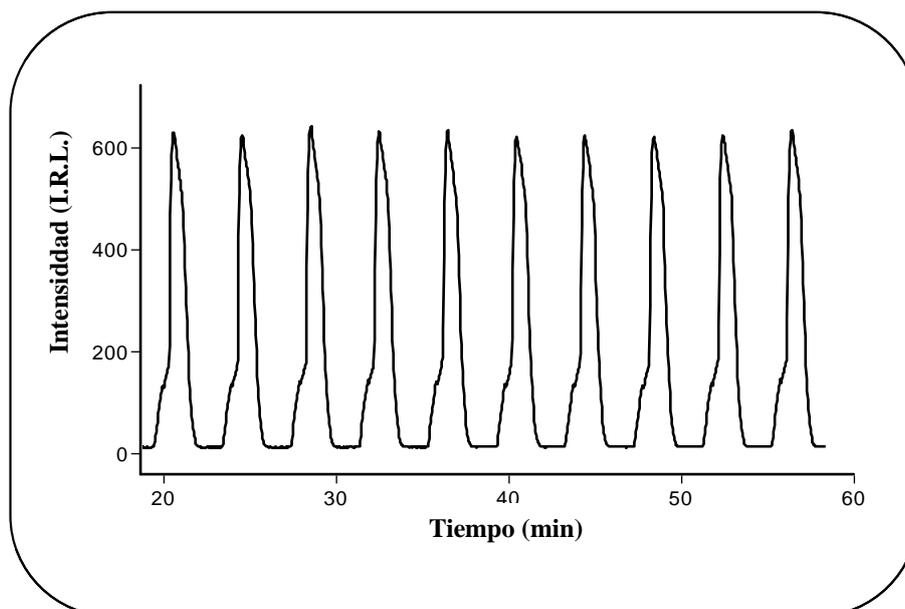


Figura V.13. *Figrama obtenido en el estudio de la repetitividad del ácido pipemídico (100 ng ml⁻¹).*

C) En el sensor monoparámetro para la determinación de **ácido salicílico** se emplea detección quimioluminiscente, obtenida tras la reacción entre el analito y permanganato en medio ácido. Dicha reacción se produce en el mismo soporte sólido situado en la célula de detección. El sistema empleado, así como el esquema de tiempos usado, se muestra en la Figura V.14. En primer lugar, todas las válvulas están desactivadas y el portador, 0.6 M H₂SO₄ está pasando a través del sistema. A continuación, se activan las válvulas V₂ y V₄ durante 40 s. para introducir la disolución de permanganato 2x10⁻⁴ M y fijar el permanganato en el soporte sólido (Sephadex QAE-A 25). Posteriormente se introduce la muestra, preparada en H₂SO₄ 0.1 M, activando las válvulas V₁ y V₂ (40 s.), y al llegar el analito al soporte sólido se produce la reacción de oxidación y se obtiene la señal analítica. Por último se lleva a cabo una etapa de limpieza de los tubos y el sistema que preparado para el siguiente análisis.

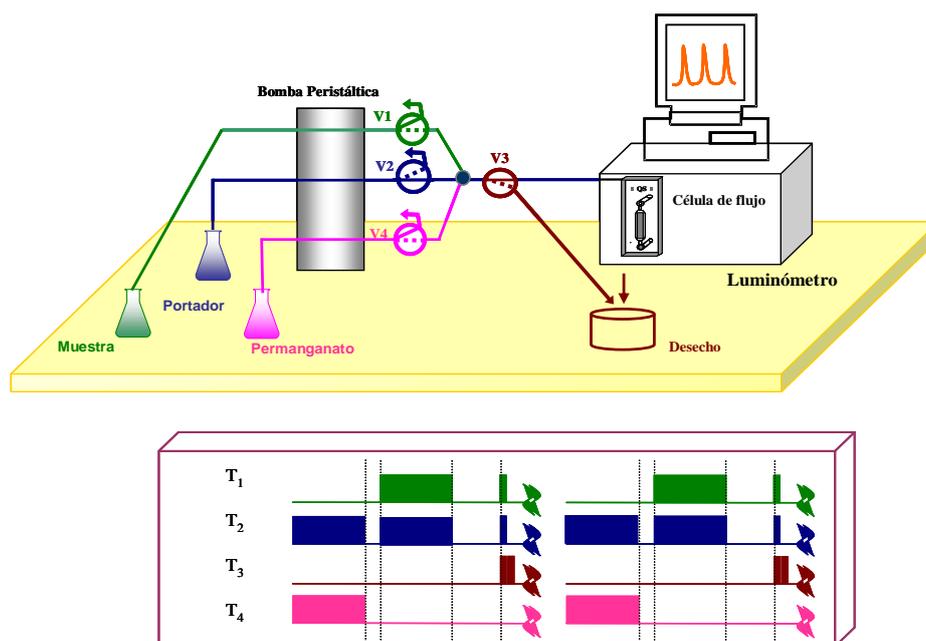


Figura V.14. Configuración del sensor monoparámetro multiconmutado para la determinación de ácido salicílico. Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías.

D) Para el desarrollo del optosensor fluorescente biparámetro para la determinación de **fuberidazol y orto-fenilfenol** mediante una separación *on-line* previa, se propuso una configuración del sistema de flujo basada en el empleo de una cantidad adicional de soporte sólido (sobre la que habitualmente se emplea en este tipo de sensores) en la célula de flujo. La separación se basa en la diferencia de polaridad entre los dos compuestos, que se pone de manifiesto en la distinta cinética de retención/elución de cada uno de ellos al interaccionar con el soporte sólido apolar (gel de sílice C₁₈). El sistema empleado se muestra en la Figura V.15. En primer lugar, todas las válvulas están desactivadas y el portador, 30 % MeOH:H₂O (v/v), circula a través de todo el sistema a un caudal de 1.1 ml min⁻¹. Para la introducción de la muestra, se activan las válvulas 1 y 2 durante 120 segundos; el orto-fenilfenol queda fuertemente retenido en la cantidad adicional de soporte sólido (situada encima de la zona de irradiación); por el contrario, el fuberidazol es transportado hasta la zona de detección, desarrolla su señal analítica y es eluido por el propio portador. A

continuación, activando las válvulas 2 y 4 durante 120 segundos, la disolución eluyente 60 % MeOH:H₂O es insertada en el sistema y eluye al orto-fenilfenol, que desarrolla su señal analítica. Por último se realiza un rápido proceso de limpieza para evitar contaminación entre muestras.

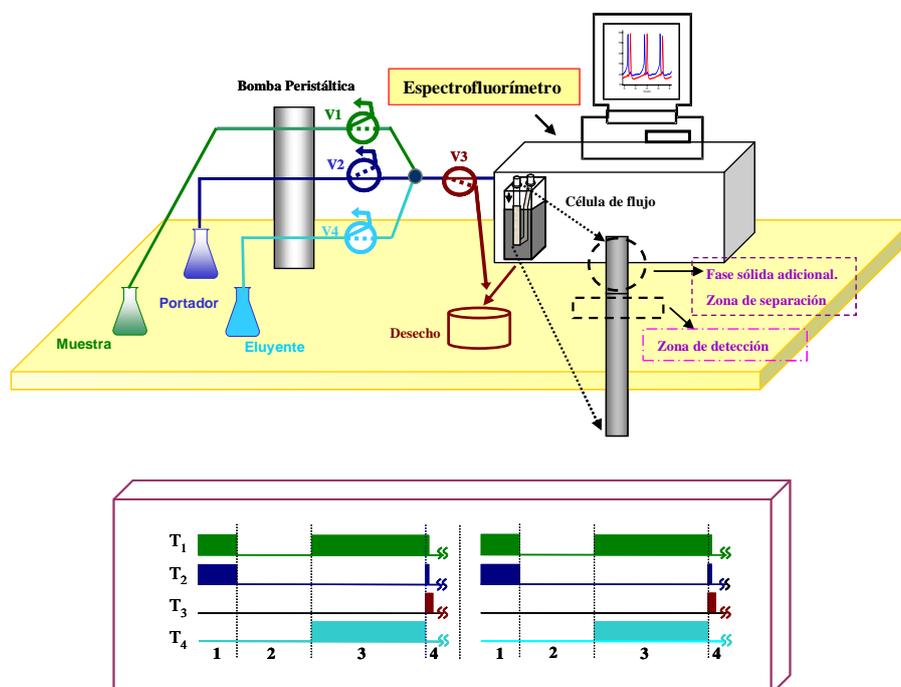


Figura V.15. Configuración del sensor biparámetro multiconmutado para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol. Esquema de tiempo de las válvulas solenoides de tres vías.

E) Sensor monoparámetro para la determinación de **bitertanol**. Al tratarse de un sencillo sensor monoparámetro basado en la medida de la fluorescencia nativa, el sistema utilizado es prácticamente igual que el empleado para la determinación de furosemida y triamtereno (Figura V.11), siendo la única diferencia la ausencia de la precolumna. La única característica a resaltar en este sistema es la necesidad de usar una disolución eluyente debido a que algunos componentes de la matriz (extractos de plátano) no se elúan por completo del soporte sólido y provocaban posteriores disminuciones en la señal del analito. En este sensor se usó como portador una disolución 70 % MeOH:H₂O (v:v), que circula constantemente a través del sistema de flujo cuando las válvulas

están desconectadas. Tras insertar la muestra en el sistema abriendo las válvulas 1 y 2 durante 60 segundos, el bitertanol es transportado hacia la zona de detección donde desarrolla su señal analítica y es eluido por el propio portador. Para la regeneración del soporte sólido se emplea metanol, que se inserta en el sistema activando las válvulas 2 y 4 durante un minuto. Por último se realiza una etapa de limpieza de tubos para evitar contaminaciones entre muestras. Se puede observar el perfil de señales obtenido de un extracto de plátano en la Figura V.16.

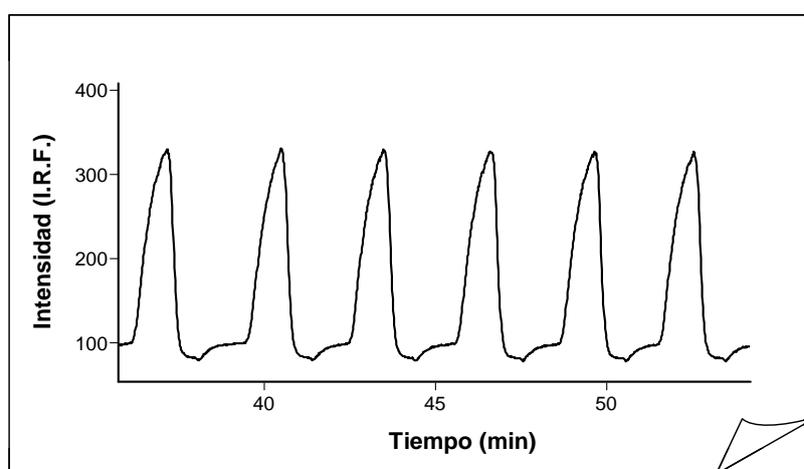


Figura V.16. *Diagrama mostrando la repetitividad del sensor desarrollado para bitertanol. Extracto de plátano con 0.4 mg kg^{-1} de bitertanol.*

3.3 Optosensores desarrollados empleando el análisis por inyección secuencial.

La última metodología empleada en esta Memoria fue el análisis por inyección secuencial. Se desarrollaron dos sensores monoparámetro fluorescentes (labetalol y paracetamol), un sensor monoparámetro empleando luminiscencia sensibilizada por lantánido (ácido salicílico) y un doble sensor luminiscente empleando fluorescencia y quimioluminiscencia (piridoxina, riboflavina y ácido ascórbico).

A) El sensor monoparámetro usando un sistema SIA para la determinación de **labetalol** basado en la medida de su fluorescencia nativa representa el sistema más sencillo de todos los descritos en este apartado. El sistema empleado puede observarse en la figura V.17. El portador, 20 % MeOH:H₂O (v:v), realizaba a la vez la tarea de eluyente; de esta forma, no era necesario el uso de un eluyente adicional para regenerar el soporte sólido. Por consiguiente, se aspiraban 3 ml de portador y 1.5 ml de muestra por medio del pistón de la jeringa (la aspiración se llevaba a cabo a 5 ml min⁻¹) para posteriormente impulsarlos hacia la célula de flujo a una velocidad de 0.9 ml min⁻¹, donde el analito desarrollaba su señal fluorescente transitoria y por medio del portador era eluido, quedando la zona sensora preparada para otra inyección. Además, en la figura V.17 también puede observarse el perfil de señales obtenido con este sistema.

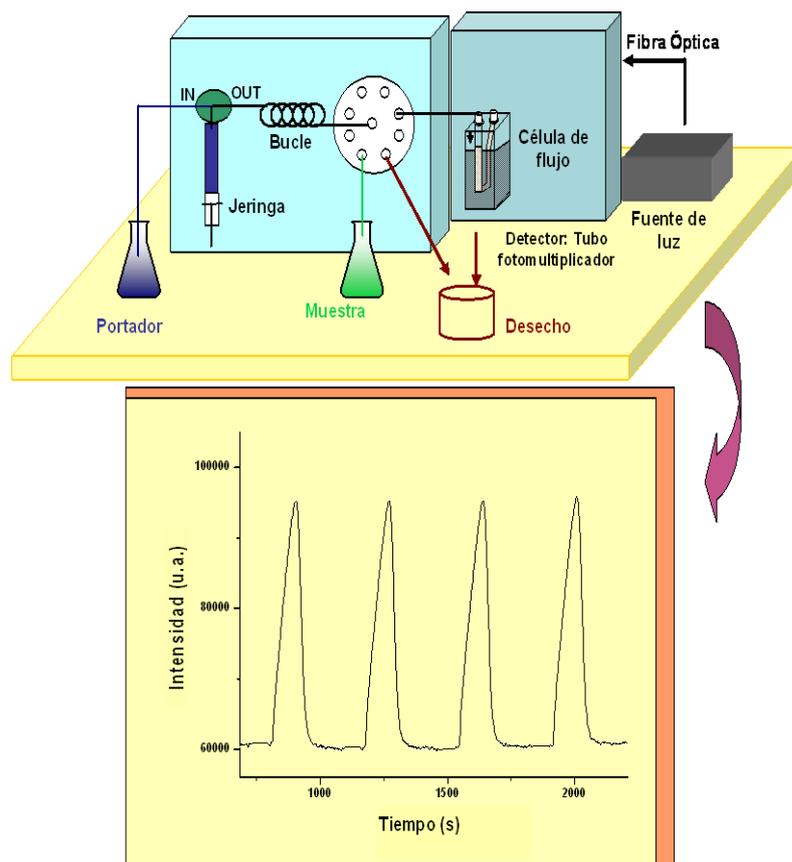


Figura V.17. Sistema empleado para el sensor monoparámetro para la determinación de labetalol. Perfil de la señal analítica obtenida para 100 ng ml^{-1} de labetalol.

B) El sistema para la determinación de paracetamol es exactamente el mismo que en el caso anterior (Figura V.17.), incluyendo la técnica de detección. La única diferencia consiste en que no se determina fluorescencia nativa, sino la fluorescencia obtenida tras una reacción de derivatización con nitrito en medio ácido. Se aspiraban 2.5 ml de portador, HCl 0.2 M y 1.5 ml de muestra, se impulsaban hacia la zona de detección, donde el producto de reacción del paracetamol desarrollaba su señal analítica y el soporte sólido se regeneraba completamente con la propia disolución portadora.

C) El sistema para el desarrollo del sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico es similar al previamente descrito. Sin embargo, en este caso se requiere el uso de una disolución de terbio y de una disolución eluyente. En la Figura V.18 puede observarse el sistema SIA empleado. Se usó agua desionizada como disolución portadora y los caudales de aspiración e impulsión fueron 5 y 1.2 ml min^{-1} respectivamente. Para cada medida el procedimiento fue el siguiente: En primer lugar, se aspiraban hacia el bucle 1 ml de terbio y 1 ml de muestra, separados por 0.2 ml de portador para evitar su mezcla. Por medio del portador, se impulsaban muestra y terbio hacia la zona sensora; el ácido salicílico se fijaba en la zona sensora y, al llegar el terbio, se formaba el complejo y se obtenía la señal analítica. Por último, y debido a la fuerte retención del complejo formado sobre el soporte sólido, se empleaban 0.8 ml de una disolución eluyente de ácido etilendiamintetraacético 0.08 M para regenerar la zona sensora.

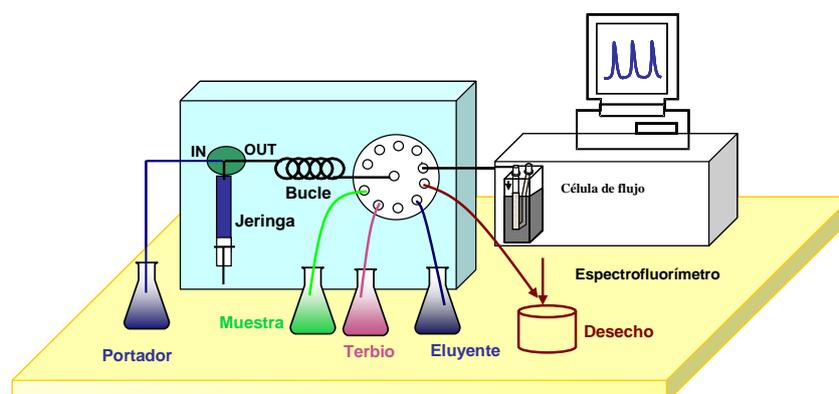


Figura V.18. Sistema empleado para el sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico.

D) El sistema desarrollado para la determinación de las vitaminas piridoxina, riboflavina y ácido ascórbico es el que representa una mayor complejidad en el diseño del mismo. En este caso se utilizaron dos técnicas de detección diferentes: 1) Fluorescencia nativa para piridoxina y riboflavina; 2) Quimioluminiscencia para el ácido ascórbico.

En el caso del ácido ascórbico, la reacción (consistente en una oxidación con permanganato en medio ácido) se produjo en el mismo soporte sólido situado en la célula de flujo.

El diseño usado en este doble sensor se muestra en la Figura V.19. En este caso, se realizan dos inyecciones de muestra consecutivas:

- Detección fluorescente de piridoxina y riboflavina (todas las disoluciones son dirigidas hacia el espectrofluorímetro): Se aspiran 0.6 ml de muestra y 1 ml del portador, H_2SO_4 1M, para, a continuación, impulsarlos hacia la zona de detección. La disolución portadora hace a su vez la función de eluyente para la piridoxina, que desarrollará su señal analítica en la zona de detección mientras que la riboflavina queda fuertemente retenida en la parte superior del soporte sólido (cantidad adicional de soporte sólido). A continuación, se aspiran e impulsan hacia la célula de flujo 1.5 ml de disolución eluyente, 20 % MeOH:H₂O(v:v), que eluye a la riboflavina de la parte superior del soporte sólido, obteniéndose su señal analítica y quedando la zona sensora preparada para una nueva muestra.
- Detección quimioluminiscente de ácido ascórbico (todas las disoluciones son dirigidas hacia el luminómetro): En primer lugar se aspiran 0.4 ml de la disolución de permanganato y 0.2 ml de disolución portadora y se impulsan hacia la zona de detección, quedando el permanganato retenido en el soporte sólido en la célula de flujo. A continuación se aspiran 0.4 ml de muestra y 1 ml de disolución portadora y se dirigen hacia la célula de flujo, donde el ácido ascórbico reacciona con el permanganato, obteniéndose la señal analítica. El portador es el propio eluyente, que regenera completamente la zona sensora, quedando preparada para una nueva muestra.

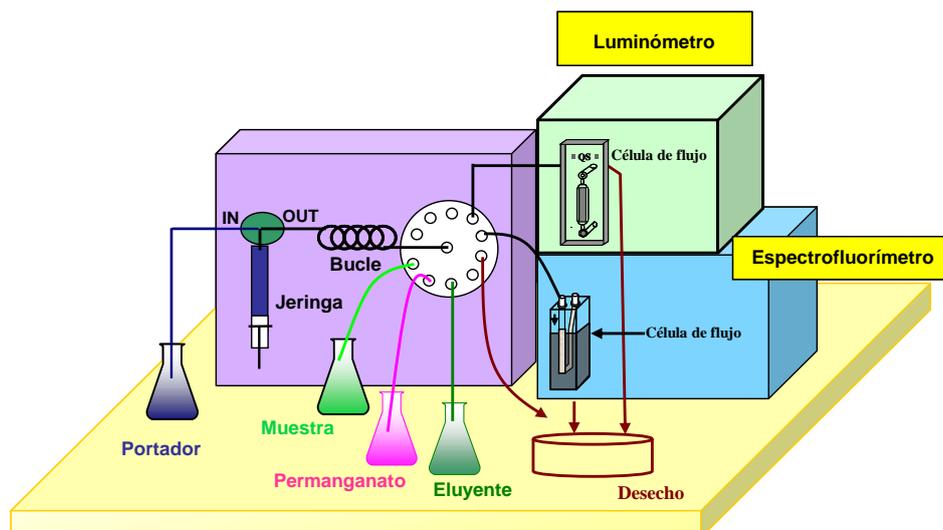


Figura V.19. Sistema empleado para el doble sensor para la determinación de ácido ascórbico, piridoxina y riboflavina.

En la figura siguiente se pueden observar las señales obtenidas mediante este sistema.

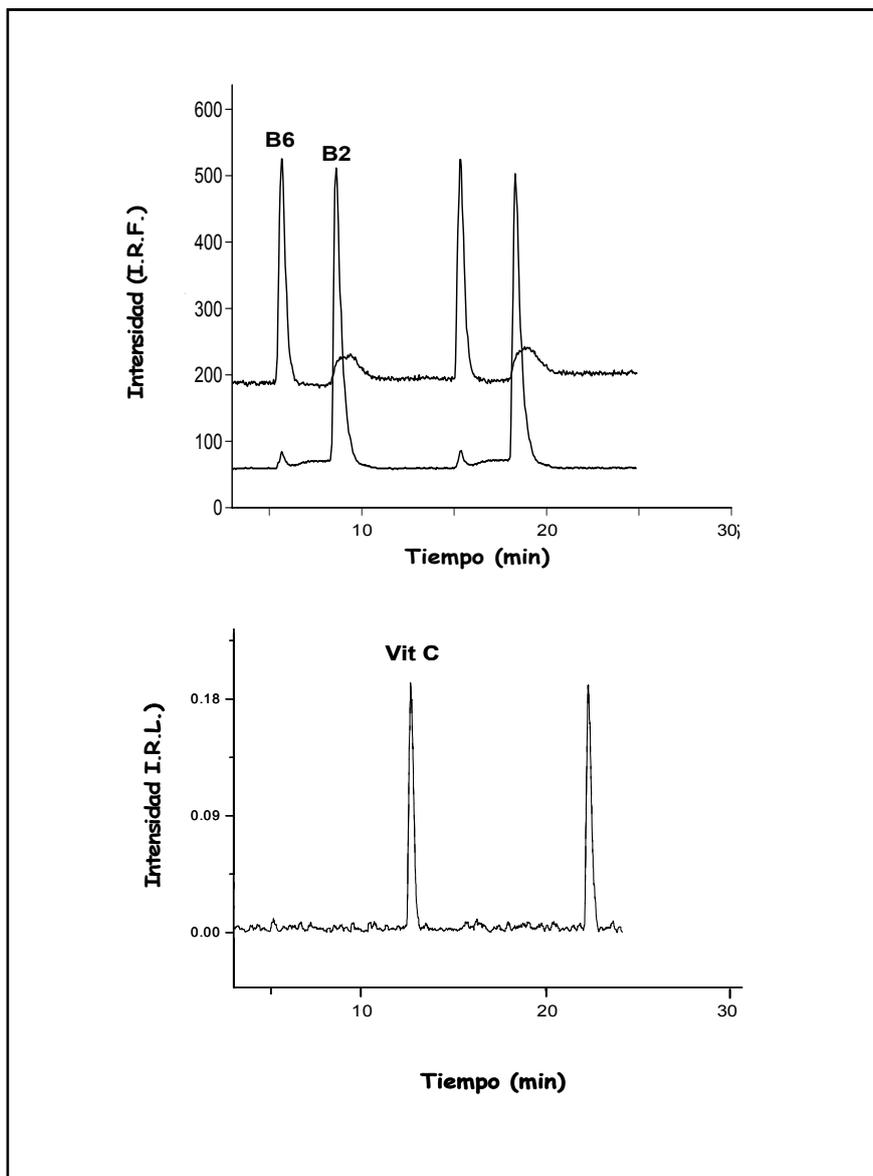


Figura V.20. Perfil de la señal analítica obtenida para 1.5, 0.3 y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de las vitaminas B6, B2 y C respectivamente.

4. VARIABLES EXPERIMENTALES

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

- Variables de la unidad de retención-detección
- Variables químicas
- Variables del sistema de flujo
- Variables instrumentales

4.1 Variables de la unidad de retención-detección

4.1.1. Características de la célula de flujo

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

Como característica general, el camino óptico no debe ser superior a 2 mm para evitar que la intensidad relativa de luminiscencia de la línea base sea demasiado alta, lo que provocaría dificultades en la detección. Por otra parte, el depósito interno de la célula de flujo, que ha de albergar el soporte sensor, debe ser lo menor posible con objeto de incrementar la sensibilidad, puesto que una gran cantidad de soporte sólido dificulta la preconcentración de los analitos, aumentando además el tiempo de elución.

De igual forma, es importante tener en cuenta el sistema de detección que se va a emplear en cada caso, lo que condicionará la estructura geométrica de la célula de flujo. Para los sensores con detección fluorescente o luminiscente sensibilizada con terbio la célula tendrá forma de prisma rectangular de base cuadrada, para posibilitar la emisión en un ángulo de 90° respecto a la excitación incidente (ver Figura V.21).

Tipo de detección	Fluorescencia Luminiscencia sensibilizada por lantánido
Célula	Hellma 176.052 QS
Paso óptico	1.5 mm
Volumen interno	25 μ l

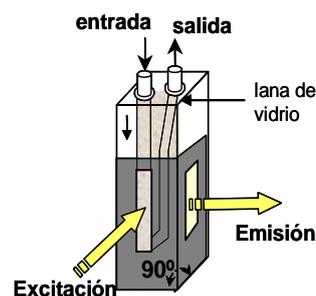


Figura V.21. Célula empleada para detección fluorescente o luminiscente sensibilizada con terbio.

Para la detección quimioluminiscente no se emplea radiación incidente, puesto que la señal analítica se debe a una reacción química. Cuando se empleó esta detección, la célula de flujo usada es más plana que la anterior y se muestra en la Figura V.22.

Tipo de detección	Quimioluminiscencia
Célula	Hellma 138 QS
Paso óptico	1.0 mm
Volumen interno	50 μ l

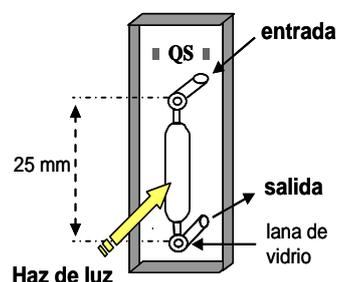


Figura V.22. Célula empleada para detección quimioluminiscente

4.1.2. Naturaleza del soporte sólido

El uso de un soporte sólido en la zona de detección es la clave de los sensores espectroscópicos en flujo. Dicho soporte retiene temporalmente los analitos en esa zona favoreciendo una preconcentración que aumenta la sensibilidad y selectividad del método. La elección del soporte sólido se lleva a cabo considerando la naturaleza, la estructura y las propiedades físicas y

químicas de la especie o especies de interés. Si los analitos (o los productos de reacción a partir de una reacción de derivatización) son de tipo iónico, se suelen emplear resinas de intercambio iónico como soporte sólido. En cambio, si los compuestos son de naturaleza neutra, se suelen emplear sorbentes que estén basados en interacciones por mecanismos de adsorción.

En el caso de los sensores monoparámetro sólo interesa la retención transitoria de un analito, por lo que se elegirá un soporte sólido de acuerdo con la naturaleza de dicho analito. Sin embargo, para los sensores multiparámetro hay que conjugar la retención de varios analitos, que pueden ser de muy diferente naturaleza química; por ello será necesario seleccionar un soporte sólido que permita la retención transitoria de dichos analitos, así como que proporcione una buena sensibilidad para todos ellos. También hay que tener en cuenta que en los multisensores se empleó una precolumna empaquetada con un soporte sólido (o cantidad adicional de soporte sólido en la misma célula de flujo) para lograr una retención secuencial de los analitos, lo cual permitió una discriminación temporal en su llegada a la zona de detección. Dicho material debe ser escogido de forma que, conjugado con el uso del portador y eluyente/s adecuado/s, se consiga este propósito. En todos los sensores aquí desarrollados, el soporte sólido empleado para conseguir esta discriminación temporal fue el mismo que el usado en la célula de flujo como zona sensora.

Para cada uno de los métodos descritos, se realizó un estudio preliminar de los posibles soportes sólidos a emplear de acuerdo con las características de los analitos. En la Tabla V.1 se muestran los soportes sólidos empleados para cada sensor.

Tabla V.1. Soportes sólidos empleados.

Optosensor	Soporte en la Célula de Flujo
Carbendazima/Carbofurano/Benomilo	Gel de sílice C ₁₈
Norfloxacino	Sephadex SPC C-25
Furosemida/Triamtereno	Sephadex SPC C-25
Ácido pipemídico	Sephadex SPC C-25
Ácido salicílico	Sephadex QAE A-25
Fuberidazol/Ortofenilfenol	Gel de sílice C ₁₈
Bitertanol	Gel de sílice C ₁₈
Labetalol	Gel de sílice C ₁₈
Paracetamol	Sephadex QAE A-25
Ácido salicílico	Sephadex QAE A-25
Piridoxina/Riboflavina ¹	Gel de sílice C ₁₈
Ácido ascórbico ¹	Sephadex QAE A-25

¹ Mismo sistema. Doble sensor luminiscente: Fluorescencia y Quimioluminiscencia

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

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

En esta Memoria se presentan cuatro sistemas para la resolución de mezclas binarias y ternarias; en estos casos, utilizando únicamente el soporte sólido empaquetado en la célula de flujo, las señales de los analitos se desarrollan al mismo tiempo, haciendo imposible su determinación. Por lo general los analitos presentan un comportamiento diferente en su cinética de retención-elución en su paso por la fase sólida; esta diferencia

puede potenciarse mediante el uso de una precolumna rellena del mismo soporte sólido que la célula de flujo, consiguiendo de esta manera que los analitos alcancen la zona sensora de forma consecutiva, permitiendo su detección sin solapamiento de señales. La estrategia de la precolumna se ha usado para la mezcla ternaria carbendazima/carbofurano/benomilo y para la mezcla binaria furosemida/triamtereno.

En otras ocasiones, cuando la cinética de retención-elución de los analitos es muy diferente, es posible conseguir su separación con una cantidad mínima de soporte sólido adicional. En estos casos, el soporte sólido adicional se coloca en la misma célula de flujo, justo por encima de la zona de detección (como puede observarse en la Figura V.23) y no es necesario el uso de la precolumna. Esta estrategia se ha empleado en los sensores para la determinación de ortofenilfenol/fuberidazol y riboflavina/piridoxina/ácido ascórbico.

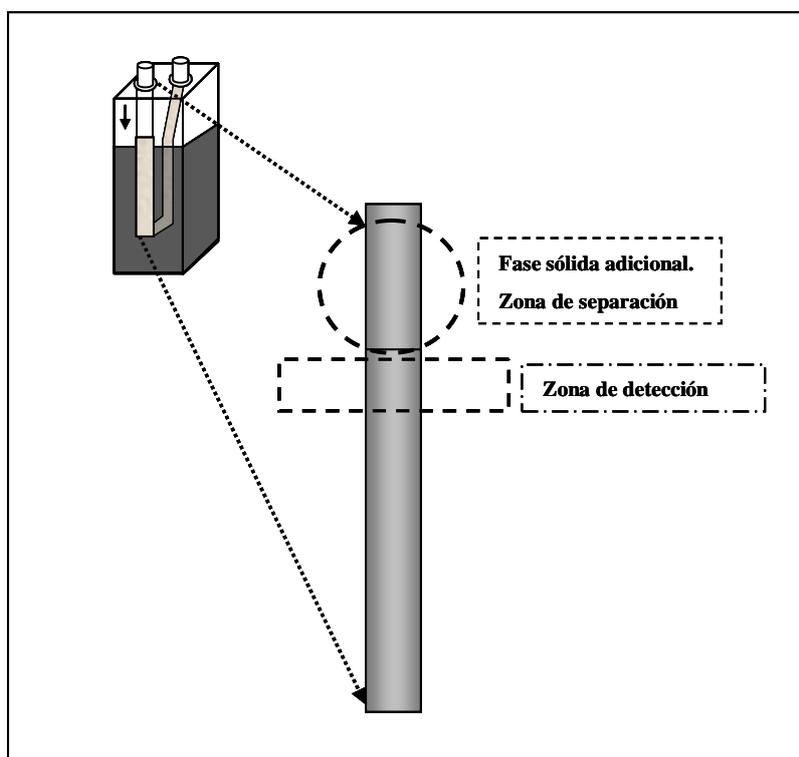


Figura V.23. Separación de los analitos en la misma célula de flujo. La fase sólida adicional se sitúa justo encima de la zona de detección.

En ambas estrategias se escogió siempre la mínima cantidad de fase sólida que permitiese la separación completa de los analitos, pues tomando valores superiores aumenta el tiempo de pico, disminuyendo innecesariamente la frecuencia de muestreo. Los valores seleccionados fueron:

Separación de carbendazima/carbofurano/benomilo: 55 mg gel de sílice C₁₈.

Separación de furosemida/triamtereno: 20 mg Sephadex SPC C-25.

Separación de ortofenilfenol/fuberidazol: 50 mg gel de sílice C₁₈.

Separación de riboflavina/piridoxina: 55 mg gel de sílice C₁₈.

4.2 Variables químicas

En este apartado se estudian las variables de tipo químico que fueron consideradas para poner a punto los distintos métodos desarrollados y descritos en esta memoria. Las variables químicas estudiadas fueron: (1) Influencia del pH de portador y eluyente/s; (2) Naturaleza y concentración de los mismos; (3) Influencia del pH de la muestra; (4) Fuerza iónica de la misma; (5) Concentración y volumen de reactivos, en los casos en que fue necesaria una reacción de derivatización.

Todas ellas, en mayor o menor medida y en función de la naturaleza de las especies a determinar y del tipo de muestra influyen en la retención de los analitos y, por lo tanto, en la señal analítica, separación de los diferentes componentes en el caso de mezclas de dos o más especies y la elución de los mismos del soporte sólido.

Influencia del pH de portador y eluyente

El pH de la disolución portadora y eluyente influye en la posible ionización de los analitos, permitiéndose o no la fijación de los mismos sobre el

soporte sólido. Esta influencia será mayor en sistemas con analitos de naturaleza iónica y con soportes sólidos de intercambio iónico.

El estudio de esta variable es de gran importancia, ya que permite elegir un valor de pH al que se produzca la máxima retención del analito (o producto de reacción) sobre el soporte sólido, obteniéndose de esta manera una mayor sensibilidad. En los casos en que se requiera una reacción química on-line, el pH del portador también puede influir sobre esta reacción, siendo necesario tenerlo en cuenta. De igual forma, es posible emplear el pH como factor discriminante en la retención y/o elución de los analitos en los sensores multiparámetro, permitiendo la fijación de un analito a un pH y de otro/s analito/s a otro pH, consiguiendo de esta manera su separación.

El estudio del pH del portador/eluyente en estos sistemas se realizó preparando distintas disoluciones con una concentración constante de electrolito pero diferentes valores de pH, ajustados con HCl o NaOH 0.1 M, manteniendo constantes el resto de variables experimentales. Al insertar la muestra, se registraba la señal a las longitudes de onda óptimas de cada sistema y se comparaban las señales obtenidas.

Naturaleza y concentración de portador y eluyente

Una vez elegidos los pHs óptimos de las disoluciones portadoras, se estudió la naturaleza de las mismas, así como su concentración. En sensores monoparámetro, se intenta seleccionar el portador que, además de permitir una máxima retención, también actúe como eluyente, es decir, que una vez alcanzado el máximo de la señal los analitos sean eluidos por el propio portador, regenerando así el sensor tras el desarrollo de la señal transitoria, con lo que se aumenta la frecuencia de muestreo.

Sin embargo, en el caso de los multisensores biparámetro o triparámetro, que utilizan la diferencia en la cinética de retención-elución para la resolución de la mezcla, la selección del portador y eluyente/s es algo más

compleja, ya que habrá que favorecer esta diferente cinética así como la obtención de la máxima señal analítica una vez alcanzada la zona de medida. Por tanto, el portador debe permitir que uno de los analitos no sea retenido en la precolumna empaquetada con soporte sólido (o la fase sólida adicional en la célula de flujo), llegando a la zona de detección, mientras que el/los otro/s analito/s debe/n retenerse en el soporte sólido, permitiendo su separación. Posteriormente, mediante una disolución portadora/eluyente adecuada, se eluye el segundo analito de la precolumna (o de la fase sólida adicional) transportándolo hasta la microzona sensora, permitiendo su determinación. En el caso del sensor triparámetro, el tercer analito es eluido de la precolumna usando un portador/eluyente adicional, desarrollando su señal analítica en la microzona sensora.

Cuando el soporte sólido utilizado sea una resina de intercambio iónico, lo más apropiado es utilizar disoluciones de portador acuosas, mientras que cuando se utilice el gel de adsorción C_{18} los portadores más adecuados son de naturaleza alcohólica.

Para realizar este estudio, en los sensores que usan un soporte de cambio iónico se prueban distintas disoluciones amortiguadoras al pH seleccionado como óptimo, o disoluciones de diferentes electrolitos en las mismas condiciones de trabajo. Se hacen sucesivas inyecciones de la misma muestra con los diferentes portadores y se comparan las señales analíticas obtenidas en cada caso. Se seleccionará aquella disolución de portador que proporcione mayor sensibilidad, es decir, mayores señales analíticas.

Una vez elegido el portador, se estudian distintas concentraciones de éste y, de igual forma, se selecciona aquélla que proporciona mayores señales analíticas. Además, en el caso de que también actúe como eluyente, se busca que esta disolución proporcione tiempos de residencia cortos. Se trata, por consiguiente, de una solución de compromiso entre alta sensibilidad y elevada frecuencia de muestreo.

Naturaleza y pH de la muestra

De igual forma que se estudió la influencia del pH de la disolución de portador, se estudió también la influencia del pH de la muestra, modificando el mismo con la cantidad adecuada de HCl o NaOH 0.1 M. Una vez estudiada dicha influencia, se procedía a optimizar la naturaleza de la muestra (tampón más conveniente, ácido empleado...).

Reactivos empleados

En aquellos sensores en los que es necesaria una reacción derivatizadora para la obtención del compuesto que proporcionará la señal analítica, se estudió la concentración de los reactivos necesarios, así como el pH y el tiempo necesario de reacción en esta etapa del método.

*** *Optosensores desarrollados empleando válvulas rotatorias de seis vías***

A) Determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo: Las disoluciones de benomilo en agua o en disolventes orgánicos no son estables, por lo que la mayoría de los métodos cromatográficos descritos para la determinación de benomilo están basados en la conversión previa de éste en su principal producto de degradación: la carbendazima. Sin embargo, varios estudios han señalado que usando medios ácidos muy fuertes, el benomilo es estable y no se degrada, lo que permitiría su determinación directa. Singh estableció un umbral de concentración de HCl 1M, a partir del cual la degradación de benomilo en carbendazima, era prácticamente despreciable [104]. En un estudio previo realizado en nuestro laboratorio [81] se comprobó que con un medio 1.5 M HCl, el benomilo permanecía estable durante más de 24 horas a temperatura ambiente. Se seleccionó finalmente una concentración de HCl de 1.5 M para las disoluciones de trabajo. La disolución madre de benomilo se preparaba en un medio 5 M HCl, de forma que era estable durante más de dos semanas.

Teniendo en cuenta la estructura de los analitos, se empleó como soporte sólido gel de sílice C₁₈ tanto en la célula de flujo como en la precolumna. Para conseguir su separación, se usaron disoluciones acuosas con distinto porcentaje de metanol tanto para el portador como para los eluyentes y no fue necesario ajustar el pH de estas disoluciones. Se optimizaron los porcentajes de metanol tanto en la disolución portadora como en las disoluciones eluyentes para conseguir la separación de los analitos y, a su vez, obtener una adecuada sensibilidad. Finalmente se escogieron como óptimos 15 %, 40% y 70 % MeOH:H₂O (v:v) como disolución portadora (elución de carbendazima), eluyente 1 (elución de carbofurano) y eluyente 2 (elución de benomilo) respectivamente.

B) Determinación de norfloxacino: En este sensor se mide la luminiscencia del complejo norfloxacino-terbio. Por tanto, es necesario estudiar el pH tanto de la disolución portadora como de la muestra, para comprobar el rango de pH que favorece la formación del complejo. Teniendo en cuenta el pK_a del grupo carboxilato del analito, 6.22, valores bajos de pH impedían la formación del complejo debido a que el grupo carboxilato no estaba negativamente cargado. Por otra parte, para valores de pH superiores a 8 se producía la hidrólisis del terbio.

Se observó que la señal permanecía constante en el rango de pH 5-7, por lo que se probaron tampón acetato a pH 5.6 y tampón fosfato a pH 6.5, obteniendo los mejores resultados con el primero, probablemente debido a la interacción entre los iones fosfato y terbio, que impedían la formación del complejo Tb-Norfloxacino. Se empleó este tampón tanto en el portador como en la muestra. Una vez escogido el pH 5.6, se procedió a estudiar la concentración óptima de disolución tampón, observando que al aumentar la concentración desde 0.02 hasta 0.2 M, la señal analítica iba disminuyendo ligeramente, debido a una elución parcial del complejo del soporte sólido. En conclusión, se decidió emplear tampón acetato pH 5.6 0.1 M tanto en el portador como en la disolución de muestra para obtener tanto suficiente capacidad tamponadora como buena sensibilidad.

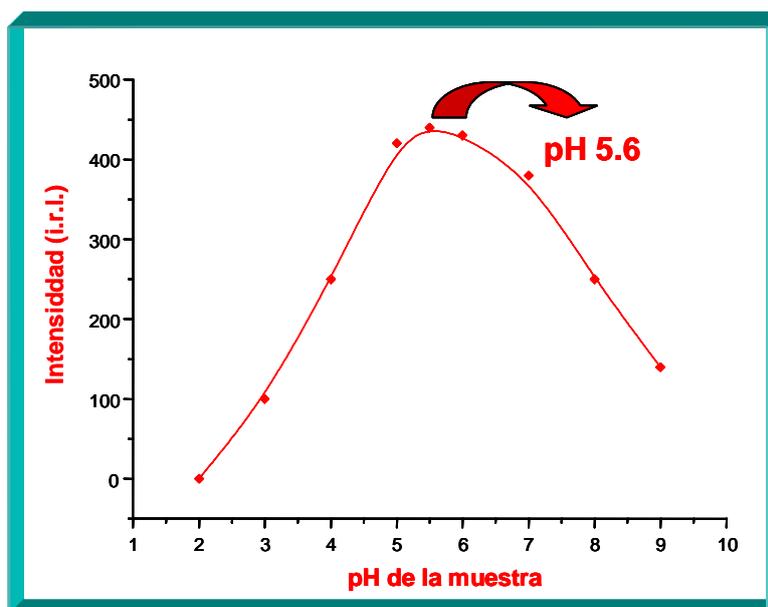


Figura V.24. Estudio de la influencia del pH de la muestra en el sensor monoparámetro para la determinación de norfloxacin.

La concentración de terbio (III) era un factor crítico en este sensor, por lo que se llevó a cabo el estudio de su influencia en la señal analítica. Se observó que la señal neta de luminiscencia aumentaba con la concentración de terbio hasta 4×10^{-3} M, manteniéndose constante para concentraciones superiores, como se muestra en la Figura V.25. Por consiguiente, ésta fue la concentración escogida como óptima. Además, también se probó el uso de sulfito sódico como agente desoxigenante y de otros reactivos que normalmente pueden incrementar la señal de luminiscencia, como el ácido etilendiamintetraacético, el óxido de trioctilfosfina, metanol o etanol, pero no se observó ningún incremento de la señal.

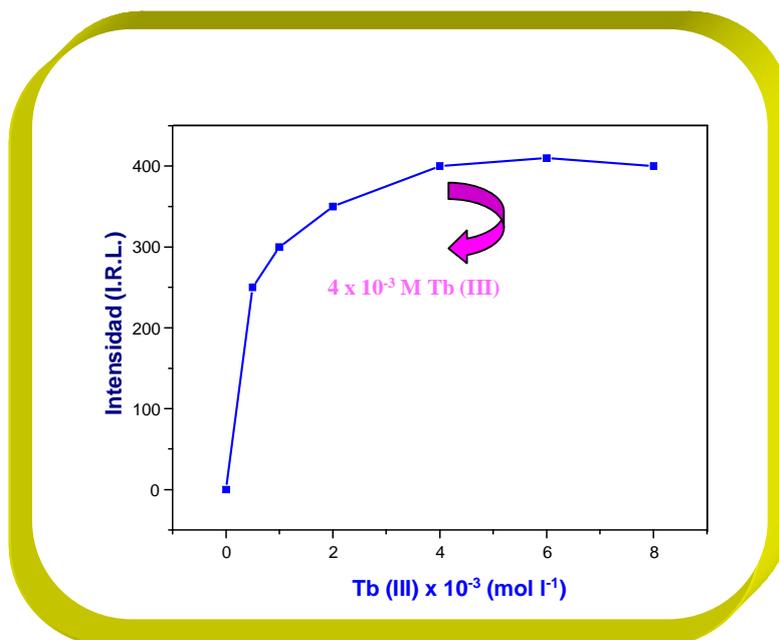


Figura V.25. Estudio de la influencia de la concentración de terbio en el sensor monoparámetro para la determinación de norfloxacino.

❖ **Optosensores desarrollados empleando un sistema de multiconmutación**

A) Determinación de furosemida y triamtereno: En este caso se empleó una precolumna rellena de un soporte sólido catiónico para lograr la separación de los analitos. La furosemida sólo se retenía en el soporte sólido catiónico en un rango muy estrecho de pH, como puede observarse en la Figura V.26; esto se debe su valor de pK_a , 3. Puesto que el triamtereno se mantenía fuertemente retenido en ese rango de pH (lo que permitía su separación) se decidió escoger un valor de pH de 1.7 para el portador, empleando $HCl\ 2 \times 10^{-2}\ M$. Al igual que el portador, la disolución de muestra también se preparó en $HCl\ 2 \times 10^{-2}\ M$, por los mismos motivos anteriormente comentados.

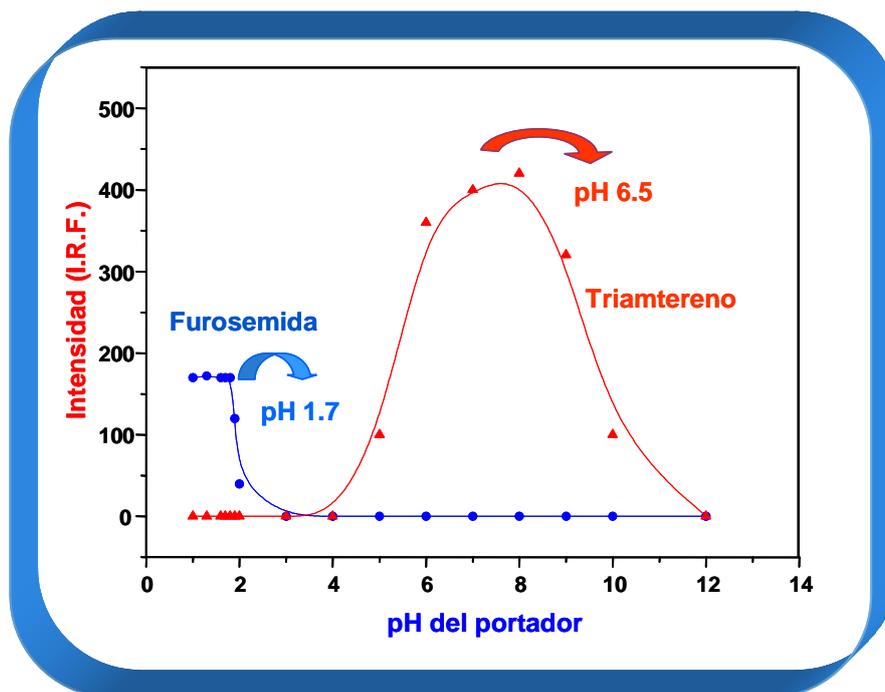


Figura V.26. Estudio de la influencia del pH del portador en el sistema furosemida-triamtereno.

Una vez que la furosemida desarrollaba su señal analítica, era necesario el uso de una disolución eluyente para el triamtereno. Debido al valor de su pK_a , 6.3, se observó que valores de pH superiores a 6 conseguían su elución. Se empleó tampón $\text{NaH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ 0.12 M a pH 6.5, que proporcionó adecuadas repetitividad y sensibilidad.

B) Determinación de ácido pipemídico: En este sensor también se empleó luminiscencia sensibilizada por terbio, por lo que hubo que optimizar las condiciones de pH y concentración de terbio para obtener la máxima señal neta del complejo Tb-pipemídico. Se observó que en el caso de la disolución de portador la señal era relativamente constante en el rango de pH 2-7, pero la mejor repetitividad se obtenía para pH 5-6, por lo que se escogió como óptimo tampón acetato 0.15 M a pH 5.6. Por otra parte, en el caso de la disolución de muestra, la máxima señal analítica se obtenía para pH 2, como puede observarse en la Figura V.27, y el ácido clorhídrico daba

mejores resultados que otros ácidos, por lo que se decidió preparar la muestra en HCl 10^{-2} M.

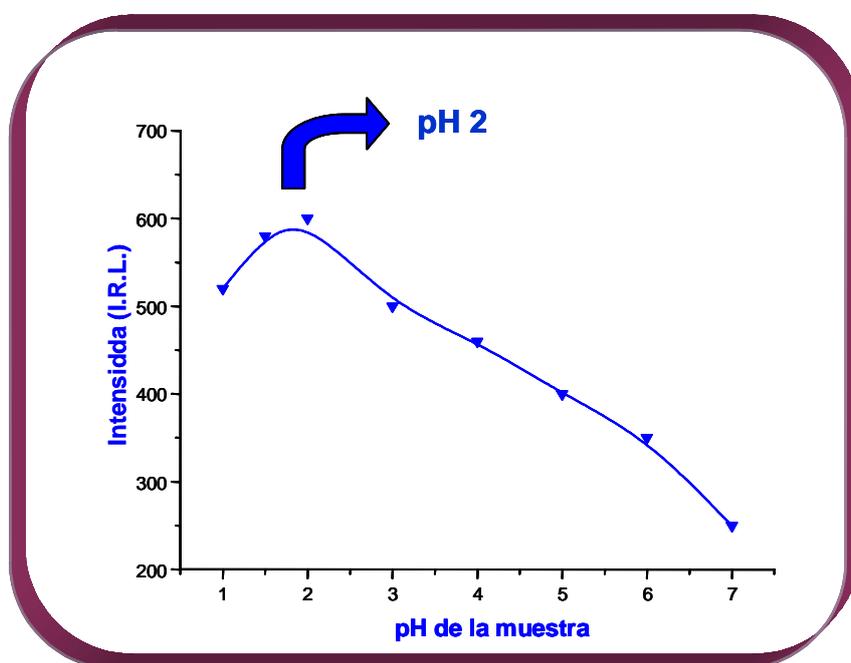


Figura V.27. Estudio de la influencia del pH de la muestra en el sensor monoparámetro para la determinación de ácido pipemídico.

Por último, se realizó el estudio de la influencia de la concentración de ion terbio, observando que la señal aumentaba hasta un valor de 2×10^{-3} M, manteniéndose constante para concentraciones superiores. Se decidió utilizar una concentración de terbio de 4×10^{-3} M. También en este sensor se comprobó la posible utilidad del uso de otros reactivos adicionales, pero los resultados no fueron positivos, por lo que sólo se empleó terbio para obtener la luminiscencia.

C) Determinación de ácido salicílico (quimioluminiscencia): En este sensor se midió la quimioluminiscencia producida por la reacción entre el analito y permanganato directamente retenidos sobre el soporte sólido en la célula de flujo. Para la obtención de la reacción se comprobó que se requería un portador ácido, por lo que lo primero que se llevó a cabo fue el estudio del pH necesario. Tras estudiar la influencia de diferentes ácidos, así como

distintas concentraciones de cada uno de ellos, se seleccionó como portador ácido sulfúrico 0.6 M.

De igual forma, la disolución de muestra también requería un medio ácido para obtener la señal analítica; tras los consiguientes estudios, se eligió una concentración 0.1 M de H_2SO_4 como óptima.

Por último, se procedió a estudiar la concentración óptima de ion permanganato. Como puede observarse en la Figura V.28, la señal analítica obtenida es máxima en el rango de concentración 10^{-4} – 4×10^{-4} M. Se decidió escoger 2×10^{-4} M como concentración óptima de permanganato.

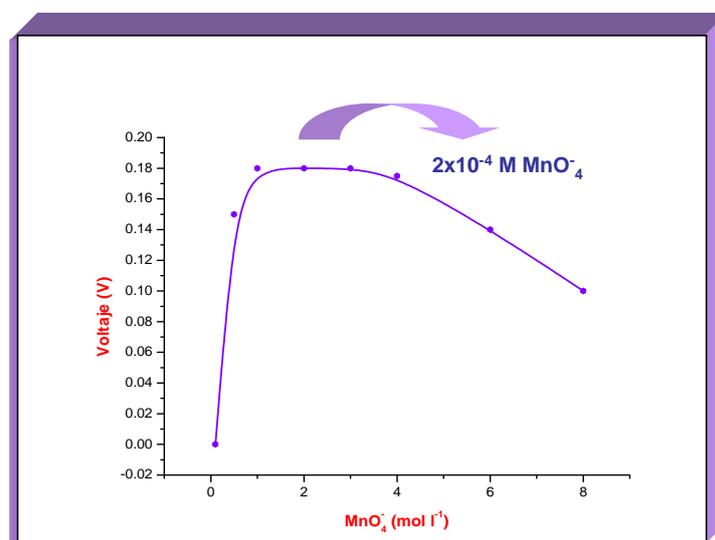


Figura V.28. Estudio de la influencia de la concentración de permanganato en el sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico.

D) Determinación de fuberidazol y ortofenilfenol: En este caso se realiza la separación de los analitos empleando una cantidad adicional de soporte sólido, gel de sílice C_{18} , en la misma célula de flujo. El portador, 30% MeOH:H₂O (v:v), es a su vez eluyente para el fuberidazol; tras la obtención de la señal analítica del fuberidazol, se emplea una disolución eluyente del 60% MeOH:H₂O (v:v) para eluir al ortofenilfenol de la parte superior del soporte sólido, producir su señal analítica y regenerar el soporte sólido.

Sin embargo, en este sensor no fue suficiente sólo optimizar el porcentaje de metanol en portador y eluyente, sino que también fue fundamental la selección del pH de la muestra para lograr la separación. Se observó que debido a la estructura del fuberidazol, con grupos susceptibles de ser protonados a pH ácido, la retención del mismo podía regularse en función del pH, de forma que con concentraciones de HCl elevadas en la muestra se favorecía la separación de ambos analitos; la elución del fuberidazol se producía más rápida a mayor concentración de HCl en la muestra. Se seleccionó una concentración 0.5 M de HCl para conseguir dicha separación.

E) Determinación de bitertanol: Al tratarse de un sensor monoparámetro, el portador se escoge de tal forma que proporcione la máxima sensibilidad posible, a la vez que consiga la elución del analito del soporte sólido (gel de sílice C₁₈). Se escogió como óptimo un portador 70% MeOH:H₂O (v:v).

La naturaleza de la disolución de la muestra viene determinada por el procedimiento de extracción. El extracto final de los plátanos está en una disolución de metanol 100 %. Se realiza una dilución 1:5 con agua desionizada antes de introducirla en el sistema de flujo; por consiguiente, la muestra irá preparada en MeOH:H₂O (v:v) 20%.

Por último, destacar que debido a la matriz tan compleja que se analiza en este sistema, tras cada determinación fue necesario emplear una pequeña cantidad de MeOH al 100% para regenerar completamente el soporte sólido.

*** *Optosensores desarrollados empleando el análisis por inyección secuencial***

A) Determinación de labetalol: Para este sensor se estudió tanto el porcentaje de metanol en el portador, como el pH de la disolución de la muestra. En el caso del portador, se observó que al aumentar el porcentaje

de metanol, la señal del analito iba disminuyendo (puesto que se producía su rápida elución del soporte sólido, sin permitir su preconcentración), pero que para porcentajes de metanol inferiores al 20% no se conseguía su elución. Finalmente se escogió 20% MeOH:H₂O (v:v) como óptimo.

Por otra parte, la máxima señal de fluorescencia se obtenía para pH superiores a 8 en la disolución de muestra, manteniéndose la señal aproximadamente constante. Sin embargo, la mejor repetitividad se obtuvo para pH 13, es decir, una concentración 0.1 M de NaOH, siendo por tanto la escogida.

B) Determinación de paracetamol: En este sensor se midió la fluorescencia obtenida tras la reacción del paracetamol con nitrito en medio ácido, lo que produce su nitrosación. Posteriormente a esta reacción, fue necesario añadir una disolución de hidróxido sódico para estabilizar el producto de reacción. Además, también se optimizó el tiempo de reacción en cada paso del proceso de derivatización. Las condiciones óptimas para el primer paso fueron: 50 µl NaNO₂ 1000 mg l⁻¹, 30 µl HCl 0.2 M y cinco minutos de tiempo de reacción. Para el segundo paso, se decidió usar 1 ml de hidróxido sódico 2 M y se comprobó que cinco minutos era el tiempo necesario para obtener una señal analítica estable tras la alcalinización de la disolución.

Una vez obtenido y estabilizado el producto de reacción, se pasó a optimizar el portador. Hubo que tener en cuenta no sólo conseguir la máxima señal analítica, sino también lograr que el propio portador eluyera el compuesto del soporte sólido (puesto que quedaba muy fuertemente retenido). Teniendo en cuenta que el compuesto es aniónico, se utilizó un pH ácido en el portador. Se empleó ácido clorhídrico, y se observó que era necesario un pH inferior a 1 para conseguir la regeneración del soporte sólido. Finalmente, se seleccionó como portador HCl 0.2 M.

C) Determinación de ácido salicílico (terbio): En este sensor se empleó como técnica de detección la luminiscencia sensibilizada por terbio, por lo

que se estudiaron el pH y fuerza iónica de portador y muestra, así como la concentración de terbio. La máxima señal se obtuvo en el rango de pH 4.5-6. En este rango de pH el ácido salicílico está negativamente cargado, por lo que se retiene en el soporte sólido (una resina aniónica); por tanto, la formación del complejo con el terbio se producía sobre la misma zona sensora. Se seleccionó un valor de pH 5.5 como óptimo. Debido a que la fuerza iónica tanto en la muestra como en el portador disminuía considerablemente la señal analítica, se decidió emplear agua desionizada en ambas disoluciones.

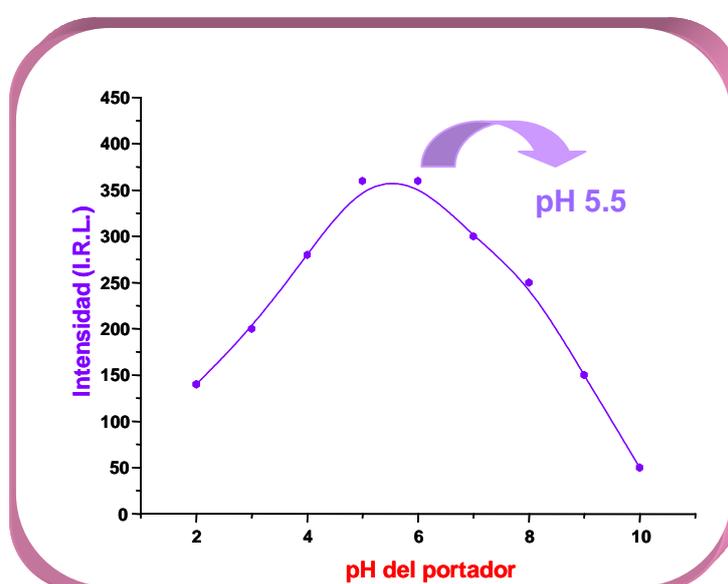


Figura V.29. Estudio de la influencia del pH del portador sobre el ácido salicílico.

Por otra parte, se estudió la concentración de terbio necesaria para obtener la mayor sensibilidad posible. Se observó que la señal neta de luminiscencia aumentaba con la concentración de terbio hasta 2×10^{-3} M, decidiéndose por tanto emplear ésta como la concentración óptima, puesto que mayores concentraciones no mejoraban la señal analítica.

D) Determinación de ácido ascórbico, piridoxina y riboflavina: En este doble sensor vamos a distinguir entre las variables químicas, por una parte, para

la determinación quimioluminiscente del ácido ascórbico y, por otra parte, para la determinación fluorescente de la piridoxina y la riboflavina.

En el caso de la detección quimioluminiscente, se requería un medio ácido para que se produjera la reacción entre el ácido ascórbico y el permanganato, reacción que se producía directamente sobre el soporte sólido. Se comprobó que el ácido que proporcionaba mejor señal era el H_2SO_4 , y que la señal aumentaba hasta concentración 1 M, que fue la escogida. Por otra parte, hubo que optimizar la concentración de permanganato para obtener la reacción quimioluminiscente; la máxima señal se alcanzaba para una concentración de permanganato 10^{-4} M, manteniéndose constante para valores mayores, como puede verse en la Figura V.31. Se escogió 2×10^{-4} M como concentración óptima.

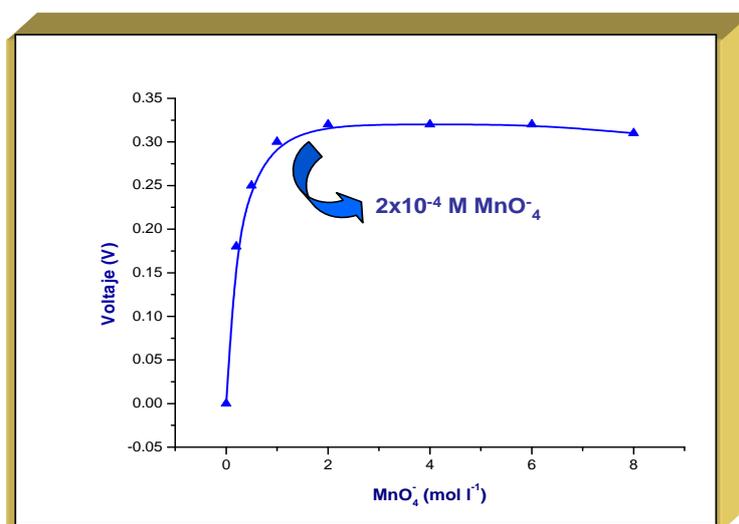


Figura V.30. Estudio de la influencia de la concentración de permanganato en el sensor monoparámetro para la determinación de ácido ascórbico.

En el caso de la determinación fluorescente de los otros dos analitos, se requería un pH 2 o inferior en el portador para lograr la separación de ambas vitaminas. Teniendo en cuenta que la sensibilidad obtenida empleando como portador H_2SO_4 1M, la concentración óptima para la reacción quimioluminiscente, era suficiente para las aplicaciones analíticas, se decidió emplear el mismo portador para las dos técnicas de detección. A este pH, la riboflavina quedaba retenida en el soporte sólido mientras que la

piridoxina desarrollaba su señal analítica y era eluida por el mismo portador. Para eluir la riboflavina de la parte superior del soporte sólido, se empleó una disolución eluyente 20% MeOH:H₂O (v:v).

Por último, a la hora de decidir la preparación de la muestra, se dedicó especial atención a la separación de las dos vitaminas fluorescentes. De esta forma, se decidió preparar la muestra a un pH 2, el óptimo para la separación, y comprobar la sensibilidad del ácido ascórbico. Puesto que se observó una buena señal quimioluminiscente, se escogió finalmente este pH. Se probaron varios ácidos para ajustar el pH y se observó que, mientras que para las vitaminas fluorescentes la señal era independiente del ácido empleado, para el ácido ascórbico se obtenía mejor sensibilidad empleando ácido sulfúrico, por lo que se empleó este último para ajustar el pH de la muestra.

4.3 Variables hidrodinámicas del sistema de flujo

En este apartado hay que considerar las diferencias entre los métodos desarrollados que emplean sistemas de flujo FIA convencionales, sistemas que usan válvulas solenoide y sistemas que emplean SIA. Empleando la válvula rotatoria de seis puertos o el sistema SIA se introduce la cantidad de muestra o reactivos midiendo el volumen correspondiente. Sin embargo, en el modo de multiconmutación con válvulas solenoide de tres vías, el volumen de disolución a introducir se controla por el tiempo y el caudal. Por tanto, en los dos primeros métodos, la inyección se puede considerar como de volumen constante, mientras que en los sistemas empleando multiconmutación se trata de una inyección en función del tiempo. Por esto, en los optosensores en flujo que emplean multiconmutación hay que optimizar el tiempo de inserción, lo que permite desarrollar métodos de inserción de muestra basados en el tiempo. Otra consecuencia es que la sensibilidad del método dependerá de forma directa tanto del tiempo de inserción de muestra como del caudal.

4.3.1. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo empleando válvulas rotatorias de seis vías

empleando las variables químicas seleccionadas anteriormente, se procedió a realizar el estudio de las variables del sistema de flujo: Caudal y volumen de muestra inyectado. Estos estudios se llevaron a cabo manteniendo constante el diámetro interno de los tubos de bomba.

Caudal

El efecto del caudal se estudió insertando disoluciones de los analitos a diferentes caudales, los cuales se obtenían incrementando la velocidad de giro de la bomba peristáltica. Para obtener el valor del caudal en ml min^{-1} es suficiente medir el tiempo que emplea un determinado volumen de disolución en salir del sistema hacia el desecho una vez establecida la configuración del sistema de flujo.

Por regla general, se observa que al aumentar el caudal del sistema disminuye la altura de los picos (disminuye la sensibilidad) y aumenta la frecuencia de muestreo. Por consiguiente, hay que adoptar una solución de compromiso entre ambos efectos.

Volumen de muestra inyectado

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

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

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

Como ejemplo se muestran los resultados obtenidos en este estudio para el sensor para la determinación de norfloxacin.

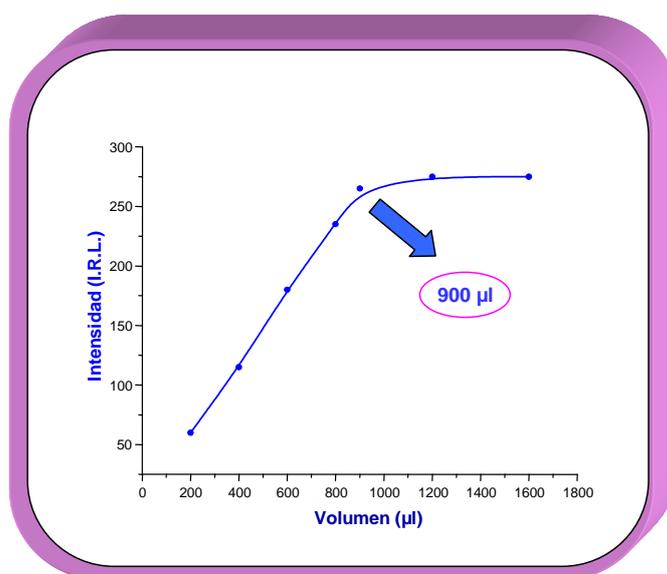


Figura V.31. Estudio de la influencia del volumen de muestra en el sensor monoparámetro para la determinación de norfloxacin.

Tabla V.2. Resumen de las variables del sistema de flujo para los sensores empleando válvulas rotatorias de seis vías.

Sensor	Volumen de muestra (μl)			Caudal (ml min^{-1})	
	Rango	Rango	Valor	Rango	Valor
	estudiado	linealidad	escogido	estudiado	escogido
Norfloxacino	200-1600	200-900	900	0.5-1.1	0.9
Carbendazima ¹		200-1200			
Carbofurano ¹	200-3100	200-1500	2000	0.5-1.2	1
Benomilo ¹		200-1500			

¹ Sensor triparámetro

4.3.2. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo empleando un sistema de multiconmutación

En los sistemas basados en multiconmutación, la inserción de muestra se realiza a tiempo fijo. Esto conlleva, como se ha comentado anteriormente, que el volumen de muestra insertado vendrá determinado por el tiempo en el que la válvula correspondiente está abierta así como del caudal escogido. En este caso, primero se seleccionó el valor de caudal máximo que hiciese que la señal fuese mayor (a tiempo de inserción de muestra constante) sin que se generasen problemas de sobrepresiones en el sistema. A continuación se estudió el tiempo de inserción de muestra, empleando el flujo previamente seleccionado.

Los caudales y tiempo de inserción de muestra escogidos se resumen en la Tabla V.3.

Tabla V.3. Resumen de las variables de flujo para los sistemas multiconmutados

Sensor	Tiempo de muestra (s)		Caudal (ml min ⁻¹)	
	Rango estudiado	Valor escogido	Rango estudiado	Valor escogido
Furosemida Triamtereno	10-150	50	0.8-1.5	1.5
Ácido pipemídico	10-60	50	0.7-1.2	1
Ácido salicílico	10-80	40	0.5-1.2	1
Fuberidazol Ortofenilfenol	20-200	120	0.6-1.2	1.1
Bitertanol	10-180	60	0.6-1.2	1

4.3.3. Variables hidrodinámicas del sistema de flujo empleando el análisis por inyección secuencial

En este caso el caudal se determina por medio del *software* modificando la velocidad del pistón de la jeringa del sistema SIA. Como ya se ha comentado anteriormente, un aumento del caudal provocará tanto la disminución de la señal analítica como el incremento de la velocidad de muestreo.

Una vez optimizado el caudal, se optimizará el volumen de inserción de muestra, seleccionándolo de tal forma que nos proporcione la sensibilidad requerida para las aplicaciones analíticas, pero siendo el menor posible para aumentar la frecuencia de muestreo. En la tabla siguiente se resumen los valores óptimos escogidos.

Tabla V.4. Resumen de variables de flujo en sistemas SIA

Sensor	Volumen de muestra (μl)		Caudal (ml min^{-1})	
	Rango	Valor	Rango	Valor
	estudiado	escogido	estudiado	escogido
Labetalol	100-2500	1500	0.5-1.2	0.9
Paracetamol	100-2000	1500	0.6-1.1	0.9
Ácido salicílico	100-1800	1000	0.6-1.3	1.2
Ácido ascórbico		400		
Piridoxina	100-1500	600	0.6-1.3	1.1
Riboflavina				

4.4. Variables instrumentales

Todos los sensores desarrollados en esta Memoria incluyen una detección luminiscente, por lo que es necesario optimizar algunas variables instrumentales, como son la anchura de las rendijas de excitación y emisión, voltaje del tubo fotomultiplicador y tiempo de retardo (en el caso de la luminiscencia sensibilizada por lantánido).

4.4.1. Anchura de rendijas de excitación y emisión

El estudio de la influencia de la anchura de las rendijas de excitación y emisión sobre la señal analítica se llevó a cabo en todos los casos excepto en los sensores en los cuales se empleó la quimioluminiscencia como técnica de detección. Para este estudio, se inserta un volumen de analito y, una vez fijado en la zona de detección y alcanzada la señal máxima, se detiene el flujo para medir la señal analítica a distintos valores de anchura de rendijas. Para estudiar cómo varía la señal con la rendija de excitación se mantenía fija la rendija de emisión y se variaba la de excitación. Y viceversa para la anchura de rendija de emisión.

Es necesario obtener elevadas señales correspondientes al analito, y bajas señales de fondo debidas a la emisión del soporte sólido. En la tabla siguiente se muestran a modo de ejemplo los resultados obtenidos para el sensor fluorescente monoparámetro para la determinación de bitertanol.

Tabla V.5. Estudio de rendijas de excitación y emisión para el bitertanol.

<i>R_{excitación}</i>	<i>R_{emisión 5 nm}</i>		<i>R_{emisión 10 nm}</i>		<i>R_{emisión 20 nm}</i>	
	Línea base ¹	BIT ²	Línea base ¹	BIT ²	Línea base ¹	BIT ²
2.5 nm	N.E.	N.E.	4	10	25	35
5 nm	11	20	45	70	160	320
10 nm	N.E.	NE	165	290	SAT	SAT
20 nm	N.E.	NE	380	475	SAT	SAT

NE: No ensayado.

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

¹ Intensidad de fluorescencia debida al soporte sólido (línea base), I.R.F.

² Intensidad de fluorescencia de bitertanol (neta), I.R.F.

Como se puede observar en la tabla anterior, a valores mayores de rendijas, aumenta la señal de luminiscencia. Pero a la vez se observa el aumento producido en la señal de fondo que proporciona el soporte sólido. En este caso, como solución de compromiso entre una señal de fondo baja y un valor de intensidad de fluorescencia alto, se eligieron como valores de anchura de las rendijas de excitación y emisión 5 y 20 nm, respectivamente, ya que proporcionaban una elevada señal del analito además de una alta razón señal analito/ señal de soporte sólido.

4.4.2. Variables instrumentales para luminiscencia sensibilizada por terbio

En el caso de detección empleando luminiscencia sensibilizada por lantánido, es necesario optimizar el "delay time" o tiempo de retardo y el "gate time".

- El tiempo de retardo es el tiempo que tarda en comenzar a adquirir el equipo la señal de emisión tras producirse la excitación; esta variable nos proporciona la condición necesaria para que no se adquiriera señal de fluorescencia, sino sólo señal de luminiscencia retardada. En todos los casos se emplea 0.1 ms, tiempo suficiente para eliminar la señal de fluorescencia y, a la vez, obtener la máxima señal analítica, puesto que conforme pasa el tiempo la señal de luminiscencia va siendo cada vez menor.
- Por otra parte, el "gate time" es el tiempo que el equipo adquiere la señal analítica. En todos los sensores desarrollados se observaba el máximo de señal de luminiscencia empleando 3 ó 4 ms.

4.4.3. Voltaje del tubo fotomultiplicador.

La influencia del voltaje del tubo fotomultiplicador es una variable crítica en todos los sensores desarrollados. Al aumentar el voltaje, se produce un aumento en la señal luminiscente en todos los casos. Es de vital importancia conseguir el máximo aumento posible en la señal analítica pero teniendo en cuenta que la señal producida por el soporte sólido no sea demasiado grande. A modo de ejemplo se muestra en la siguiente tabla el estudio desarrollado para la furosemida.

Tabla V.6. Estudio del voltaje del tubo fotomultiplicador para la furosemida

Voltaje (V)	Línea base ¹	Furosemida ²
400	0	1
500	0	4
600	13	18
700	50	71
750	96	129
800	174	246
825	222	333
850	330	490

¹ Intensidad de fluorescencia debida al soporte sólido (línea base), I.R.F.

² Intensidad de fluorescencia de la furosemida (neta), I.R.F.

En el caso de usar detección quimioluminiscente, el aumento de la ganancia del tubo fotomultiplicador no influye en la señal producida por el soporte sólido, pero sí que produce una disminución en la repetitividad del sistema. Por consiguiente, se escogerá la máxima ganancia posible (para aumentar la señal debido al analito) que nos permita una buena repetitividad.

En la Tabla V.7. se resumen las variables estudiadas en este apartado en los distintos sensores desarrollados.

Tabla V.7. Resumen de variables instrumentales

Sensor	Rendijas ¹	Delay time; gate time	PMT ²
CBZ/CF/BNM	5/20		625
NFX	20/20	0.1 ms; 4 ms	500
FR/TRI	5/10		825
PA	20/20	0.1 ms; 3 ms	600
SA (QL)			1 ⁴
FBZ/OPP	5/20		600
BIT	5/20		600
LBT	340 ± 40/435 (390-510) ³		
PCT	340 ± 40/435 (390-510) ³		
AS (L.S.T.)	20/20	0.1 ms; 4 ms	600
Vit. C			1 ⁴
Vit. B2/B6	5/20		600

CBZ:/CF/BNM: Carbendazima/Carbofurano/Benomilo; NFX: Norfloxacino; FR/TRI: Furosemida/Triamtereno; PA: Ácido pipemídico; SA (QL): Ácido salicílico, sensor quimioluminiscente; FBZ/OPP: Fuberidazol/O-fenilfenol; BIT: Bitertanol; LBT: Labetalol; PCT: Paracetamol; AS (L.S.T.): Ácido salicílico, sensor luminiscente sensibilizado por terbio.

¹ Rendijas de excitación/emisión (nm/nm)

² Voltaje del tubo fotomultiplicador (V)

³ Se emplearon filtros para la excitación y la emisión

⁴ Ganancia del tubo fotomultiplicador

5. CALIBRACIÓN DE LOS OPTOSENSORES: PARÁMETROS ANALÍTICOS

En todos los sensores propuestos se ha empleado calibración univariante. La calibración univariante utiliza relaciones sencillas entre los datos independientes, entendidos como los valores de concentración, y los datos

dependientes, siendo éstos las señales analíticas (intensidad relativa de luminiscencia).

En los métodos univariantes se resuelve una única ecuación basada en una única señal analítica (en nuestro caso, luminiscencia: Fluorescencia, quimioluminiscencia o luminiscencia sensibilizada por lantánido) para predecir la concentración. Uno de los métodos más simples es la regresión lineal, en el que la señal analítica se relaciona con las concentraciones de los constituyentes mediante una ecuación polinómica de primer grado. La técnica más empleada es la regresión por mínimos cuadrados, que se emplea para resolver la ecuación del modelo relacionando los datos de la señal analítica con concentraciones conocidas de los constituyentes.

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

Para determinar las funciones de calibrado, las variables químicas, de flujo e instrumentales se mantuvieron fijas en los valores anteriormente optimizados, y se insertaron volúmenes iguales de disoluciones patrón de los analitos de diferente concentración registrándose las correspondientes señales analíticas.

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

Repetitividad

Con objeto de evaluar la precisión y repetitividad del método propuesto, para cada sensor se realizan inserciones sucesivas de diez disoluciones de

cada analito de igual concentración con el volumen o tiempo de muestra seleccionado en cada caso, midiendo la señal analítica. Un análisis estadístico de los datos proporciona la desviación estándar relativa (RSD) para cada sensor.

Límite de detección y cuantificación

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

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

donde:

Y_b : señal analítica media obtenida para el blanco

σ : desviación estándar para el blanco

Se admite como límite de detección el valor [318]:

$$Y_L = Y_b + 3\sigma$$

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

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

siendo m la pendiente de la recta de calibrado.

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

Se admite la siguiente definición [319]:

$$Y_Q = Y_b + 10\sigma$$

donde:

Y_Q : señal analítica correspondiente al límite de cuantificación.

Y_b : señal analítica obtenida para el blanco.

σ : desviación estándar para el blanco.

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

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

donde m es la pendiente de la recta de calibrado.

Para la determinación del límite de detección y cuantificación se insertó diez veces sucesivas el blanco de cada sensor, es decir, muestras que contenían todos los componentes excepto el/los analito/s, registrándose las señales analíticas para los volúmenes de muestra seleccionados.

Frecuencia de muestreo

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

Las variables hidrodinámicas del sistema (caudal y volumen / tiempo de muestra insertado) influyen en este parámetro, de forma que cuanto mayor sea el caudal y menor el volumen o tiempo de muestra, mayor será la frecuencia de muestreo.

A continuación se detallan los parámetros analíticos obtenidos para cada uno de los sensores descritos.

5.1. Optosensores desarrollados empleando válvulas rotatorias de seis vías

5.1.1. Optosensor para la determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo

Tabla V.8. Resumen de los parámetros analíticos del sensor triparámetro para la determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo.

Parámetro	CBZ	CF	BNM
Rango dinámico lineal / ng ml ⁻¹	80-1600	250-2700	150-2000
Límite de detección / ng ml ⁻¹	15	68	35
R.S.D. (%) (n= 10)	3.48 (400) ^a	3.21 (800) ^a	2.4 (700) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	7		

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹

5.1.2. Optosensor para la determinación de norfloxacinó

Tabla V.9. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de norfloxacinó.

Parámetro	Norfloxacinó
Rango dinámico lineal / ng ml ⁻¹	10 –150
Límite de detección / ng ml ⁻¹	1.5
R.S.D. (%) (n= 10)	1.82 (50) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	20

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹.

5.2. Optosensores desarrollados empleando un sistema de multiconmutación.

5.2.1. Optosensor para la determinación de furosemida y triamtereno.

Tabla V.10. Resumen de los parámetros analíticos del sensor biparámetro para la determinación de furosemida y triamtereno.

Parámetro	Furosemida	Triamtereno
Rango dinámico lineal / ng ml ⁻¹	50-1200	0.4-8
Límite de detección / ng ml ⁻¹	15	0.10
R.S.D. (%) (n= 10)	2.4 ^a	0.82 ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	10	

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹

5.2.2. Optosensor para la determinación de ácido pipemídico

Tabla V.11. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de ácido pipemídico.

Parámetro	Ácido pipemídico
Rango dinámico lineal / ng ml ⁻¹	6 – 200
Límite de detección / ng ml ⁻¹	1.8
R.S.D. (%) (n= 10)	2.1 (100) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	15

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹.

5.2.3. Optosensor para la determinación de ácido salicílico.

Tabla V.12. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico.

Parámetro	Ácido salicílico
Rango dinámico lineal / $\mu\text{g ml}^{-1}$	1 – 30
Límite de detección / $\mu\text{g ml}^{-1}$	0.3
R.S.D. (%) (n= 10)	3.1 (8) ^a
Frecuencia de muestreo / h^{-1}	30

^a Nivel de concentración en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

5.2.4. Optosensor para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol.

Tabla V.13. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico.

Parámetro	FBZ	OPP
Rango dinámico lineal / ng ml^{-1}	0.6-13	20-350
Límite de detección / ng ml^{-1}	0.18	6.1
R.S.D. (%) (n= 10)	2.3 (6) ^a	3.9 (200) ^a
Frecuencia de muestreo / h^{-1}		12

^a Nivel de concentración en ng ml^{-1}

5.2.5. Optosensor para la determinación de bitertanol.

Tabla V.14. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de bitertanol.

Parámetro	Bitertanol
Rango dinámico lineal / mg kg ⁻¹	0.045 – 1
Límite de detección / mg kg ⁻¹	0.014
R.S.D. (%) (n= 10)	1.8 (0.15) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	15

^a Nivel de concentración en mg kg⁻¹.

5.3. Optosensores desarrollados empleando el análisis por inyección secuencial.

5.3.1. Optosensor para la determinación de labetalol.

Tabla V.15. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de labetalol.

Parámetro	Labetalol
Rango dinámico lineal / ng ml ⁻¹	10 – 250
Límite de detección / ng ml ⁻¹	3.3
R.S.D. (%) (n= 10)	3.4 (100) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹	10

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹.

5.3.2. Optosensor para la determinación de paracetamol.

Tabla V.16. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de paracetamol.

Parámetro	Paracetamol
Rango dinámico lineal / $\mu\text{g ml}^{-1}$	6.6 – 80
Límite de detección / $\mu\text{g ml}^{-1}$	2
R.S.D. (%) (n= 10)	2.5 (20) ^a
Frecuencia de muestreo / h^{-1}	10

^a Nivel de concentración en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

5.3.3. Optosensor para la determinación de ácido salicílico.

Tabla V.17. Resumen de los parámetros analíticos del sensor monoparámetro para la determinación de ácido salicílico

Parámetro	Ácido salicílico
Rango dinámico lineal / ng ml^{-1}	150 – 2500
Límite de detección / ng ml^{-1}	45.5
R.S.D. (%) (n= 10)	2.71 (500) ^a
Frecuencia de muestreo / h^{-1}	14

^a Nivel de concentración en ng ml^{-1} .

5.3.4. Optosensor para la determinación de ácido ascórbico, riboflavina y piridoxina.

Tabla V.18. Resumen de los parámetros analíticos del doble sensor para la determinación de ácido ascórbico, riboflavina y piridoxina.

Parámetro	Piridoxina	Riboflavina	Ácido ascórbico
Rango dinámico lineal / $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.4-4	0.026-0.55	30-150
Límite de detección / $\mu\text{g mL}^{-1}$	0.12	0.008	9.1
R.S.D. (%) (n= 10)	3.2 (2) ^a	2.9 (0.2) ^a	4.3 (50) ^a
Frecuencia de muestreo / h ⁻¹		8	

^a Nivel de concentración en $\mu\text{g mL}^{-1}$

6. ESTUDIO DEL EFECTO DE POSIBLES ESPECIES INTERFERENTES

Cuando se optimiza un método basado en un optosensor en flujo, es necesario estudiar la selectividad que presenta el método propuesto a otras especies potencialmente presentes en las muestras a las cuales se va a aplicar el optosensor.

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

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

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

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

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

6.1. Optosensores desarrollados empleando válvulas rotatorias de seis vías

6.1.1. Optosensor para la determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo

Este estudio se realizó con especies inorgánicas y otros pesticidas orgánicos (algunos de ellos con fluorescencia nativa) debido a que este optosensor se aplicaría a muestras de aguas naturales. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, y puede observarse la gran tolerancia para todas las especies inorgánicas y una tolerancia suficientemente alta como para evitar interferencias en el estudio llevado a cabo con pesticidas.

Tabla V.19. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor triparámetro para la determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo.

Especies extrañas	Tolerancia interferente / analito (m/m)		
	CBZ (500) ^a	CF (1000) ^a	BNM (1000) ^a
CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , Na ⁺ , NO ₃ ⁻ , Cl ⁻ , SO ₄ ²⁻ , AcO ⁻ , K ⁺ , NH ₄ ⁺ ,	2000 ^c	1000 ^c	1000 ^c
Aldicarb ^b	20 ^c	10 ^c	10 ^c
Metiocarb ^b	20 ^c	10 ^c	10 ^c
Bendiocarb ^b	20 ^c	10 ^c	10 ^c
Imazalil	20 ^c	10 ^c	10 ^c
Simazina	20 ^c	10 ^c	10 ^c
Morestán ^b	10	5	5
Aminocarb ^b	10	5	5

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹

^b Fluoróforo

^c Máxima relación ensayada

6.1.2. Optosensor para la determinación de norfloxacino

En este caso las especies estudiadas como posibles interferentes son aquellas especies presentes en fluidos biológicos, como ácido úrico y algunos iones. Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indican que los límites de tolerancia obtenidos son bastante altos. Esta alta selectividad se debe a la separación que se lleva a cabo en el soporte sólido, que permite la separación del analito del resto de componentes de la matriz que no interaccionan con el soporte sólido, así como a la selectividad proporcionada por la luminiscencia sensibilizada por lantánido.

Tabla V.20. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor monoparámetro para la determinación de norfloxacino.

Especies extrañas	Tolerancia interferente/analito (m/m) ^a
Na ⁺ , Mg ²⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	1000 ^b
I ⁻ , Zn ²⁺	850
Urea	500 ^b
Ácido úrico	450
Ca ²⁺ , NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , SO ₄ ²⁻	200 ^b
PO ₄ ³⁻	140
Cu ²⁺	50
Fe ³⁺	4

^a Para una concentración de norfloxacino de 100 ng ml⁻¹.

^b Máxima relación ensayada.

6.2. Optosensores desarrollados empleando un sistema de multiconmutación.

6.2.1. Optosensor para la determinación de furosemida y triamtereno.

En este caso las especies estudiadas como posibles interferentes son tanto aquellas que acompañan a estos principios activos en preparados farmacéuticos, como otras especies presentes en fluidos biológicos (esto último sólo para el triamtereno). Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indican que los límites de tolerancia obtenidos son superiores a los niveles que se encontrarán normalmente en el tipo de muestras a analizar. Esta alta selectividad se debe al soporte sólido, que permite la separación de los analitos del resto de componentes de la matriz que no interactúan con él.

Tabla V.21. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor biparámetro para la determinación de furosemida y triamtereno.

Especies extrañas	Tolerancia interferente / analito (m/m)	
	Furosemida (800) ^a	Triamtereno (6) ^a
Sacarosa, glucosa, lactosa	500 ^b	500 ^b
Urea, ácido úrico		1000 ^b
K ⁺ , Na ⁺ , Cl ⁻		1000 ^b
NO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻		200 ^b
Ca ²⁺ , Mg ²⁺ , Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Fe ³⁺ , Zn ²⁺ , I ⁻		100 ^b

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹

^b Máxima relación ensayada.

6.2.2. Optosensor para la determinación de ácido pipemídico

Al igual que en el caso anterior, se procedió a realizar este estudio con posibles especies interferentes presentes tanto en preparados farmacéuticos como en fluidos biológicos. En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos.

Tabla V.22. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor monoparámetro para la determinación de ácido pipemídico.

Especies extrañas	Tolerancia interferente/analito (m/m) ^a
Na ⁺ , K ⁺ , Cl ⁻	1000 ^b
Lactosa, sacarosa, almidón, urea, ácido úrico	500 ^b
CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , I ⁻	500 ^b
PO ₄ ³⁻	100
Mg ²⁺	60
Ca ²⁺	50
Cu ²⁺	20
Fe ³⁺	3

^a Para una concentración de ácido pipemídico de 75 ng ml⁻¹.

^b Máxima relación ensayada.

6.2.3. Optosensor para la determinación de ácido salicílico.

Para este optosensor se realizó el estudio de interferencias para especies que acompañan al analito en preparados farmacéuticos, empleando una concentración de ácido salicílico de 5 µg ml⁻¹. Las tolerancia observadas, expresadas como la relación masa interferente / masa analito fueron superiores a 500 para lactosa y sacarosa y a 5 para dipropionato de betametasona y ácido láctico. Estas relaciones son más de diez veces superiores a las encontradas en fármacos de este principio activo en la Farmacopea Española.

6.2.4. Optosensor para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol.

Este estudio se realizó con especies inorgánicas y otros pesticidas orgánicos (algunos de ellos con fluorescencia nativa) debido a que este optosensor se aplicaría a muestras de aguas naturales. Los resultados obtenidos se muestran en la siguiente tabla, observándose en todos los casos tolerancias suficientemente altas como para evitar cualquier interferencia por parte de estas especies en la determinación de los analitos.

Tabla V.23. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor biparámetro para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol.

Especies extrañas	Tolerancia interferente/analito (m/m)	
	Fuberidazol (10) ^a	Orto-fenilfenol (100) ^a
F ⁻ , Cl ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ²⁻ , Na ⁺ , K ⁺ , NH ₄ ⁺	10000 ^b	1000 ^b
Imazalil, simazina, morestán, clorosulfurón	1000 ^b	100 ^b
Bendiocarb, aminocarb	1000 ^b	80
Propoxur, quinmerac, imazaquín	200	100 ^b
Carbarilo	100 ^b	9
Carbofurano	100	50

^a Nivel de concentración en ng ml⁻¹

^b Máxima relación ensayada.

6.2.5. Optosensor para la determinación de bitertanol.

Para este estudio, al igual que para el calibrado, se emplearon estándares en matriz, fortificando los extractos obtenidos de las frutas con distintos niveles de pesticida. Se realizó este estudio con una concentración de 0.4 mg kg^{-1} (usando un extracto de plátano). La selectividad observada se debe tanto a la discriminación establecida por el uso del soporte sólido, como a la limpieza de los extractos obtenidos mediante el protocolo de extracción usado (una etapa de "clean-up"). Diferentes pesticidas que se suelen emplear junto con los analitos fueron ensayados, obteniendo unos valores de tolerancia bastante elevados para todos los compuestos estudiados, incluyendo aquellos que presentaban fluorescencia nativa.

Tabla V.24. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor monoparámetro para la determinación de bitertanol.

Especies extrañas	Tolerancia interferente/analito (m/m) ^a
Imazalil, aminocarb, bendiocarb, simazina	20 ^b
Carbendazima, fenitrotión	15
Carbofurano	4
Carbarilo	1

^a Para 0.4 mg kg^{-1} de bitertanol.

^b Máxima relación ensayada.

6.3. Optosensores desarrollados empleando el análisis por inyección secuencial.

6.3.1. Optosensor para la determinación de labetalol.

En este caso las especies estudiadas como posibles interferentes son aquellas especies presentes en fluidos biológicos, como ácido úrico y algunos iones, así como otros principios activos que puedan administrarse

conjuntamente. Los resultados, que se muestran en la tabla que aparece a continuación, indican que los límites de tolerancia obtenidos son muy superiores a las cantidades que pueden encontrarse en las muestras a analizar, incluyendo el caso de otros principios activos.

Tabla V.25. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor monoparámetro para la determinación de labetalol.

Especies extrañas	Tolerancia (interferente/analito) (m/m) ^a
Na ⁺ , K ⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺ , Cl ⁻ , I ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , SO ₄ ²⁻ , urea, glucosa, sacarosa, lactosa, almidón	1000 ^b
PO ₄ ³⁻ , ácido úrico	800
Zn ²⁺	200
Atenolol, hidroclorotiazida, bopindolol, acebutolol	10 ^b
Fe ³⁺ , Mn ²⁺	10
Amilorida, pindolol	4

^a Para una concentración de labetalol de 100 ng ml⁻¹.

^b Máxima relación ensayada.

6.3.2. Optosensor para la determinación de paracetamol.

Teniendo en cuenta que este optosensor se aplicará a preparados farmacéuticos, el estudio de interferencias se llevó a cabo para especies que acompañan al analito en preparados farmacéuticos, observando tolerancias mucho mayores que las habituales en fármacos, como se detalla a continuación. En particular, cabe destacar la alta tolerancia a la presencia de ácido acetilsalicílico (en comparación con las cantidades habitualmente presentes en fármacos), puesto que la interferencia de dicho compuesto es especialmente significativa en otros métodos descritos en bibliografía [320]. Hay que resaltar que el uso de filtros no era suficiente para evitar la

interferencia del ácido acetilsalicílico, sino que fue necesario emplear un espectrofluorímetro para aumentar la tolerancia del sensor, como se especifica en la tabla siguiente.

Tabla V.26. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del optosensor monoparámetro para la determinación de paracetamol.

Especies extrañas	Tolerancia (interferente/analito) (m/m) ^a
Fructosa, sacarina	100 ^b
Sacarosa, sorbitol	80
Lactosa	40
Cafeína, ácido benzoico	5 ^b
Ácido ascórbico, propifenazona	4
Ácido acetilsalicílico	1.6 ^c

^a Para una concentración de paracetamol de 20 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

^b Máxima relación ensayada.

^c Usando el espectrofluorímetro, longitudes de onda 350/535 nm.

6.3.3. Optosensor para la determinación de ácido salicílico.

En este caso también se realizó el estudio de interferencias para especies que acompañan al analito en preparados farmacéuticos, observando una gran selectividad del sensor desarrollado. Se empleó una concentración de ácido salicílico de 1 $\mu\text{g ml}^{-1}$ y se realizó el estudio para lactosa, sacarosa, dipropionato de betametasona y ácido láctico, encontrando tolerancias superiores a 1000 para los dos primeros compuestos y superiores a 10 para los dos últimos. Estas relaciones son más de diez veces superiores a las encontradas en fármacos de la Farmacopea Española.

6.3.4. Optosensor para la determinación de ácido ascórbico, riboflavina y piridoxina.

Puesto que este doble sensor se aplicará a la determinación de los analitos en preparados farmacéuticos, el estudio de interferencias se llevó a cabo para compuesto que suelen acompañar a los analitos en dichos fármacos. Además, también se estudió la posible interferencia de unos analitos sobre otros (teniendo en cuenta que en este diseño no se separan los tres analitos entre sí). Los resultados obtenidos demuestran una gran selectividad.

Tabla V.27. Estudio de especies interferentes: límites de tolerancia del doble optosensor para la determinación de ácido ascórbico, riboflavina y piridoxina.

Especies extrañas	Tolerancia interferente/analito (m/m)		
	Piridoxina (2) ^a	Riboflavina (0.2) ^a	Ác. ascórbico (50) ^a
Sacarosa, glucosa, lactosa	50 ^b	50 ^b	50 ^b
L-carnitina	20 ^b	20 ^b	1 ^b
Nicotinamida	12	20 ^b	1 ^b
Sacarina, ácido fólico	20 ^b	20 ^b	0.2 ^b
Tiamina	15	20 ^b	0.2 ^b
Pantotenato cálcico	20 ^b	16	0.12
Piridoxina, riboflavina			0.2 ^b
Ácido ascórbico	20 ^b	20 ^b	

^a Nivel de concentración en $\mu\text{g ml}^{-1}$.

^b Máxima relación ensayada.

7. APLICACIONES ANALÍTICAS

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

Tabla V.28. Aplicaciones para cada sensor desarrollado.

Sensor	Muestra
Carbendazima / Carbofurano / Benomilo	Aguas naturales
Norfloxacino	Fluidos biológicos
Furosemida / Triamtereno	Fármacos, fluidos biológicos
Ácido pipemídico	Fármacos, fluidos biológicos
Ácido salicílico ^a	Fármacos
Fuberidazol / Orto-fenilfenol	Aguas naturales
Bitertanol	Plátanos
Labetalol	Fármacos, fluidos biológicos
Ácido salicílico ^b	Fármacos
Paracetamol	Fármacos
Piridoxina / Riboflavina / Ácido ascórbico	Fármacos

^a Empleando multiconmutación; ^b Empleando SIA

7.1. Preparación de las muestras

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

Aguas naturales

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

Frutas (plátanos)

Para el optosensor descrito para el análisis de bitertanol en plátanos se empleó el método "QuEChERS" ("Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe") descrito por Anastassiades y Lehotay [321]. Este método está basado en una etapa de extracción líquido-líquido, seguida de una etapa de purificación mediante el empleo de PSA (amina primaria-secundaria) como sorbente. Con esta etapa de purificación se elimina un gran número de componentes de la matriz que pudiesen interferir, principalmente ácidos orgánicos y azúcares. A continuación se describe brevemente el procedimiento.

Se toman 15 g de una muestra de fruta (con cáscara y sin ningún tipo de tratamiento previo) previamente triturada y homogeneizada (1 Kg.) y se colocan en un tubo de centrifuga de 50 ml. A continuación se añaden 15 ml de acetonitrilo y se agita vigorosamente durante 1 minuto. Posteriormente se añaden 2.5 g de cloruro sódico y 6 g de sulfato de magnesio anhidro (MgSO_4) al tubo y se agita de nuevo durante 1 minuto. A continuación se centrifuga durante 3 minutos a 3700 rpm. Se toman 5 ml del sobrenadante y se llevan a un tubo de centrifuga de 15 ml, al cual se añaden 250 mg de PSA y 750 mg de MgSO_4 anhidro, para llevar a cabo la etapa de purificación. El tubo se agita energéticamente durante 20 segundos, y se centrifuga de nuevo (3 minutos, 3700 rpm.). Finalmente, se obtiene un extracto de acetonitrilo 100 % que se diluye 10 veces antes de realizar el análisis.

Fluidos biológicos

Los optosensores descritos para la determinación de norfloxacin, labetalol, ácido pipemídico y furosemida/triamtereno fueron aplicados a muestras fortificadas de orina y/o suero sanguíneo. El Hospital Universitario "Ciudad de Jaén" proporcionó las muestras de suero (obtenidas tras coagulación y posterior centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos). Las muestras de suero (una vez fortificadas) eran diluidas con la disolución necesaria y filtradas a través de filtros con diámetro de poro de 2.7 μm . Las muestras de orina eran diluidas con el medio optimizado para la muestra y no requerían filtración alguna.

Preparados farmacéuticos

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

Los comprimidos fueron molidos en un mortero de ágata y disueltos en el disolvente apropiado mediante sonicación durante 10 minutos. Los sobres y los contenidos de las cápsulas se disolvieron en el disolvente apropiado con ayuda de un baño ultrasonidos y se filtraron (cuando fue necesario). Las disoluciones y jarabes se diluyeron directamente (y se filtró cuando fue necesario).

7.2. Determinación en muestras reales

Para evaluar el potencial analítico y aplicabilidad de los métodos propuestos en esta Memoria, éstos fueron aplicados a la determinación de los analitos en muestras reales mediante el procedimiento descrito en cada caso. En todos los casos las medidas se realizaron por triplicado, para obtener la

media y la desviación estándar de los datos. A continuación se describen las principales aplicaciones ensayadas para cada uno de los métodos descritos en esta Memoria.

7.2.1. Optosensores desarrollados empleando válvulas rotatorias de seis vías

7.2.1.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE CARBENDAZIMA, CARBOFURANO Y BENOMILO

Este sensor se aplicó al análisis de cuatro muestras de aguas naturales. Las muestras de agua analizadas no contenían ninguno de los tres analitos estudiados; por tanto, para evaluar la precisión y la exactitud del método propuesto se realizó un estudio de recuperación de los tres pesticidas en aguas naturales, preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo con un volumen de muestra de 2000 μl a niveles de concentración entre 100 y 400 ng ml^{-1} para la carbendazima y entre 200 y 600 ng ml^{-1} para el benomilo y carbofurano. Como se puede ver en la siguiente tabla, en todos los casos las recuperaciones obtenidas fueron entorno al 100 %, con desviaciones estándares relativas menores de 3 %.

Tabla V.29. Estudios de recuperación del optosensor para la determinación de carbendazima, carbofurano y benomilo en aguas naturales fortificadas con distintos niveles de concentración de cada uno de los analitos

	CBZ		CF		BNM	
	Añadido (ng ml ⁻¹)	Recuperación ± RSD (%) ^a	Añadido (ng ml ⁻¹)	Recuperación ± RSD (%) ^a	Añadido (ng ml ⁻¹)	Recuperación ± RSD (%) ^a
Agua de pozo	100	100 ± 2	200	99 ± 1	200	100.6 ± 0.8
	200	100 ± 1	400	101 ± 1	400	98.1 ± 0.6
	400	97.9 ± 0.8	600	101.2 ± 0.8	600	96 ± 1
Agua de río	100	104 ± 2	200	98.6 ± 0.9	200	101 ± 1
	200	103 ± 2	400	100.8 ± 0.7	400	101.2 ± 0.5
	400	98 ± 1	600	101.6 ± 0.5	600	99 ± 1
Agua de pantano 1	100	103 ± 2	200	98 ± 2	200	101.9 ± 0.8
	200	102 ± 2	400	100.8 ± 0.8	400	98 ± 1
	400	98 ± 2	600	103 ± 1	600	97.6 ± 0.8
Agua de pantano 2	100	97 ± 2	200	99 ± 3	200	103 ± 2
	200	101 ± 1	400	101 ± 1	400	102 ± 2
	400	98.4 ± 0.9	600	102 ± 1	600	101 ± 1

^a n = 3

7.2.2. Optosensor para la determinación de norfloxacino

El optosensor desarrollado para la determinación de norfloxacino fue aplicado a muestras de orina y suero, obtenidas de voluntarios aparentemente sanos. Se analizaron 4 muestras de orina y 4 muestras de

suero; en todos los casos se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando las muestras con cantidades variables de norfloxacin. En el caso de orina, la fortificación se llevó a cabo para niveles de concentración entre 5 y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$; estos niveles de concentración son iguales o menores a los que se suelen encontrar en orina tras la administración del fármaco [168]. En el caso de suero, los niveles de concentración añadidos fluctuaron entre 2.5 y 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas siguientes, observándose recuperaciones cercanas al 100 % en todos los casos.

Tabla V.30. Estudios de recuperación del optosensor para la determinación de norfloxacin en muestras de orina fortificadas con distintos niveles de concentración de norfloxacin.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación \pm R.S.D. (%) ^a
Orina-1	10	95 \pm 2
	15	95.7 \pm 0.6
	20	99 \pm 2
Orina-2	5	92 \pm 2
	10	104 \pm 1
	15	107 \pm 2
Orina-3	5	105 \pm 3
	20	94 \pm 2
	40	102.4 \pm 0.4
Orina-4	5	102 \pm 2
	15	98 \pm 1
	30	104 \pm 2

^a n=3

Tabla V.31. Estudios de recuperación del optosensor para la determinación de norfloxacino en muestras de suero fortificadas con distintos niveles de concentración de norfloxacino.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación \pm R.S.D. (%) ^a
Suero-1	5	94.0 \pm 2
	7.5	104 \pm 2
	10	104 \pm 2
Suero-2	2.5	99 \pm 1
	10	92 \pm 1
	30	103 \pm 2
Suero-3	2.5	91 \pm 2
	5	108 \pm 2
	10	95 \pm 1
Suero-4	2.5	104.8 \pm 0.8
	10	96 \pm 1
	20	104 \pm 1

^a n=3

7.2.2. Optosensores desarrollados empleando un sistema de multiconmutación.

7.2.2.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FUROSEMIDA Y TRIAMTERENO.

El optosensor para la determinación de furosemida y triamtereno se aplicó al análisis de preparados farmacéuticos (para ambos analitos) y de suero y orina (para triamtereno). Los preparados farmacéuticos analizados (fármacos de la Farmacopea Española) tenían la composición siguiente:

- *Comprimidos Salidur (Aventis)*: 40 mg de furosemida y 25 mg de triamtereno por comprimido.
- *Comprimidos Furosemida Cinfa (Cinfa)*: 40 mg de furosemida por

comprimido.

- *Ampollas Seguril (Aventis)*: 1 ampolla (2 ml) contienen 20 mg de furosemida.
- *Comprimidos Triniagar (Daker S. A.)*: 50 mg de triamtereno y 50 mg de mebuticida por comprimido.

En todos los casos de productos comerciales analizados, los resultados obtenidos con el método propuesto concordaban con las composiciones dadas por el fabricante. Los resultados para los productos farmacéuticos analizados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla V.32. Aplicación del optosensor de furosemida y triamtereno para su determinación en diversos preparados farmacéuticos.

Muestra	Furosemida		Triamtereno	
	Cantidad según fabricante (mg)	Encontrado \pm SD (mg) ^a	Cantidad según fabricante (mg)	Encontrado \pm SD (mg) ^a
	Salidur	40	41.6 \pm 0.8	25
Furosemida cinfa	40	38.2 \pm 0.7	-	-
Seguril	20	20.6 \pm 0.9	-	-
Triniagar	-	-	50	53.1 \pm 0.8

^a n=3

Además de comparar los resultados obtenidos con la composición proporcionada por el fabricante para dichos productos farmacéuticos, también se procedió a un estudio de recuperación, fortificando dichos fármacos con composiciones variables de uno o ambos analitos, según el caso. Los resultados (recuperaciones cercanas al 100 % en todos los casos) se muestran en la tabla siguiente.

Tabla V.33. Estudios de recuperación del optosensor para la determinación de furosemida y triamtereno en productos farmacéuticos fortificados con distintos niveles de concentración de los analitos.

Muestra	F u r o s e m i d a		T r i a n t e r e n o	
	Añadido (mg)	Recuperación \pm R.S.D. (%) ^a	Añadido (mg)	Recuperación \pm R.S.D. (%) ^a
Salidur	20	103 \pm 1	25	94.3 \pm 0.6
	40	98 \pm 2	50	96 \pm 1
	50	96.1 \pm 0.8	75	98 \pm 1
Furosemida cinfa	15	96 \pm 1	-	-
	30	101 \pm 3	-	-
	60	101.0 \pm 0.5	-	-
Triniagar	-	-	50	98 \pm 2
	-	-	100	98 \pm 2
	-	-	150	104 \pm 2
Seguril	10	102 \pm 2	-	-
	20	98 \pm 2	-	-
	40	100 \pm 1	-	-

^a n=3

Además de aplicar el sensor desarrollado a la determinación de los analitos en fármacos, también se intentó su aplicación a muestras biológicas (suero y orina). En el caso de la furosemida, debido a su mayor límite de cuantificación y al elevado efecto matriz y alta señal de fluorescencia de la matriz, su determinación no fue posible. Por tanto, el optosensor fue aplicado sólo a la determinación de triamtereno en suero y orina obtenidos de voluntarios aparentemente sanos. Se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando cada muestra con los niveles de triamtereno observados tanto en orina como en suero después de la administración de un fármaco [198, 322]. Los resultados obtenidos en ambas matrices se detallan en las siguientes tablas.

Tabla V.34. Estudios de recuperación para la determinación de triamtereno en muestras de orina fortificadas con distintos niveles de concentración de los analitos.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	R.S.D. (%) ^a
Orina-1	0.09	100	2
	0.18	101	1
	0.3	101	3
Orina-2	0.5	98.9	0.3
	0.75	106	2
	1	103.8	0.4
Orina-3	0.08	101	2
	0.15	100	1
	0.25	98	4
Orina-4	0.3	102.1	0.9
	0.6	107	1
	1.5	99.6	0.4
Orina-5	0.5	99	1
	1	102	2
	2	100.3	0.8

^a n=3

Tabla V.35. Estudios de recuperación para la determinación de triamtereno en muestras de suero fortificadas con distintos niveles de concentración de los analitos.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	R.S.D. (%) ^a
Suero-1	0.19	105	1
	0.32	104.1	0.8
	0.48	106	1
Suero-2	0.24	98.5	0.9
	0.48	100	1
	0.8	100	2
Suero-3	0.5	99	3
	1	95.3	0.4
	1.6	97.5	0.6
Suero-4	0.95	102	2
	1.9	98	3
	3.2	98	1
Suero-5	0.25	99	1
	1	102	2
	2	101	1

^a n=3

7.2.2.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO PIPEMÍDICO

El optosensor para la determinación de ácido pipemídico fue aplicado al análisis de preparados farmacéuticos, suero y orina. Todos los fármacos utilizados fueron de la Farmacopea Española, con composición:

- *Comprimidos Galusan (Almirall Prodesfarma):* 400 mg de ácido pipemídico por comprimido.
- *Comprimidos Nuril (Almirall Prodesfarma):* 400 mg de ácido pipemídico por comprimido.

En los fármacos analizados, el contenido de ácido pipemídico obtenido por el método desarrollado concuerda perfectamente con el proporcionado por el fabricante. Además, también se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando con diferentes cantidades de ácido pipemídico los fármacos anteriormente analizados. Todos los resultados pueden observarse en la siguiente tabla.

Tabla V.36. Aplicación del optosensor de ácido pipemídico a la determinación de su contenido en diversos preparados farmacéuticos. Estudio de recuperación fortificando dichos fármacos con cantidades variables de ácido pipemídico.

	Cantidad según fabricante (mg)	Encontrado (mg)	R.S.D. (%)^a
	400	394	1
Galusan^a	Cantidad añadida (mg)	Recuperación (%)	
	250	94	2
	500	101	1
	750	102	2
	Cantidad según fabricante (mg)	Encontrado (mg)	R.S.D. (%)^a
	400	409	1
Nuril^b	Cantidad añadida (mg)	Recuperación (%)	
	350	105	1
	550	94	2
	750	99	2

^a n=3

Además de los análisis de preparados farmacéuticos también se realizaron estudios de recuperación en suero y orina, añadiendo cantidades conocidas del analito a distintos niveles de concentración, de forma que las concentraciones fuesen del nivel que se espera encontrar en esas muestras tras una doble dosis diaria de 400 mg de ácido pipemídico [323, 324]: 1-85 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en orina y 0.8-3.6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ en suero. Los resultados de las recuperaciones, próximos al 100 % en todos los casos, se muestran en las tablas siguientes.

Tabla V.37. Estudios de recuperación para la determinación de ácido pipemídico en muestras de orina fortificadas con distintos niveles de concentración del analito.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	R.S.D. (%) ^a
Orina-1	10	100	2
	20	103.5	0.8
	30	102	1
Orina-2	1	102	1
	2	102	2
	3	102	3
Orina-3	35	103.9	0.6
	50	96	2
	85	99	1
Orina-4	5	104	2
	7.5	104	1
	10	100	2

^a n=3**Tabla V.38.** Estudios de recuperación para la determinación de ácido pipemídico en muestras de suero fortificadas con distintos niveles de concentración del analito.

Muestra	Cantidad añadida ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperación (%)	R.S.D. (%) ^a
Suero-1	1	102	1
	1.6	103	2
	2.4	106	2
Suero-2	0.8	95	2
	1.3	98	2
	1.8	105	2
Suero-3	1.2	105	1
	2.8	107	2
	3.6	102	2
Suero-4	1.3	97.5	0.5
	2.2	104	2
	3.2	98	2

^a n=3

7.2.2.3. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO.

El optosensor desarrollado para ácido salicílico se aplicó a su determinación en preparados farmacéuticos de la Farmacopea Española. La composición de dichos fármacos fue la siguiente:

- *Diprosalic Solución (Essex S. A.):* 0.5 mg de betametasona dipropionato y 20 mg de ácido salicílico por gramo de disolución.
- *Pyralvex Solución (Norgine Pharma):* extracto de ruibarbo y 0.01 g de ácido salicílico en 1 ml de solución.
- *Solución antiverrugas ISDIN (ISDIN S. A.):* 16.7 g de ácido láctico y 16.7 g de ácido salicílico por 100 ml de solución.
- *Loción Acnosán Descansa (Laboratorios Bescansa S. L.):* 0.5 % de alcanfor, 2 % de ácido salicílico, 59 % de etanol, aroma y agua.

En todos los productos comerciales analizados, los resultados obtenidos con el

método propuesto concordaban perfectamente con las composiciones dadas por el fabricante. Además de comprobar estos resultados, también se realizó un estudio de recuperación sobre los fármacos analizados, fortificándolos con cantidades variables del analito; las recuperaciones obtenidas en todos los casos fueron cercanas al 100 %. Los datos se detallan en la tabla siguiente.

Tabla V.39. Aplicación del optosensor de ácido salicílico a la determinación de su contenido en diversos preparados farmacéuticos. Estudio de recuperación fortificando dichos fármacos con cantidades variables de ácido salicílico.

Diprosalic	Cantidad según fabricante (mg/g)	Encontrado (mg/g)	R.S.D. (%) ^a
	20	21	4
	Añadido (mg/g)	Recuperado (%)	
	10	95	3
	20	104	2
	50	106	4
Pyrvalvex	Cantidad según fabricante (mg/ml)	Encontrado (mg/ml)	R.S.D. (%) ^a
	10	10.7	4
	Añadido (mg/ml)	Recuperado (%)	
	15	103	3
	30	103	2
	50	92	4
Antiverrugas	Cantidad según fabricante (g/100 ml)	Encontrado (g/100 ml)	R.S.D. (%) ^a
	16.7	15.6	4
	Añadido (g/100 ml)	Recuperado (%)	
	10	105	3
	20	97	1
	30	97	2
Acnosan	Cantidad según fabricante (g/100 ml)	Encontrado (g/100 ml)	R.S.D. (%) ^a
Bescansa	2	2.1	4
	Añadido (g/100 ml)	Recuperado (%)	
	1.2	96	4
	2.5	104	1
	4	102	4

^a n=3

7.2.2.4. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE FUBERIDAZOL Y ORTO-FENILFENOL.

El sensor desarrollado para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol se aplicó al análisis de cuatro muestras de aguas naturales (dos aguas de pozo y dos aguas de río). En las muestras de agua analizadas no se detectó la presencia de ninguno de los analitos. Teniendo esto en cuenta, para

evaluar la precisión y la exactitud del método propuesto se realizó un estudio de recuperación de los dos analitos en aguas naturales, preparando muestras de agua fortificadas a distintos niveles de concentración. Los estudios se llevaron a cabo a niveles de concentración entre 2 y 12 ng mL⁻¹ para el fuberidazol y entre 40 y 300 ng mL⁻¹ para el orto-fenilfenol. Las recuperaciones obtenidas eran cercanas al 100 %, con una desviación estándar relativa inferior al 4 %, como puede observarse en la tabla que viene a continuación.

Tabla V.40. Estudios de recuperación para el optosensor desarrollado para la determinación de fuberidazol y orto-fenilfenol en aguas naturales fortificadas con distintos niveles de concentración de dichos analitos.

	Fuberidazol			Orto-fenilfenol		
	Añadido (ng mL ⁻¹)	Recuperado (%)	R.S.D. ^a (%)	Añadido (ng mL ⁻¹)	Recuperado (%)	R.S.D. ^a (%)
	6	102	2	150	94	3
Agua de pozo-1	8	97	3	200	97	3
	10	97	2	250	106	4
	4	95.1	0.9	100	96	2
Agua de río-1	6	96	3	140	101	1
	10	104	1	180	101	4
	2	98	2	150	94	4
Agua de pozo-2	5	98	3	200	101	2
	7	105	3	300	96	2
	5	104.0	0.7	40	106	1
Agua de río-2	7	97	2	80	101	3
	12	101	1	200	98	3

^a n=3.

7.2.2.5. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE BITERTANOL.

El optosensor para la determinación de bitertanol se aplicó al análisis de plátanos. Teniendo en cuenta que no se detectó la presencia de bitertanol en las muestras analizadas, se llevaron a cabo estudios de recuperación de forma que se evaluaba el proceso completo, tanto la extracción del analito de la matriz de fruta como la etapa de determinación. Se tomaba una muestra de fruta de aproximadamente 50 g, (a partir de 1 kg de muestra previamente triturada y homogeneizada) y se añadía aproximadamente 1 ml de estándar en metanol de una concentración apropiada (en función del nivel de fortificación) y se usaba un mortero para asegurar la homogeneidad de la muestra. Posteriormente, se dejaba a temperatura ambiente (para facilitar la eliminación de metanol) durante un mínimo de una noche y se procedía a su extracción y análisis, siguiendo el procedimiento descrito en la Sección 7.1.

Las concentraciones de bitertanol utilizadas para fortificar las muestras estaban entre 0.05 y 0.6 mg kg⁻¹. Las recuperaciones obtenidas fluctuaban entre el 81 % y el 111 %, con desviaciones estándar relativas inferiores al 3 % en todos los casos. A continuación pueden observarse los resultados.

Tabla V.41. Estudios de recuperación para el optosensor de bitertanol para muestras de plátanos fortificadas con distintos niveles de concentración del analito.

Muestra	Añadido (mg kg ⁻¹)	Recuperación (%)	R.S.D. ^a (%)
Plátano-1	0.05	111	1
	0.2	94.7	0.7
	0.5	82	1
Plátano-2	0.2	95	2
	0.4	100	2
	0.6	115	2
Plátano-3	0.1	110	1
	0.2	98	2
	0.4	100	1
Plátano-4	0.05	91	2
	0.3	108	1
	0.5	98	2

^a n=3.

7.2.3. Optosensores desarrollados empleando el análisis por inyección secuencial.

7.2.3.1. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE LABETALOL.

El optosensor para la determinación de labetalol se aplicó a un producto farmacéutico (de la Farmacopea Española) y a muestras de orina obtenidas de voluntarios aparentemente sanos. En el caso del fármaco analizado, su composición es la siguiente:

- *Trandate 100 mg (Trandate)*: 100 mg de labetalol

Según el método propuesto, encontramos 98 mg de labetalol, con una desviación estándar relativa (n=3) del 2%. Este resultado concuerda con el

proporcionado por el fabricante.

En el caso de las muestras de orina, se llevó a cabo un estudio de recuperación fortificando las muestras a niveles de concentración de labetalol entre 0.5 y 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$, que son las concentraciones normalmente encontradas en orina [234]. En la Tabla V.42 pueden observarse las recuperaciones, cercanas al 100 % en todos los casos.

Tabla V.42. Estudios de recuperación para el optosensor de labetalol para muestras de orina fortificadas con distintos niveles de concentración del analito.

Muestra	Añadido ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperado (%)	R.S.D. ^a (%)
Orina-1	1.8	99	4
	3	104	3
	4	104	2
Orina -2	2	104	2
	4	105	4
	6	98	2
Orina -3	3	102	2
	5	97	2
	8	97	1
Orina -4	2.5	104	3
	4	97	2
	6	102	4
Orina -5	0.5	104	4
	0.8	96	3
	1.2	99	3

^a n=3.

7.2.3.2. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE PARACETAMOL.

El optosensor para la determinación de paracetamol se aplicó a la determinación del principio activo en preparados farmacéuticos obtenidos

de las Farmacopeas Checa y Española. Las composiciones de los preparados farmacéuticos analizados fueron las siguientes:

- *Sobres Algidol (Almirall Prodesfarma)*: 650 mg de paracetamol, 10 mg de fosfato de codeína y 500 mg de ácido ascórbico por sobre.
- *Sobres Coldrex (gsk)*: 750 mg de paracetamol, 10 mg de hidrocloreuro de fenilefrina y 50 mg de ácido ascórbico por sobre.
- *Comprimidos Tomapyrin (Boehringer Ingelheim)*: 250 mg de paracetamol, 250 mg de ácido acetilsalicílico y 50 mg de cafeína por comprimido.
- *Comprimidos Paralen (Zentiva)*: 500 mg de paracetamol por comprimido.
- *Comprimidos Valetol (Herbacos-Bofarma)*: 150 mg de paracetamol, 300 mg de propifenazona y 50 mg de cafeína por comprimido.

Los resultados obtenidos por el método propuesto coinciden con los proporcionados por el fabricante, como se observa en la Tabla V.43.

Tabla V.43. Aplicación del optosensor de paracetamol para su determinación en fármacos.

Fármaco	Cantidad según fabricante (mg)	Encontrado (mg)	R.S.D. ^a (%)
Algidol	650	631	3
Coldrex	750	722	4
Tomapyrin	200	205	3
Paralen	500	525	1
Valetol	150	144	2

^a n=3

Además de comprobar los resultados obtenidos con los proporcionados por el fabricante, también se procedió a realizar un estudio de recuperación sobre los mismos fármacos analizados, fortificándolos con cantidades variables de paracetamol. Los resultados, cercanos al 100 % en todos los casos, se muestran en la tabla siguiente.

Tabla V.44. Estudios de recuperación para el optosensor de paracetamol para preparados farmacéuticos fortificadas con distintos niveles de concentración de paracetamol.

Fármaco	Añadido (mg)	Recuperado (%)	R.S.D. ^a (%)
Algidol	500	102	2
	1000	98	2
	1500	104	3
Coldrex	600	101	1
	1200	96	3
	2000	106	2
Tomapyrin	200	103	4
	300	104	3
	400	99	2
Paralen	300	104	2
	600	97	3
	900	106	3
Valetol	100	104	3
	300	96	1
	500	96	2

^a n=3.

7.2.3.3. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO.

El optosensor desarrollado para ácido salicílico se aplicó a su determinación en preparados farmacéuticos de la Farmacopea Española. La composición de dichos fármacos fue la siguiente:

- *Diprosalic Solución (Essex S. A.):* 0.5 mg de betametasona dipropionato y 20 mg de ácido salicílico por gramo de disolución.
- *Pyralvex Solución (Norgine Pharma):* extracto de ruibarbo y 0.01 g de ácido salicílico en 1 ml de solución.
- *Solución antiverrugas ISDIN (ISDIN S. A.):* 16.7 g de ácido láctico y 16.7 g de ácido salicílico por 100 ml de solución.
- *Loción Acnosán Descansa (Laboratorios Bescansa S. L.):* 0.5 % de alcanfor, 2 % de ácido salicílico, 59 % de etanol, aroma y agua.

En todos los productos comerciales analizados, los resultados obtenidos con el método propuesto concordaban perfectamente con las composiciones dadas por el fabricante. Además de comprobar estos resultados, también se realizó un estudio de recuperación sobre los fármacos analizados, fortificándolos con cantidades variables del analito; las recuperaciones obtenidas en todos los casos fueron cercanas al 100 %. Los datos se detallan en la tabla siguiente.

Tabla V.45. Aplicación del optosensor de ácido salicílico a la determinación de su contenido en diversos preparados farmacéuticos. Estudio de recuperación fortificando dichos fármacos con cantidades variables de ácido salicílico.

	Cantidad según fabricante (g/100 ml)	Encontrado (mg/g)	R.S.D.^a (%)
	2	1.9	2
Acnosan	Añadido (mg/g)	Recuperación (%)	
Bescansa	2	93	3
	3	103	1
	4	97	2
	Cantidad según fabricante (mg/ml)	Encontrado (mg/ml)	R.S.D.^a (%)
	10	10.8	4
Pyralvex	Añadido (mg/ml)	Recuperación (%)	
	10	106	3
	20	93	1
	50	97	4
	Cantidad según fabricante (mg/g)	Encontrado (mg/g)	R.S.D.^a (%)
	20	19.2	1
Diprosalic	Añadido (g/100 ml)	Recuperación (%)	
	20	103	2
	40	104	1
	60	97	2
	Cantidad según fabricante (g/100 ml)	Encontrado (g/100 ml)	R.S.D.^a (%)
	16.7	16.3	0.9
Antiverrugas	Añadido (g/100 ml)	Recuperación (%)	
ISDIN	10	102	4
	20	94	4
	40	99	2

^a n=3.

7.2.3.4. OPTOSENSOR PARA LA DETERMINACIÓN DE ÁCIDO ASCÓRBICO, RIBLOFAVINA Y PIRIDOXINA.

El optosensor desarrollado para las vitaminas ácido ascórbico, ribloflavina y piridoxina se aplicó a su determinación en preparados farmacéuticos

obtenidos de la Farmacopea Española. La composición de los fármacos fue la siguiente:

- *Ampollas Benadon (Roche)*: 300 mg de clorhidrato de piridoxina por ampolla.
- *Tabletas Redoxon (Bayer)*: 1000 mg de ácido ascórbico por tableta.
- *Sobre Cebion 500 (Merck)*: sacarosa, E-110 y 500 mg de ácido ascórbico por sobre.
- *Solución Hepadif (Laboratorios Reig Jofré)*: 30 mg de orotato de carnitina, 15 mg de carnitina, 2.5 mg de extracto hepático (fracción antitóxica), 5 mg de clorhidrato de piridoxina, 0.1 mg de riboflavina y 25 µg de cianocobalamina.
- *Sobres Hidropolivit C (Laboratorios Menarini)*: 500 mg de ácido ascórbico, 2500 U. I. de retinol, 2000 U. I. de colecalciferol, 5 mg de tocoferol, 10 mg de tiamina, 5 mg de riboflavina, 8 mg de pantotenato cálcico, 30 mg de nicotinamida, 10 mg de clorhidrato de piridoxina, 0.25 mg de biotina y 10 mg de sacarina sódica por sobre.
- *Comprimidos Redoxon Complex (Roche)*: 1500 U. I. de vitamina A, 2 mg de tiamina, 2 mg de riboflavina, 20 mg de vitamina PP, 2.5 mg de piridoxina, 11.6 mg de pantotenato cálcico, 250 µg de biotina, 5 µg de cianocobalamina, 100 mg de ácido ascórbico, 400 U. I. de vitamina D, 10 mg de vitamina E, 262 mg de $\text{CaC}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_4$, 12.5 mg de Fe, 40 mg de $\text{MgC}_3\text{H}_5(\text{OH})_2\text{PO}_4$, 2.05 mg de $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 45 mg de P, 0.39 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 2.3 mg de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.25 mg de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por comprimido.
- *Solución oftalmológica Protovit (Bayer)*: 1.5 mg de riboflavina, 2 mg de piridoxina y 80 mg de ácido ascórbico por mililitro de solución.

Los resultados logrados con el método propuesto concuerdan con los proporcionados por el fabricante, como puede observarse en la Tabla V.47.

Tabla V.46. Aplicación del optosensor para ácido ascórbico, riboflavina y piridoxina a la determinación de su contenido en diversos preparados farmacéuticos.

Muestra	B6		B2		Ácido ascórbico	
	Cantidad según fabricante	Encontrado (mg) ^a	Cantidad según fabricante	Encontrado (mg) ^a	Cantidad según fabricante	Encontrado (mg) ^a
	(mg)		(mg)		(mg)	
Benadon	300	298 (3)	-	-	-	-
Redoxon	-	-	-	-	1000	1041 (2)
Cebion 500	-	-	-	-	500	507 (4)
Hepadif	5	4.8 (3)	0.1	0.106 (1)	-	-
Hidropolivit C	10	9.8 (4)	5	4.6 (2)	500	519 (1)
Redoxon complex	2.5	2.6 (3)	2	1.99 (2)	100	95 (3)
Protovit	2	1.9 (1)	1.5	1.6 (2)	80	83 (4)

^a Entre paréntesis, R.S.D. (%) para n=3.

Además de comparar los resultados obtenidos con las cantidades proporcionadas por el fabricante, también se procedió a realizar un estudio de recuperación, fortificando los mismos fármacos analizados con cantidades variables de las vitaminas. Como puede observarse en la Tabla V.48 las recuperaciones fueron cercanas al 100 % en todos los casos, con desviaciones estándar relativas inferiores al 4.5 %.

Tabla V.47. Estudio de recuperación para el optosensor para ácido ascórbico, piridoxina y riboflavina, fortificando preparados farmacéuticos con cantidades variables de los analitos.

Muestra	Piridoxina		Riboflavina		Ácido ascórbico	
	Añadido (mg)	Recuperado \pm R.S.D. (%) ^a	Añadido (mg)	Recuperado \pm R.S.D. (%) ^a	Añadido (mg)	Recuperado \pm R.S.D. (%) ^a
Benadon	100	97 \pm 2	-	-	-	-
	300	103 \pm 3	-	-	-	-
	500	102 \pm 3	-	-	-	-
Redoxon	-	-	-	-	500	102 \pm 1
	-	-	-	-	1000	104 \pm 3
	-	-	-	-	1500	97 \pm 3
Cebion 500	-	-	-	-	500	97 \pm 2
	-	-	-	-	1000	105 \pm 4
	-	-	-	-	1500	101 \pm 4
Hepadif	5	97 \pm 3	0.1	107 \pm 1	-	-
	10	98 \pm 2	0.2	94.8 (0.6)	-	-
	15	103 \pm 2	0.3	99 \pm 2	-	-
Hidropolivit C	10	103.2 \pm 0.7	5	101 \pm 4	400	97 \pm 3
	20	97 \pm 1	10	104 \pm 2	600	102 \pm 2.
	30	98 \pm 2	20	95 \pm 3	1000	99 \pm 1
Redoxon complex	2	97 \pm 1	2	101 \pm 3	100	98 \pm 5
	4	101 \pm 2	4	98 \pm 2	200	104 \pm 2
	6	98 \pm 2	6	99 \pm 3	300	95 \pm 3
Protovit	2	103 \pm 3	1	100 \pm 4	100	97 \pm 2
	4	95 \pm 2	2	97 \pm 2	200	98 \pm 4
	5	98 \pm 2	2	99 \pm 1	300	104 \pm 4

^a n=3.

Conclusiones

V. CONCLUSIONES

En esta Memoria se han desarrollado once optosensores empleando FIA convencional, multiconmutación y análisis por inyección secuencial (SIA) y se han aplicado al análisis de compuestos en diversas matrices: alimentos, aguas superficiales, preparados farmacéuticos y fluidos biológicos. Se podrían destacar las siguientes conclusiones:

1. Se han implementado los principios de la multiconmutación y del análisis por inyección secuencial en los optosensores en flujo continuo, utilizando distintas técnicas de detección luminiscente. Esto ha permitido un mayor grado de automatización, así como un considerable ahorro en muestra y reactivos.
2. Se ha empleado la luminiscencia sensibilizada por terbio por primera vez como técnica de detección en los optosensores en flujo continuo. Esta técnica se ha utilizado en tres de los trabajos descritos en esta Memoria, utilizando válvulas rotatorias, válvulas solenoides y un sistema SIA.
3. Se ha comprobado que la luminiscencia sensibilizada por lantánido, al emplear el soporte sólido, no requiere de surfactantes y otros reactivos que son necesarios en disolución. Además, el empleo del soporte sólido proporciona igual o mayor selectividad y sensibilidad. Esto implica que el uso del soporte sólido conlleva no sólo un menor gasto, sino también el desarrollo de métodos más respetuosos con el medio ambiente.
4. Se ha descrito, por primera vez en la literatura científica, el uso de una célula comercial (Hellma 138 QS) para albergar el soporte sólido cuando se emplea la quimioluminiscencia como técnica de detección.
5. Se ha descrito un sensor para la determinación de un pesticida, bitertanol, en una matriz tan compleja como los alimentos (plátanos), demostrando que con un adecuado tratamiento de la muestra se puede emplear un optosensor para matrices mucho más complejas

que las habitualmente descritas en literatura científica para optosensores en flujo continuo.

6. Empleando un sistema SIA, se ha desarrollado un doble sensor luminiscente para la determinación secuencial de tres analitos, midiendo, por una parte, la fluorescencia nativa de dos de ellos y, por otra parte, la quimioluminiscencia del tercer analito.
7. Se ha desarrollado un total de once sensores, de los cuales siete son monoparámetro y cuatro multiparámetro. La resolución de las mezclas se consigue mediante la llegada secuencial de los analitos al detector, debido a la retención selectiva en el soporte sólido empleado. Para esta separación se han empleado dos estrategias: a) El uso de una minicolumna rellena de soporte sólido y situada justo antes de la célula de flujo; b) El empleo de una cantidad adicional de soporte sólido en la misma célula de flujo.

Esta Memoria abre nuevos caminos tanto en el desarrollo de nuevas estrategias y metodologías analíticas con ventajas adicionales a los optosensores tradicionalmente desarrollados, como para el empleo de dichos optosensores en análisis de rutina farmacéutico, sanitario o control medioambiental.

V. CONCLUSIONS

Eleven flow-through optosensors have been developed in this Research Report, making use of flow injection analysis, multicommutation and sequential injection analysis principles. They have been applied to the determination of target compounds in several matrices: food, environmental waters, pharmaceuticals and biological fluids.

Following are the most remarkable aspects of this Research:

1. Multicommutation and sequential injection analysis (SIA) principles have been implemented in flow-through optosensing. This implementation has introduced a higher degree of automation, as long as considerable savings in both sample and reagents.
2. For the first time, terbium-sensitized luminescence has been employed as detection technique in flow-through optosensing analysis. This technique has been used in three papers described in this Research, making use of rotary valves, solenoid valves and SIA manifolds.
3. Using a solid support when lanthanide sensitized luminescence is employed as detection technique provides enough selectivity and sensitivity in order to avoid using surfactants and enhancers. Therefore, cheaper and environmentally-friendly methodologies have been here presented.
4. For the first time, a commercial flow-through cell has been used in a flow-through chemiluminescent sensor.
5. A multicommutated optosensor for the determination of a pesticide, bitertanol, has been developed and applied to its determination in food. This research demonstrates that a proper pre-treatment makes it possible to apply flow-through optosensing to more complex matrices than normally described in scientific literature.

6. A double luminescent optosensor has been described, making use of SIA, for the determination of three analytes in pharmaceuticals employing both native fluorescence and chemiluminescence.
7. Eleven optosensors have been developed, seven monoparametric and four multiparametric. The resolution of the mixtures is achieved by the sequential arrival of the analytes to the detection area. Two strategies have been used for obtaining the analytes separation: a) Using a minicolumn filled with solid support and placed just before the flow-through cell; b) Employing an additional amount of solid support in the same detection cell.

This Research Work widens the scope of applications of flow-through optosensing, making it possible to employ it in fields such as pharmaceutical routine analysis, environmental pollution monitoring or food control. This is possible due to the introduction of automatic methodologies that make these analyses low-costly, quicker and environmentally-friendly.

Bibliografía

VI. BIBLIOGRAFÍA

- [1] K.Yoshimura, H. Waki, S. Ohashi. *Ion-exchanger colorimetry—I: Micro determination of chromium, iron, copper and cobalt in water*. Talanta 23 (1976) 449-454.
- [2] K. Yoshimura, H. Waki. *Ion-exchanger phase absorptiometry for trace analysis*. Talanta 32 (1985) 345-352.
- [3] F. Capitán, E. Alonso, R. Avidad, L.F. Capitán-Vallvey, J.L. Vílchez. *Determination of thiabendazole residues in water by solid-phase spectrofluorometry*. Anal. Chem. 65 (1993) 1336-1339.
- [4] P. Ortega-Barrales, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. *Microdetermination of vitamin B1 in the presence of vitamins B2, B6 and B12 by solid-phase UV spectrophotometry*. Anal. Chem. 70 (1998) 271-275.
- [5] J. Ruzicka, E.H. Hansen. *Optosensing at active surfaces — a new detection principle in flow injection analysis*. Anal Chim Acta 173 (1985) 3 - 21.
- [6] M. Valcárcel, M. D. Luque de Castro. *Automatic Methods of Analysis*, Elsevier, 1988.
- [7] J. Ruzicka, E.H. Hansen. *Flow injection analyses : Part I. A new concept of fast continuous flow analysis*. Anal. Chim. Acta 78 (1975) 145.
- [8] K.K. Stewart, G.R. Beecher, P.E. Hare. *Rapid analysis of discrete samples: The use of nonsegmented, continuous flow*. Anal. Biochem. 70 (1970) 167-173.
- [9] R.C. Prados-Rosales, J.L. Luque-García, M.D. Luque de Castro. *Valves and flow injection manifolds: an excellent marriage with unlimited versatility*. Anal. Chim. Acta 480 (2003) 181-192.

- [10] J. Ruzicka, E.H. Hansen, *Flow Injection Analysis*, J. Wiley, New York, 1981.
- [11] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro, *Flow injection Analysis. A practical guide*, Elsevier, 1989.
- [12] A. Molina Díaz, I. Ortega Carmona, M.I. Pascual Reguera. *Indirect spectrophotometric determination of ascorbic acid with ferrozine by flow-injection analysis*. *Talanta* 47 (1998) 531-536.
- [13] A. Dhaouadi, L. Monser, S. Sadok, N. Adhoum. *Flow-injection methylene blue-based spectrophotometric method for the determination of peroxide values in edible oils*. *Anal. Chim. Acta* 576 (2006) 270-274.
- [14] C. E. López Pasquali, P. Fernández-Hernando, J. S. Durand Alegría. *Spectrophotometric simultaneous determination of nitrite, nitrate and ammonium in soils by flow injection analysis*. *Anal. Chim. Acta*, 600 (2007) 177-182.
- [15] M. I. Pascual-Reguera, G. Pérez Parras, A. Molina Díaz. *A single spectroscopic flow-through sensing device for determination of ciprofloxacin*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 35 (2004) 689-695.
- [16] S. Kulmala, J. Suomi. *Current status of modern analytical luminescence methods*. *Anal. Chim. Acta* 500 (2003) 21-69.
- [17] A. Fernández-Gutierrez, S.G. Schulman, *Fosforescencia molecular analítica: una aproximación práctica*, Editorial de la Universidad de Granada, Granada, 2001.
- [18] J. Kuijt, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer. *Room temperature phosphorescence in the liquid state as a tool in analytical chemistry*. *Anal. Chim. Acta* 488 (2003) 135-171.
- [19] A.M. García-Campaña, W.R.G. Baeyens, *Chemiluminescence in Analytical Chemistry*, Ed. Marcel Dekker, 2001.

[20] P. Solich, C.K. Polydorou, M.A. Koupparis, C.E. Efstathiou. *Automated flow injection fluorimetric determination and dissolution studies of bumetanide in pharmaceuticals*. Anal. Chim. Acta 438 (2001) 131-136.

[21] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, A. Guillén. *Successive determination of thiamine and ascorbic acid in pharmaceuticals by flow injection analysis*. J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 551-557.

[22] J. L. Vílchez, M.C. Valencia, A. Navalón, B. Molinero, L. F. Capitán. *Flow injection analysis of the insecticide imidacloprid in water samples with photochemically induced fluorescence detection*. Anal. Chim. Acta 439 (2001) 299-305.

[23] K. Robards, P.J. Worsfold. *Analytical applications of liquid-phase chemiluminescence*. Anal. Chim. Acta 266 (1992) 1471-73.

[24] Fuster Mestre, L Lahuerta-Zamora., J. Martinez-Calatayud. *Flow-chemiluminescence: a growing modality of pharmaceutical analysis*. Luminescence 16 (2001) 213-235.

[25] Z.Y. Zhang, S.C. Zhang, X.R. Zhang. *Recent developments and applications of chemiluminescence sensors*. Anal. Chim. Acta 541 (2005) 37-47.

[26] K. Mervatová, M. Polášek, J. Martínez-Calatayud. *Recent applications of flow-injection and sequential-injection analysis techniques to chemiluminescence determination of pharmaceuticals*. J. Pharm. Biomed. Anal. 45 (2007) 367-381.

[27] N. Arnaud, J. Georges. *Improved detection of salicylic acids using terbium-sensitized luminescence in aqueous micellar solutions of cetyltrimethylammonium chloride*. Analyst 124 (1999) 1075-1078.

[28] M. P. Aguilar-Caballo, A. Gómez-Hens, D. Pérez-Bendito. *Simultaneous determination of benzoic acid and saccharin in soft drinks by using lanthanide-sensitized luminescence*. Analyst 124 (1999) 1079-1084.

[29] P. Ortega-Barrales, M. J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz, S. Garrigues, M. de la Guardia. *Solid phase Fourier transform near infrared spectroscopy*. Analyst 124 (1999) 579-582.

[30] M. J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, B. Lendl. *Determination of free fatty acids in edible oils by continuous-flow analysis with FT-IR Spectroscopic detection*. Appl. Spectr. 55 (2001) 356-360.

[31] S. Armenta, G. Quintás, J. Moros, S. Garrigues, M. de la Guardia. *Fourier transform infrared spectrometric strategies for the determination of Buprofezin in pesticides formulations*. Anal. Chim. Acta 468 (2002) 81-90.

[32] M. J. Ayora-Cañada, A. Ruiz-Medina, J. Frank, B. Lendl. *Bead injection for surface enhanced Raman spectroscopy: automated on-line monitoring of substrate generation and application in quantitative analysis*. Analyst 127 (2002) 1365-1369.

[33] S. Lee, J. Choi, L. Chen, B. Park, J. Burm Kyong, G. Hun Seong, J. Choo, Y. Lee, K. H. Shin, E. K. Lee, S. W. Joo, K. H. Lee. *Fast and sensitive trace analysis of malachite green using a surface-enhanced Raman microfluidic sensor*. Anal. Chim. Acta 590 (2007) 139-144.

[34] A. N. Anthemidis, G. A. Zachariadis, J. A. Stratis. *Gallium trace on-line preconcentration/separation and determination using a polyurethane foam mini-column and flame atomic absorption spectrometry: Application in aluminum alloys, natural waters and urine*. Talanta 60 (2003) 929-936.

[35] N. M. M. Coelho, A. C. da Silva, C. M. da Silva. *Determination of As(III) and total inorganic arsenic by flow injection hydride generation atomic absorption spectrometry*. Anal. Chim. Acta 460 (2002) 227-233.

[36] G. E. Roscoe, R. Miles, C.G. Taylor. *Determination of potassium in gasoline and lubricating oils by a flow-injection technique with flame atomic emission spectrometric detection*. Anal. Chim. Acta 234 (1990) 439-444.

[37] G. Centineo, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel. *Flow injection analysis with inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry for the*

simultaneous determination of elements forming hydrides and its application to urine. J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 1357-1362.

[38] N. V. Semenova, L. O. Leal, R. Forteza, V. Cerdà. *Multisyringe flow injection system for total inorganic selenium determination by hydride generation-atomic fluorescence spectrometry.* Anal. Chim. Acta 486 (2003) 217-225.

[39] Y. T. Chung, Y. C. Ling, C. S. Yang, Y. C. Sun, P. L. Lee, C. Y. Lin, C. C. Hong, M. H. Yang. *In Vivo Monitoring of Multiple Trace Metals in the Brain Extracellular Fluid of Anesthetized Rats by Microdialysis-Membrane Desalter-ICPMS.* Anal. Chem. 79 (2007) 8900-8910.

[40] N. Wade, K. Miller. *Determination of active ingredient within pharmaceutical preparations using flow injection mass spectrometry.* J. Pharm. Biomed. Anal 37 (2005) 669-678.

[41] D. W. Johnson. *A flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometric method for the simultaneous measurement of trimethylamine and trimethylamine N-oxide in urine.* J. Mass Spectrom. 43 (2008) 495-499.

[42] J. J. Pedrotti, I. G. R. Gutz. *Ultra-simple adaptor to convert batch cells with mercury drop electrodes in voltammetric detectors for flow analysis.* Talanta 60 (2003) 695-705.

[43] S. Pati, M. Quinto, F. Palmisano. *Flow injection determination of choline in milk hydrolysates by an immobilized enzyme reactor coupled to a selective hydrogen peroxide amperometric sensor.* Anal. Chim. Acta 594 (2007) 234-239.

[44] N. Miyanishi, N. Sato, S. Nakakita, W. Sumiyoshi, K. Morimoto, H. Okuma, M. Tokuda, K. Izumori, E. Watanabe, J. Hirabayashi. *Development of an amperometric flow analysis sensor for specific detection of d-psicose.* Biosens. Bioelectr. 23 (2008) 1347-1352.

- [45] R. De Marco, B. Pejčić, M. Loan, M. Wincox. *Continuous flow analysis of iron in zinc electrowinning electrolyte using an iron chalcogenide glass ion-selective electrode Part I. Synthetic media*. *Talanta* 57 (2002) 115-121
- [46] A. P. S. Paim, C. M. N. V. Almeida, B. F. Reis, R. A. S. Lapa, E. A. G. Zagatto, J. L. F. Costa Lima. *Automatic potentiometric flow titration procedure for ascorbic acid determination in pharmaceutical formulations*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 1221-1225
- [47] M. N. Abbas, A. A. Radwan. *Novel lipoate-selective membrane sensor for the flow injection determination of α -lipoic acid in pharmaceutical preparations and urine*. *Talanta* 74 (2008) 1113-1121.
- [48] Z. K. He, B. Fuhrmann, U. Spohn. *Calibrationless Determination of Creatinine and Ammonia by Coulometric Flow Titration*. *Anal. Biochem.* 283 (2000) 166-174.
- [49] P. Norouzi, S. Shirvani-Arani, P. Daneshgar, M. R. Ganjali. *Sub-second adsorptive fast Fourier transform coulometric technique as a novel method for the determination of nanomolar concentrations of sodium valproate in its pharmaceutical preparation in flowing solution systems*. *Biosens. Bioelectr.* 22 (2007) 1068-1074.
- [50] F. A. Inon, F. J. Andrade, M. B. Tudino. *Application of the integrated conductimetric method to screen flow systems involving fast chemical reactions*. *J. Flow Inject. Anal.* 19 (2002) 137-142.
- [51] G. Altioikka, N. O. Can, H. Y. Aboul-Enein. *Determination of amoxicillin by flow injection analysis using UV-detection, potentiometry and conductometry in pharmaceutical preparations*. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Tech.* 30 (2007) 1333-1341.
- [52] J. Ruzicka, G.D. Marshall. *Sequential injection: a new concept for chemical sensors, process analysis and laboratory assays*. *Anal. Chim. Acta* 237 (1990) 329-343.

[53] H. L. Thanh, B. Lendl. *Sequential injection Fourier transform infrared spectroscopy for the simultaneous determination of organic acids and sugars in soft drinks employing automated solid phase extraction*. Anal. Chim. Acta 422 (2000) 63-69.

[54] S. M. Z. Al-Kindy, A. Al-Wishahi, F. E. O. Suliman. *A sequential injection method for the determination of piroxicam in pharmaceutical formulations using europium sensitized fluorescence*. Talanta 64 (2004) 1343-1350.

[55] E. M.G. Santos, A. N. Araújo, C. M.C.M. Couto, M. C. B.S.M. Montenegro, A. Kejzlarová, P. Solich. *Ion selective electrodes for penicillin-G based on Mn(III)TPP-Cl and their application in pharmaceutical formulations control by sequential injection analysis*. J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 701-709.

[56] J. Huclová, D. Šatínský, O. Pavlíček, L. Vedralová, R. Karlíček. *Using on-line solid phase extraction for determination of amiloride in human urine by sequential injection technique*. Anal. Chim. Acta 573-574 (2006) 376-382.

[57] A. Economou, P. Panoutsou, D. G. Themelis. *Enzymatic chemiluminescent assay of glucose by sequential-injection analysis with soluble enzyme and on-line sample dilution*. Anal. Chim. Acta 572 (2006) 140-147.

[58] W. Thanasarakhan, S. Liawruangrath, S. Wangkarn, B. Liawruangrath. *Sequential injection spectrophotometric determination of zinc(II) in pharmaceuticals based on zinc(II)-PAN in non-ionic surfactant medium*. Talanta 71 (2007) 1849-1855.

[59] P. Solich, M. Polášek, J. Klimundová, J. Ruzicka. *Sequential injection technique applied to pharmaceutical analysis*. TrAC Trends Anal. Chem. 22 (2003) 116-126.

- [60]** A. Economou. *Sequential-injection analysis (SIA): A useful tool for on-line sample-handling and pre-treatment*. TrAC Trends Anal. Chem. 24 (2005) 416-425.
- [61]** M. Catalá-Icardo, J.V. García-Mateo, J. Martínez-Calatayud. *Multicommutation as a powerful new analytical tool*. Trends Anal. Chem. 21 (2002) 366-378
- [62]** F.R.P. Rocha, B.F. Reis, E.A.G. Zagatto, J.L.F.C. Lima, R.A.S. Lapa, J.L.M. Santos. *Multicommutation in flow analysis: concepts, applications and trends*. Anal. Chim. Acta 468 (2002) 119-131.
- [63]** B. Gómez-Taylor Corominas. "Nuevos métodos de análisis en flujo (FIA y multicommutación) aplicados a la determinación por quimioluminiscencia directa de fenoles y polifenoles. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, 2003. ISBN.: 84-370-5894-5.
- [64]** J.Y. Neira, N. Reyes, J.A. Nobrega. *Development of hardware and software for online sample preparation using sequential injection analysis*. Lab. Robot. Autom. 12 (2000) 246-252.
- [65]** M. Fujimoto. *Microanalysis with the aid of ion-exchange resins. I. The detection of small amounts of cobalt with ammonium rhodanide*. Bull. Chem. Soc. Japan 27 (1954) 48-50.
- [66]** M. Fujimoto. *Microanalysis with the aid of ion-exchange resins. II. The detection of small amounts of chromium with hydrogen peroxide*. Bull. Chem. Soc. Japan 27 (1954) 347-50.
- [67]** S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz. *Fluorimetric Flow-Through Sensing of Quinine and Quinidine*. Microchim. Acta 147 (2004) 211-217.
- [68]** C.A. Heller, R.R. McBride, M.A. Ronning. *Detection of trinitrotoluene in water by fluorescent ion-exchange resins*. Anal. Chem. 49 (1977) 2251-2253.

- [69] A. Molina Díaz, J.M. Herrador Mariscal, M.I. Pascual Reguera, L.F. Capitán Vallvey. *Determination of traces of aluminium with chrome azurol S by solid-phase spectrophotometry*. *Talanta* 40 (1993) 1059-1066.
- [70] A. Ruiz Medina, M.L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz. *A rapid and selective solid-phase UV spectrophotometric method for determination of ascorbic acid in pharmaceutical preparations and urine*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 20 (1999) 247-254.
- [71] J.L. Vílchez, M. del Olmo, R. Avidad, L.F. Capitán Vallvey. *Determination of polycyclic aromatic hydrocarbon residues in water by synchronous solid-phase spectrofluorometry*. *Analyst* 119 (1994) 121-1214.
- [72] O. Ballesteros, J. L. Vílchez, A. Navalón. *Determination of the antibacterial ofloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 30 (2002) 1103-1110.
- [73] M. Valcárcel, M.D. Luque de Castro. *Flow-through (bio)chemical sensors—Plenary lecture*. *Analyst* 118 (1993) 593-600.
- [74] A. Molina-Díaz, A. Ruiz-Medina, M.L. Fernández de Córdoba. *The potential of flow-through optosensors in pharmaceutical analysis*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 28 (2002) 399-419.
- [75] Z. Gong, Z. Zhang. *Development of a modified beta-cyclodextrin based optosensor for dipyrindamole*. *Fresenius J. Anal. Chem.* 360 (1998) 138-140.
- [76] P. Van Zoonen, D.A. Kamminga, C. Gooijer, N.H. Velthorst, R.W. Frei. *A Solid-state chemiluminescence detector for hydrogen peroxide based on an immobilized luminophore. Application to rain water*. *Anal. Chim. Acta* 174 (1985) 151-161.
- [77] J.M. Costa-Fernández, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel. *Sol-gel immobilized room-temperature phosphorescent metal-chelate as luminescent oxygen sensing material*. *Anal. Chim. Acta.* 360 (1998) 17-26

- [78]** I. Sanchez-Barragan, K. Karim, J. M. Costa-Fernandez, S. A. Piletsky, A. Sanz-Medel. *A molecularly imprinted polymer for carbaryl determination in water*. Sens. Act. B 123 (2007) 798-804.
- [79]** S. Al-Kindy, R. Badía, J.L. Suárez-Rodríguez, M.E. Díaz-García. *Molecularly Imprinted Polymers and Optical Sensing Applications*. Crit. Rev. Anal. Chem. 30 (2000) 291-309.
- [80]** A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Fast flow-injection fluorimetric determination of amiloride by using a solid sensing zone*. Talanta 56 (2002) 1005-1013.
- [81]** J. F. Garcia-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Diaz. *Development of a Single Fluorescence-Based Optosensor for Rapid Simultaneous Determination of Fungicides Benomyl and Thiabendazole in Waters and Commercial Formulations*. J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 2197-2202.
- [82]** J. López-Flores, M.L. Fernández de Córdova, A. Molina-Díaz. *Implementation of flow-through solid phase spectroscopic transduction with photochemically induced fluorescence: determination of thiamine*. Anal. Chim. Acta 535 (2005) 161-168.
- [83]** J.M. Costa-Fernández, A. Sanz-Medel. *Room-temperature phosphorescence (bio)chemical sensors*. Quim. Anal. 19 (2000) 189-203.
- [84]** I. Sanchez-Barragan, J. M. Costa-Fernandez, R. Pereiro, A. Sanz-Medel, A. Salinas, A. Segura, A. Fernandez-Gutierrez, A. Ballesteros, J. M. Gonzalez. *Molecularly Imprinted Polymers Based on Iodinated Monomers for Selective Room-Temperature Phosphorescence Optosensing of Fluoranthene in Water*. Anal. Chem. 77 (2005) 7005-7011.
- [85]** F. Álava-Moreno, M.E. Díaz-García, A. Sanz-Medel. *Room temperature phosphorescence optosensor for tetracyclines*. Anal. Chim. Acta 281 (1993) 637-644.

- [86] F. Álava-Moreno, M.J. Valencia-González, M.E. Díaz-García. *Room temperature phosphorescence optosensor for anthracyclines*. *Analyst* 123 (1998) 151-154.
- [87] R.M. Cuenca-Trujillo, M.J. Ayora-Cañada, A. Molina-Díaz. *Room-temperature phosphorescence flow-through optosensor for determination of ciprofloxacin based on lanthanide sensitized luminescence*. *J. AOAC Int.* 85 (2002) 1268-1272.
- [88] W. Qin. *Flow-injection chemiluminescence based chemical sensors*. *Anal. Lett.* 35 (2002) 2207-2220.
- [89] Z. Zhang, S. Zhang, X. Zhang. *Recent developments and applications of chemiluminescence sensors*. *Anal. Chim. Acta* 541 (2005) 37-46.
- [90] Y. Xiong, H. Zhou, Z. Zhang, D. He, C. He. *Flow-injection chemiluminescence sensor for determination of isoniazid in urine sample based on molecularly imprinted polymer*. *Spectrochim. Acta A* 66 (2007) 341-346.
- [91] M. Haberkorn, P. Hinsmann, B. Lendl. *A mid-IR flow-through sensor for direct monitoring of enzyme catalysed reactions. Case study: measurements of carbohydrates in beer*. *Analyst* 127 (2002) 109-113.
- [92] A. Perez-Ponce, B. Lendl. *Mid-IR spectroscopy for the quantitation of metal ions in aqueous solution in the nanogram range*. *Applied Spectroscopy* 54 (2000) 676-680.
- [93] B. Lendl, R. Schindler. *Flow-through sensors for enhancing sensitivity and selectivity of FTIR spectroscopy in aqueous media*. *Vibrational Spectroscopy* 19 (1999) 1-10.
- [94] N. Weissenbacher, B. Lendl, J. Frank, H.D. Wanzelbock, R. Kellner. *Surface enhanced Raman spectroscopy as a molecular specific detection system in aqueous flow-through systems*. *Analyst* 123 (1998) 1057-1060.

[95] M.J. Ruedas Rama, M. López-Sánchez, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz, M.J. Ayora-Cañada. *Flow-through sensor with Fourier Transform Raman detection for determination of sulfonamides*. Analyst 130 (2005) 1617-1623.

[96] M. J. Ruedas Rama, A. Ruiz-Medina, A. Molina-Díaz. *Bead injection spectroscopic flow-through renewable surface sensors with commercial flow cells as an alternative to reusable flow-through sensors*. Anal. Chim. Acta 482 (2003) 209-217.

[97] M. J. Ruedas Rama, A. Ruiz Medina, A. Molina Díaz. *A flow-injection renewable surface sensor for the fluorimetric determination of vanadium (V) with Alizarin Red S*. Talanta 66 (2005) 1333-1339.

[98] Environmental Protection Agency (EPA), USA, www.epa.gov.

[99] C. De Liñan. *"Vademécum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales"*, edición XXI. Aerotécnicas S. L., Madrid, España, 2005.

[100] M. Chiba, E.A. Cherniak. *Kinetic study of Reversible Conversión of Methyl 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (Benomyl) to Methyl 2-Benzimidazole carbamate (MBC) and n-Butyl Isocyanate (BIC) in Organic Solvents*. J. Agric. Food. Chem. 26 (1978) 573-576.

[101] M. A. Bacigalupo, G. Moroni, R. Longhi. *Determination of carbofuran in water by homogeneous immunoassay using selectively conjugate mastoparan and terbium/dipicolinic acid fluorescent complex*. Talanta 69 (1006) 1106-1111.

[102] R. C. Gupta. *Carbofuran toxicity*. J. Toxicol. Environ. Health 43 (1994) 383-418.

[103] J.P. Calmon, D.R. Sayag. *Instability of Methyl 1-(Butylcarbamoyl)-2-benzimidazolecarbamate (Benomyl) in Various solvents*. J. Agric. Food. Chem. 24 (1976) 426-428

[104] R. P. Singh, C. H. Marvin, I. D. Brindle, C. D. Hall, M. Chiba. *Stabilization of Methyl[1-butylcarbamoyl]-1H-benzimidazole-2-yl]carbamate*

(Benomyl) in hydrochloric acid solutions. *J. Agric. Food Chem.* 40 (1992) 1303-1306.

[105] F. García-Sánchez, A. Aguilar-Gallardo. Fluorimetric determination of the fungicide benomyl after solvolysis. *Mikrochim. Acta* 116 (1994) 211-218.

[106] F. García-Sánchez, A. Navas-Díaz, M.M. López-Guerrero. *Modulated anisotropy fluorescence for quantitative determination of carbaryl and benomyl.* *Talanta* 60 (2003) 629-634.

[107] A. Coly, J.J. Aaron. *Luminescence methods in pesticide analysis: Applications to the environment.* *Analysis* 28 (2000) 699-709.

[108] F. García-Sánchez, A. Navas Díaz, M.C. Torijas. *Selective determination of carbaryl and benomyl by fluorescence polarization.* *Anal. Chim. Acta* 414 (2000) 25-32.

[109] J.L. Vílchez, L.F. Capitán-Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad. *Determination of benomyl residues in waters by solid-phase spectrofluorimetry.* *Analyst* 120 (1995) 1609-1611.

[110] J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Gel-surface enhanced fluorescence sensing system coupled to a continuous-flow assembly for simultaneous monitoring of benomyl and carbendazim.* *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 35-45.

[111] J. F. García Reyes, E. J. Llorent Martínez, P. Ortega Barrales, A. Molina Díaz. *Multiwavelength fluorescence based optosensor for simultaneous determination of fuberidazole, carbaryl and benomyl.* *Talanta* 64 (2004) 742-749.

[112] A. Lopez Monzon, D. Vega Moreno, M. E. Torres Padron, Z. Sosa Ferrera, J. J. Santana Rodriguez. *Solid-phase microextraction of benzimidazole fungicides in environmental liquid samples and HPLC-fluorescence detection.* *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1957-1963.

[113] Y. Yamazaki, T. Ninomiya. *Determination of benomyl, diphenyl, o-phenylphenol, thiabendazole, chlorpyrifos, methidathion and methyl parathion in oranges by solid-phase extraction, liquid chromatography and gas chromatography.* J. AOAC Int. 82 (1999) 1474-1478.

[114] M. Anastassiades, W. Schwack. *Analysis of carbendazim, benomyl, thiophanate methyl and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in fruits and vegetables after supercritical fluid extraction.* J. Chromatogr. A 825 (1998) 45-54.

[115] K.A. Bean, J.D. Henion. *Determination of carbendazim in soil and lake water by immunoaffinity extraction and coupled-column liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr. A. 791 (1997) 119-126.

[116] H. Sasaki, J. Yonekubo, K. Hayakawa. *A new on-line sample preparation system for the liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry simultaneous analysis of pesticides in river water.* Anal. Sciences 22 (2006) 835-840.

[117] A. Coly, J.J. Aaron. *Fluorimetric analysis of pesticides: methods, recent developments and applications.* Talanta 46 (1998) 815-843.

[118] M. J. Rodríguez-Cuesta, R. Boqué, F. X. Rius, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, A. Garrido Frenich. *Determination of carbendazim, fuberidazole and thiabendazole by three-dimensional excitation-emission matrix fluorescence and parallel factor analysis.* Anal. Chim. Acta 491 (2003) 47-56.

[119] G. N. Piccirilli, G. M. Escandar. *Partial least-squares with residual bilinearization for the spectrofluorimetric determination of pesticides. A solution of the problems of inner-filter effects and matrix interferences.* Analyst 131 (2006) 1012-1020.

- [120] J. Sancenón, M. De la Guardia. *Micellar enhanced fluorimetric determination of carbendazim in natural waters*. Anal. Chim. Acta 287 (1994) 49-57
- [121] R. M. Maggio, G. N. Piccirilli, G. M. Escandar. *Fluorescence enhancement of carbendazim in the presence of cyclodextrins and micellar media: A reappraisal*. Appl. Spectr. 59 (2005) 873-880.
- [122] J. J. Soto-Chinchilla, L. Gámiz-Gracia, A.M. García-Campaña, L. Cuadros-Rodríguez. *A new strategy for the chemiluminescent screening analysis of total N-methylcarbamate content in water*. Anal. Chim. Acta 541 (2005) 111-116.
- [123] M.J. Gonzalez de la Huebra, P. Hernandez, O. Nieto, Y. Ballesteros, L. Hernández. *Determination of carbendazim in soil samples by anodic stripping voltammetry using a carbon fiber ultramicroelectrode..* Fresenius J. Anal. Chem. 367 (2000) 474-478.
- [124] P. Manisankar, G. Selvanathan, C. Vedhi. *Determination of pesticides using heteropolyacid montmorillonite clay-modified electrode with surfactant*. Talanta 68 (2006) 686-692.
- [125] E.A. Hogendoorn, K. Westhuis, E. Dijkman, H.A.G. Heusinkveld, P. Chamraskul, P. Biadul, R.A. Baumann, A.A. Cornelese, M.A. Van der Linden. *Determination of carbendazim in water, soil and sediment samples by RPLC with and without switching and various spectrometric detection modes*. Intern. J. Environ. Anal. Chem. 78 (2000) 67-85.
- [126] L. M. Ravelo-Pérez, J. Hernández-Borges, A. Cifuentes, M. A. Rodríguez-Delgado. *MEKC combined with SPE and sample stacking for multiple analysis of pesticides in water samples at the ng/L level*. Electrophoresis 28 (2007) 1805-1814.
- [127] Y. Ni, D. Cao. *Simultaneous synchronous fluorescence determination of carbaryl, propoxur, and carbofuran with multivariate calibration methods*. Spectr. Lett. 39 (2006) 431-445.

- [128] N. L. Pacioni, A. V. Veglia. *Determination of carbaryl and carbofuran in fruits and tap water by β -cyclodextrin enhanced fluorimetric method*. Anal. Chim. Acta 488 (2003) 193-202.
- [129] S. Jin, Z. Xu, J. Chen, X. Liang, Y. Wu, X. Qian. *Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe*. Anal. Chim. Acta 523 (2004) 117-123.
- [130] T. N. Rao, B. H. Loo, B. V. Sarada, C. Terashima, A. Fujishima. *Electrochemical detection of carbamate pesticides at conductive diamond electrodes*. Anal. Chem. 74 (2002) 1578-1583.
- [131] A. Caballo-López, M. D. Luque de Castro. *Continuous ultrasound-assisted extraction coupled to online filtration-solid-phase extraction-column liquid chromatography-post column derivatisation-fluorescence detection for the determination of N-methylcarbamates in soil and food*. J. Chromatogr. A 998 (2003) 51-59.
- [132] C. Jansson, T. Pihlstrom, B. G. Osterdahl, K. E. Markides. *A new multi-residue method for analysis of pesticide residues in fruit and vegetables using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection*. J. Chromatogr. A 1023 (2004) 93-104.
- [133] A. M. Rodrigues, V. Ferreira, V. V. Cardoso, E. Ferreira, M. J. Benoliel. *Determination of several pesticides in water by solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1150 (2007) 267-278.
- [134] G. Sagratini, J. Manes, D. Giardina, P. Damiani, Y. Picó. *Analysis of carbamate and phenylurea pesticide residues in fruit juices by solid-phase microextraction and liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1147 (2007) 135-143.
- [135] T. Kovalczuk, M. Jech, J. Poustka, J. Hajslova. *Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A novel challenge in multi-residue pesticide analysis in food*. Anal. Chim. Acta 577 (2006) 8-17.

- [136] N. Makihata, T. Kawamoto, K. Teranishi. *Simultaneous analysis of carbamate pesticides in tap and raw water by LC/ESI/MS*. Anal. Sci. 19 (2003) 543-549.
- [137] K. Yu, J. Krol, M. Balogh, I. Monks. *A Fully Automated LC/MS Method Development and Quantification Protocol Targeting 52 Carbamates, Thiocarbamates and Phenylureas*. Anal. Chem. 75 (2003) 4103-4112.
- [138] Q. Hao, H. Liu, S. Zhang, Z. Yuan. *Simultaneous determination of fuberidazole and o-phenylenediamine by ultraviolet spectrophotometry-CPA matrix method*. Fenxi Shiyanshi 17 (1998) 9-11.
- [139] A. Garrido Frenich, D. Picón Zamora, M. Martínez Galera, J. L. Martínez Vidal. *Application of GRAM and TLD to the resolution and quantitation of real complex multicomponent mixtures by fluorescence spectroscopy*. Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 974-980.
- [140] M. Martínez-Galera, D. Picón-Zamora, J.L. Martínez-Vidal, A. Garrido-Frenich, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas-López. *Determination of carbendazim, thiabendazole and fuberidazole using a net analyte signal-based method*. Talanta 59 (2003) 1107-1116.
- [141] M. Lezcano, W. Al-Soufi, M. Novo, E. Rodríguez-Nuñez, J. Vázquez-Tato. *Complexation of several benzimidazole-type fungicides with alpha- and beta-cyclodextrins*. J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 108-112.
- [142] A. Salinas, J. F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández. *A simple and rapid phosphorimetric method for the determination of the fungicide fuberidazole in water samples*. Int. J. Environ. Anal. Chem. 85 (2005) 443-449.
- [143] G. E. Mercer, J. A. Hurlbut. *A multiresidue pesticide monitoring procedure using gas chromatography/mass spectrometry and selected ion monitoring for the determination of pesticides containing nitrogen, sulphur, and/or oxygen in fruits and vegetables*. J. AOAC Int. 87 (2004) 1224-1236.

- [144] B. Saad, N.H. Noor, M.I. Saleh, N.H. Hasim, A. Abu, N. Ali. *Determination of ortho-phenylphenol, diphenyl and diphenylamine in apples and oranges using HPLC with fluorescence detection*. Food. Chem. 84 (2004) 313-317.
- [145] L. Yang, A. Kotani, H. Hakamata, F. Kusu. *Determination of ortho-phenylphenol residues in lemon rind by high performance liquid chromatography with electrochemical detection using a microbore column*. Anal. Sci. 20 (2004) 199-203.
- [146] C. Blasco, G. Font, J. Manes, Y. Picó. *Solid-Phase Microextraction Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry To Determine Postharvest Fungicides in Fruits*. Anal. Chem. 75 (2003) 3606-3615.
- [147] N. Yoshioka, Y. Akiyama, K. Teranishi. *Rapid simultaneous determination of o-phenylphenol, diphenyl, thiabendazole, imazalil and its major metabolite in citrus fruits by liquid chromatography-mass spectrometry using atmospheric pressure photoionization*. J. Chromatogr. A 1022 (2004) 145-150.
- [148] L.F. Capitán-Vallvey, M.K.A. Deheidell, R. Avidad. *Solid-phase spectrophosphorimetric determination of the pesticide o-phenylphenol in water and vegetables*. Anal. Bioanal. Chem. 375 (2003) 685-691.
- [149] L.F. Capitán-Vallvey, J. Rohand, A. Navalón, R. Avidad, J.L. Vílchez. *Simultaneous determination of carbaryl and o-phenylphenol residues in waters by first-derivate synchronous solid-phase spectrofluorimetry*. Talanta 40 (1993) 1695-1701.
- [150] J.L. Vílchez, A. Navalón, R. Avidad, J. Rohand, L.F. Capitán-Vallvey. *Determination of (1,1'-biphenyl)-2-ol residues in waters by solid-phase spectrofluorimetry*. Fresenius J. Anal. Chem. 345 (1993) 716-719.
- [151] G. F. Pang, C.L. Fan, Y. M. Liu, Y. Z. Cao, J. J. Zhang, X. M. Li, Z. Y. Li, Y. P. Wu, T. T. Guo. *Determination of residues of 446 pesticides in fruits and vegetables by three-cartridge solid-phase extraction-gass*

chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J. AOAC Int. 89 (2006) 740-771.

[152] G. F. Pang, Y. Z. Cao, J. J. Zhang, C. L. Fan, Y. M. Liu, X. M. Li, G. Q. Jia, Z. Y. Li, Y. Q. Shi, Y. P. Wu, T. T. Guo. *Validation study on 660 pesticide residues in animal tissues by gel permeation chromatography cleanup/gas chromatography-mass spectrometry and liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1125 (2006) 1-30.

[153] www.mapya.es: *Maximum residue levels for phytosanitary products*. Ministry of Agricultura, Fishes and Feeding, Spain, reviewed on 03-05-2004.

[154] T. Zamora, C. Hidalgo, F. J. López, F. Hernández. *Determination of fungicide residues in fruits by coupled-column liquid chromatography*. J. Sep. Sci. 27 (2004) 645-652.

[155] J. Zrostlikova, J. Hajslova, T. kovalczuk, R. Stepan, J. Poustka. *Determination of seventeen polar/thermolabile pesticides in apples and apricots by liquid chromatography/mass spectrometry*. J. AOAC Int. 86 (2003) 612-622.

[156] A. Sannino. *Evaluation of a method based on liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry for analyzing eight triazolic and pyrimidine fungicides in extracts of processed fruits and vegetables*. J. AOAC Int. 87 (2004) 991-996.

[157] A. Juan-García, J. Manes, G. Font, Y. Picó. *Evaluation of solid-phase extraction and stir-bar sorptive extraction for the determination of fungicide residues at low-microg kg⁻¹ levels in grapes by liquid chromatography-mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1050 (2004) 119-127.

[158] C. Blasco, G. Font, Y. Picó. *Analysis of pesticides in fruits by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-ion trap-triple stage mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 1098 (2005) 37-43.

[159] B. Gilbert-López, J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz, A. R. Fernández-Alba. *Analysis of pesticide residues in fruit-based baby*

food by liquid chromatography/electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. Rap. Comm. Mass Spec. 21 (2007) 2059-2071.

[160] J. W. Wong, M. G. Webster, C. A. Halverson, M. J. Hengel, K. K. Ngim, S. E. Ebeler. *Multiresidue Pesticide Analysis in Wines by Solid-Phase Extraction and Capillary Gas Chromatography-Mass Spectrometric Detection with Selective Ion Monitoring. J. Agric. Food Chem. 51 (2003) 1148-1161.*

[161] D. Stajnbaher, L. Zupancic-Kralj. *Multiresidue method for determination of 90 pesticides in fresh fruits and vegetables using solid-phase extraction and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 1015 (2003) 185-198.*

[162] X. G. Chu, X. Z. Hu, H. Y. Yao. *Determination of 266 pesticide residues in apple juice by matrix solid-phase dispersion and gas chromatography-mass selective detection. J. Chromatogr. A 1063 (2005) 201-210.*

[163] Z. Huang, Y. Li, B. Chen, S. Yao. *Simultaneous determination of 102 pesticide residues in Chinese teas by gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. B 853 (2007) 154-162.*

[164] N. Rahman, Y. Ahmad, S. N. H. Azmi. *Kinetic spectrophotometric method for the determination of norfloxacin in pharmaceutical formulations. Eur. J. Pharm. Biopharm. 57 (2004) 359-367.*

[165] O. Ballesteros, I. Toro, V. Sanz-Nebot, A. Navalón, J. L. Vilchez, J. Barbosa. *Determination of fluoroquinolones in human urine by liquid chromatography coupled to pneumatically assisted electrospray ionization mass spectrometry. J. Chromatogr. B 798 (2003) 137-144.*

[166] Z. Liu, Z. Huang, R. Cai. *Study of the fluorescence characteristics of norfloxacin in reversed micelles and application in analysis. Analyst 125 (2000) 1477-1481.*

[167] A. Espinosa-Mantilla, A. Muñoz de la Peña, F. Salinas, D. González Gómez. *Partial least squares multicomponent fluorimetric determination of fluoroquinolones in human urine samples. Talanta 62 (2004) 853-860.*

[168] J. L. Vílchez, O. Ballesteros, J. Taoufiki, G. Sánchez-Palencia, A. Navalón. *Determination of the antibacterial norfloxacin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry*. Anal. Chim. Acta 444 (2001) 279-286.

[169] M. E. El-Kommos, G. A. Saleh, S. M. El-Gizawi, M. A. Abou-Elwafa. *Spectrofluorometric determination of certain quinolone antibacterials using metal chelation*. Talanta 60 (2003) 1033-1050.

[170] Y. D. Liang, J. F. Song, X. F. Yang. *Flow-injection chemiluminescence determination of fluoroquinolones by enhancement of weak chemiluminescence from peroxyntrous acid*. Anal. Chim. Acta 510 (2004) 21-28.

[171] H. Sun, L. Li, X. Chen. *Investigation on sensitized chemiluminescence systems and their mechanism for five fluoroquinolones*. Anal. Chim. Acta 576 (2006) 192-199.

[172] L. Wang, P. Yang, Y. Li, H. Chen, M. Li, F. Luo. *A flow injection chemiluminescence method for the determination of fluoroquinolone derivative using the reaction of luminol and hydrogen peroxide catalyzed by gold nanoparticles*. Talanta 72 (2007) 1066-1072.

[173] C. J. Veiopoulou, P. C. Ioannou, E. S. Lianidou. *Application of terbium sensitized fluorescence for the determination of fluoroquinolone antibiotics pefloxacin, ciprofloxacin and norfloxacin in serum*. J. Pharm. Biomed. Anal. 15 (1997) 1839-1844.

[174] C. Tong, G. Xiang. *Sensitive determination of norfloxacin by the fluorescence probe of terbium (III)-sodium dodecylbenzene sulfonate and its luminescence mechanism*. J. Fluorescence 16 (2006) 831-837.

[175] T. Galaon, S. Udrescu, I. Sora, V. David, A. Medvedovici. *High-throughput liquid-chromatography method with fluorescence detection for reciprocal determination of furosemide or norfloxacin in human plasma*. Biomed. Chrom. 21 (2007) 40-47 .

- [176] F. Cañada-Cañada, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña. *Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine*. J. Sep. Science 30 (2007) 1242-1249.
- [177] G. H. Wan, H. Cui, Y. L. Pan, P. Zheng, L. J. Liu. *Determination of quinolones residues in prawn using high-performance liquid chromatography with Ce(IV)-Ru(bpy)₃²⁺-HNO₃ chemiluminescence detection*. J. Chromatogr. B 843 (2006) 1-9.
- [178] G. van Vyncht, A. Janosi, G. Bordin, B. Toussaint, G. Maghuin-Rogister, E. De Pauw, A. R. Rodríguez. *Multiresidue determination of (fluoro)quinolone antibiotics in swine kidney using liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. J. Chromatogr. A 952 (2002) 121-129.
- [179] J. Lim, B. Park, H. Yun. *Sensitive liquid chromatographic-mass spectrometric assay for norfloxacin in poultry tissue*. J. Chromatogr. B 772 (2002) 185-189.
- [180] K. Mitani, H. Kataoka. *Determination of fluoroquinolones in environmental waters by in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta 562 (2006) 16-22.
- [181] A. Rubies, R. Vaquerizo, F. Centrich, R. Compano, M. Granados, M. D. Prat. *Validation of a method for the analysis of quinolones residues in bovine muscle by liquid chromatography with electrospray ionisation tandem mass spectrometry detection*. Talanta 72 (2007) 269-276.
- [182] M. L. Luis, J. M. G. Fraga, A. I. Jiménez, F. Jiménez, O. Hernández, J. J. Arias. *Application of PLS regression to fluorimetric data for the determination of furosemide and triamterene in pharmaceutical preparations and triamterene in urine*. Talanta 62 (2004) 307-316.
- [183] J. Huclová, D. Šatínský, T. Maia, R. Karlíček, P. Solich, A. N. Araújo. *Sequential injection extraction based on restricted access material for*

determination of furosemide in serum. J. Chromatogr. A 1087 (2005) 245-251.

[184] N. Arnaud, J. Georges. *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 (2003) 149-157.

[185] Y. Rao, X. Zhang, G. Luo, W. R. G. Baeyens. *Chemiluminescence flow-injection determination of furosemide based on a rhodamine 6G sensitized cerium (IV) method.* Anal. Chim. Acta 396 (1999) 273-277.

[186] J. Xi, X. Ji, S. Zhang, X. Ai, Z. He. *Investigation of RuBPS-Ce(IV) chemiluminescence reaction and its application in determination of two diuretics.* Anal. Chim. Acta 541 (2005) 193-198.

[187] I. L. Tescarollo Dias, J. L. S. Martins, G. De Oliveira Neto. *Furosemide determination by first-derivative spectrophotometric method.* Anal. Lett. 38 (2005) 1159-1166.

[188] F. S. Semaan, R. Adelino de Sousa, E. T. G. Cavalheiro. *Flow injection spectrophotometric determination of furosemide in pharmaceuticals by the bleaching of a permanganate carrier solution.* J. Flow Injection Anal. 22 (2005) 34-37.

[189] F. S. Semaan, E. T. G. Cavalheiro. *Spectrophotometric determination of furosemide based on its complexation with Fe (III) in ethanolic medium using a flow injection procedure.* Anal. Lett. 39 (2006) 2557-2567.

[190] I. L. Tescarollo Dias, G. De Oliveira Neto, D. C. Vendramini, C. Sommer, J. L. S. Martins, L. T. Kubota. *A Poly(Vinyl Chloride) Membrane Electrode for the Determination of the Diuretic Furosemide.* Anal. Lett. 37 (2004) 35-46.

[191] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski. *Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine*

samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method. Anal. Chim. Acta 570 (2006) 46-58.

[192] M. Wenk, L. Haegeli, H. Brunner, S. Krähenbühl. *Determination of furosemide in plasma and urine using monolithic silica rod liquid chromatography.* J. Pharm. Biomed. Anal. 41 (2006) 1367-1370.

[193] Y. S. El-Saharty. *Simultaneous high-performance liquid chromatographic assay of furosemide and propranolol HCl and its application in a pharmacokinetic study.* J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 699-709.

[194] D. Thieme, J. Grosse, R. Lang, R. K. Mueller, A. Wahl. *Screening, confirmation and quantitation of diuretics in urine for doping control analysis by high-performance liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry.* J. Chromatogr. B 757 (2001) 49-57.

[195] S. Castiglioni, R. Bagnati, D. Calamari, R. Fanelli, E. Zuccato. *A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters.* J. Chromatogr. A 1092 (2005) 206-215.

[196] J. Caslavská, W. Thormann. *Rapid analysis of furosemide in human urine by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence and electrospray ionization-ion trap mass spectrometric detection.* J. Chromatogr. B 770 (2002) 207-216.

[197] J. A. Murillo Pulgarín, A. Alañón Molina, P. Fernández López. *Direct analysis of amiloride and triamterene mixtures by fluorescence spectrometry using partial-least squares calibration.* Anal. Chim. Acta 449 (2001) 179-187.

[198] A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Determination of triamterene by transitory retention in a continuous flow solid phase system with fluorimetric transduction.* J. Pharm. Biomed. Anal. 28 (2002) 721-728.

[199] G. A. Ibañez, G. M. Escandar, A. Espinosa Mansilla, A. Muñoz de la Peña. *Determination of triamterene in pharmaceutical formulations and of triamterene and its main metabolite hydroxytriamterene sulfate in urine using solid-phase and aqueous solution luminescence.* Anal. Chim. Acta 538 (2005) 77-84.

[200] K. Kargosha, A. H. M. Sarrafi. *Spectrophotometric simultaneous determination of triamterene and hydrochlorothiazide in Triamterene-H tablets by multivariate calibration methods.* J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 273-279.

[201] I. Durán Meras, A. Espinosa Mansilla, F. Salinas López, M. J. Rodríguez Gómez. *Determination of triamterene and leucovorin in biological fluids by UV derivative-spectrophotometry and partial least-squares (PLS-1) calibration.* J. Pharm. Biomed. Anal. 27 (2002) 81-90.

[202] M. Arvand, M. F. Mousavi, M. A. Zanjanchi, M. Shamsipur. *Direct determination of triamterene by potentiometry using a coated wire selective electrode.* J. Pharm. Biomed. Anal. 33 (2003) 975-982.

[203] K. Deventer, F. T. Delbeke, K. Roels, P. Van Eenoo. *Screening for 18 diuretics and probenecid in doping analysis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry.* Biomed. Chrom. 16 (2002) 529-535.

[204] Y. Qin, X. B. Wang, C. Wang, M. Zhao, M. T. Wu, Y. X. Xu, S. Q. Peng. *Application of high-performance liquid chromatography-mass spectrometry to detection of diuretics in human urine.* J. Chromatogr. B 794 (2003) 193-203.

[205] A. Rosado-María, A. I. Gasco-López, A. Santos-Montes, R. Izquierdo-Hornillos. *High-performance liquid chromatographic separation of a complex mixture of diuretics using a micellar mobile phase of sodium dodecyl sulfate. Application to human urine samples.* J. Chromatogr. B 748 (2000) 415-424.

[206] M. L. Luis, S. Corujedo, D. Blanco, J. M. G. Fraga, A. I. Jiménez, F. Jiménez, J. J. Arias. *Micellar electrokinetic capillary chromatography analysis of diuretics in pharmaceutical formulations*. *Talanta* 57 (2002) 223-231.

[207] M. Lu, P. Tong, H. Xiao, S. Xia, X. Zheng, W. Liu, L. Zhang, G. Chen. *A new method for screening and determination of diuretics by on-line CE-ESI-MS*. *Electrophoresis* 28 (2007) 1461-1471.

[208] Y. Fuster Mestre, L. Lahuerta Zamora, J. Martínez Calatayud. *Spectrophotometric determination of nalidixic and pipemidic acids in a flow injection assembly with a solid-phase reactor as a highly stable reagent source*. *Anal. Chim. Acta* 438 (2001) 93-102.

[209] I. Durán Meras, T. Galeano Díaz, M. I. Rodríguez Cáceres, F. Salinas López. *Determination of the chemotherapeutic quinolonic and cinolonic derivatives in urine by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection in series*. *J. Chromatogr. A* 787 (1997) 119-1271.

[210] Durán Meras, T. Galeano Díaz, F. Salinas López, M. I. Rodríguez Cáceres. *Determination of piromidic acid residues in trout muscle tissue and in urine by liquid chromatography with post-column modification of pH and fluorimetric detection*. *J. Chromatogr. B* 718 (1998) 135-141.

[211] L. Ming Du, Y. Qin Yang, Q. Mei Wang, *Spectrofluorometric determination of certain quinolone through charge transfer complex formation*. *Anal. Chim. Acta* 516 (2004) 237-243.

[212] S.-L. Chen, H.-C. Zhao, C.-Y. Sun, N. Lian, L.-P. Jin. *A study on terbium sensitised chemiluminescence of pipemidic acid and its application*. *Anal. Lett.* 35 (2002) 1705-1714.

[213] B. Li, Z. Zhang, L. Zhao, C. Xu. *Chemiluminescence flow-through sensor for pipemidic acid using solid sodium bismuthate as an oxidant*. *Anal. Chim. Acta* 459 (2002) 19-24.

[214] A. Egorova, S. Beltyukova, O. Teslyuk. *Fluorimetric determination of pipemidinic acid using the europium chelate*. J. Pharm. Biomed. Anal. 21 (1999) 585-590.

[215] C. Liu, H. Zhao, L. Jin. *Study of the fluorescence of terbium-pipemidic acid system and determination of pipemidic acid in urine and serum*. Guangpuxue Yu Guangpu Fenxi 19 (1999) 447-449.

[216] W. Jin, D. Yu, Q. Dong, X. Ye. *A new method of quantification of pipemidic acid by capillary zone electrophoresis with end-column amperometric detection*. Electrophoresis 21 (2000) 925-929.

[217] M. Hernández, F. Borrull, M. Calull. *Determination of quinolones in plasma samples by capillary electrophoresis using solid-phase extraction*. J. Chromatogr. B 742 (2000) 255-265.

[218] A. Ruiz-Medina, M. L. Fernández-de Córdoba, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Flow-through UV spectrophotometric sensor for determination of (acetyl) salicylic acid in pharmaceutical preparations*. Int. J. Pharm. 216 (2001) 95-104.

[219] L. Liao, J. Yang, J. Yuan. *Process monitored spectrophotometric titration coupled with chemometrics for simultaneous determination of mixtures of weak acids*. Anal. Chim. Acta 591 (2007) 123-31.

[220] S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz. *Fast and single solid phase fluorescence spectroscopic batch procedure for (acetyl) salicylic acid determination in drug formulations*. J. Pharm. Biomed. Anal. 31 (2003) 439-446.

[221] J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Multicommutated fluorometric multiparameter sensor for simultaneous determination of naproxen and salicylic acid in biological fluids*. Anal. Sciences 23 (2007) 423-428.

[222] Y. Li, C. Zhu, L. Wang. *Determination of salicylic acid by chemiluminescence method*. Fenxi Shiyanshi 20 (2001) 32-33.

[223] H. Cui, S. Li, F. Li, Y. Sun, X. Lin. *A novel chemiluminescent method for the determination of salicylic acid in bactericidal solutions*. Anal. Bioanal. Chem. 372 (2002) 601-604.

[224] N. Arnaud, J. Georges. *Influence of pH, surfactant and synergic agent on the luminescent properties of terbium chelated with benzoic acid derivatives in aqueous solutions*. Analyst 125 (2000) 1487-1490.

[225] X. Ren, K. Shao, X. Tang. *Determination of salicylic acid and its hydroxylated products using high performance liquid chromatography and fluorescence detection*. Sepu 19 (2001) 191-192.

[226] H. Cui, J. Zhou, F. Xu, C. Lai, G. H. Wan. *Determination of phenolic compounds using high - performance liquid chromatography with Ce⁴⁺-Tween 20 chemiluminescence detection*. Anal. Chim. Acta 511 (2004) 273-279.

[227] Q. Zhang, H. Cui, A. Myint, M. Lian, L. Liu. *Sensitive determination of phenolic compounds using high - performance liquid chromatography with cerium(IV)-rhodamine 6G-phenolic compound chemiluminescence detection*. J. Chromatogr. A 1095 (2005) 94-101.

[228] R. Pirker, C.W. Huck, M. Popp. G.K. Bonn. *Simultaneous determination of gentisic, salicylic and salicylic acid in human plasma using solid-phase extraction, liquid chromatography and electrospray ionization mass spectrometry*. J. Chromatogr. B. 809 (2004) 257-264.

[229] M. Sultan, G. Stecher, W. M. Stoeggel, R. Bakry, P. Zaborski, C. W. Huck, N. M. El Kousy, G. K. Bonn. *Sample pretreatment and determination of non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in pharmaceutical formulations and biological samples (blood, plasma, erythrocytes) by HPLC-UV-MS and □ - HPLC*. Current Medicinal Chemistry 12 (2005) 573-588.

[230] S. Zaugg, X. Zhang, J. Sweedler, W. Thormann. *Determination of salicylate, gentisic acid and salicylic acid in human urine by capillary*

electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. J. Chromatogr. B 752 (2001) 17-31.

[231] F. Belal, S. Al-Shaboury, A. S. Al-Tamrah. *Spectrophotometric determination of labetalol in pharmaceutical preparations and spiked human urine.* Il Farmaco 58 (2003) 293-299.

[232] F. Belal, S. al-Shaboury, A. S. Al-Tamrah. *Spectrofluorometric determination of labetalol in pharmaceutical preparations and spiked human urine through the formation of coumarin derivative.* J. Pharm. Biomed. Anal. 30 (2002) 1191-1196.

[233] E. Gorodkiewicz, P. Falkowski, a. Sankiewicz, Z. Figaszewski. *Analytical application of electrode sensitive to labetalol in pharmaceuticals.* Central Eur. J. Chem. 1 (2003) 242-259.

[234] M. Delamoye, C. Duverneuil, F. Paraire, P. de Mazancourt, J. C. Alvarez. *Simultaneous determination of thirteen β -blockers and one metabolite by gradient high-performance liquid chromatography with photodiode-array UV detection.* Forensic Sci. Int. 141 (2004) 23-31.

[235] C. Ceniceros, M. I. Maguregui, R. M. Jiménez, R. M. Alonso. *Quantitative determination of the β -blocker labetalol in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography with amperometric detection.* J. Chromatogr. B 705 (1998) 97-103.

[236] M. Gergov, J. N. Robson, E. Duchoslav, I. Ojanpera. *Automated liquid chromatographic/tandem mass spectrometric method for screening β -blocking drugs in urine.* J. Mass Spectrom. 35 (2000) 912-918.

[237] L. Peng, T. Farkas. *Analysis of basic compounds by reversed-phase liquid chromatography-electrospray mass spectrometry in high-pH mobile phases.* J. Chromatogr. A 1179 (2008) 131-144.

[238] C. G. Georgakopoulos, A. Vonaparti, M. Stamou, P. Kioussi, E. Lyris, Y. S. Angelis, G. Tsoupras, B. Wuest, M. W. F. Nielen, I. Panderi, M. Koupparis. *Preventive doping control analysis: liquid and gas*

chromatography time-of-flight mass spectrometry for detection of designer steroids. Rapid Commun. Mass Spectrom. 21 (2007) 2439-2446.

[239] M. J. Paik, D. T. Nguyen, K. R. Kim. *GC and MS properties of β -blockers as tert-butyldimethylsilyl derivatives and as ethoxycarbonyl/trimethylsilyl derivatives.* Chromatographia 64 (2006) 673-679.

[240] S. L. Tamisier-Karolak, M. A. Stenger, A. Bommart. *Enantioseparation of beta-blockers with two chiral centers by capillary electrophoresis using sulfated beta-cyclodextrins.* Electrophoresis 20 (1999) 2656-2663.

[241] A. A. Rizvi Syed, C. Akbay, A. Shamsi Shahab. *Polymeric alkenoxy amino acid surfactants: II. Chiral separations of beta-blockers with multiple stereogenic centers.* Electrophoresis 25 (2004) 853-860.

[242] R. Burakham, S. Duangthong, L. Patimapornlert, N. Lenghor, S. Kasiwad, L. Srivichai, S. Lapanantnoppakhun, J. Jakmune, K. Grudpan. *Flow-injection and sequential-injection determinations of paracetamol in pharmaceutical preparations using nitrosation reaction.* Anal. Sciences 20 (2004) 837-840.

[243] A. F. Lavorante, C. K. Pires, B. F. Reis. *Multicommutated flow system employing pinch solenoid valves and micro-pumps: Spectrophotometric determination of paracetamol in pharmaceutical formulations.* J. Pharm. Biomed. Anal. 42 (2006) 423-429.

[244] G. Ragno, G. Ioele, A. Risoli. *Multivariate calibration techniques applied to the spectrophotometric analysis of one-to-four component systems.* Anal. Chim. Acta 512 (2004) 173-180.

[245] M. M. Sena, R. J. Poppi. *N-way PLS applied to simultaneous spectrophotometric determination of acetylsalicylic acid, paracetamol and caffeine.* J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 27-34.

- [246] F. A. El-Yazbi, H. H. Hammud, S. A. Assi. *Derivative-ratio spectrophotometric method for the determination of ternary mixture of aspirin, paracetamol and salicylic acid*. Spectrochim. Acta A 68A (2007) 275-278.
- [247] M. J. Ayora Cañada, M. I. Pascual Reguera, A. Ruiz Medina, M. L. Fernández de Córdoba, A. Molina Díaz. *Fast determination of paracetamol by using a very simple photometric flow-through sensing device*. J. Pharm. Biomed. Anal. 22 (2000) 59-66.
- [248] A. Domínguez-Vidal, J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *UV spectrophotometric flow-through multiparameter sensor for the simultaneous determination of acetaminophen, acetylsalicylic acid and caffeine*. Anal. Lett. 35 (2002) 2433-2447.
- [249] M. De los A. Oliva, R. A. Olsina, A. N. Masi. *Selective spectrofluorometric method for paracetamol determination through coumarinic compound formation*. Talanta 66 (2005) 229-235.
- [250] A. Moreira, I. Dias, G. Neto, E. Zagatto, L. Kubota. *Simultaneous Spectrofluorometric Determination of Paracetamol and Caffeine in Pharmaceutical Preparations in Solid-Phase using Partial Least Squares Multivariate Calibration*. Anal. Lett. 39 (2006) 349-360.
- [251] Sirajuddin, A. R. Khaskheli, A. Shah, M. I. Bhangar, A. Niaz, S. Mahesar. *Simpler spectrophotometric assay of paracetamol in tablets and urine samples*. Spectrochim. Acta A 68A (2007) 747-751.
- [252] F. S. Felix, C. M. A. Brett, L. Angnes. *Carbon film resistor electrode for amperometric determination of acetaminophen in pharmaceutical formulations*. J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1622-1627.
- [253] V. A. Pedrosa, D. Lowinsohn, M. Bertotti. *FIA determination of paracetamol in pharmaceutical drugs by using gold electrodes modified with a 3-mercaptopropionic acid monolayer*. Electroanalysis 18 (2006) 931-934.

[254] I. Baranowska, P. Markowski, J. Baranowski. *Simultaneous determination of 11 drugs belonging to four different groups in human urine samples by reversed-phase high-performance liquid chromatography method*. Anal. Chim. Acta 570 (2006) 46-58.

[255] A. Panusa, G. Multari, G. Incarnato, L. Gagliardi. *High-performance liquid chromatography analysis of anti-inflammatory pharmaceuticals with ultraviolet and electrospray-mass spectrometry detection in suspected counterfeit homeopathic medicinal products*. J. Pharm. Biomed. Anal. 43 (2007) 1221-1227.

[256] K. Suenami, L. W. Lim, Y. Takeuchi, Y. Sasajima, K. Sato, Y. Takekoshi, S. Kanno. *On-line sample extraction and enrichment of non-steroidal anti-inflammatory drugs by pre-column in capillary liquid chromatography mass spectrometry*. J. Chromatogr. B 846 (2007) 176-183.

[257] K. Hara, S. Kashimura, T. Yanai, M. Kashiwagi, A. Miyoshi, M. Kageura. *Rapid analysis of acetaminophen in serum by gas chromatography-mass spectrometry with extractive derivatization using a diatomaceous earth tube*. Forensic Toxicology 24 (2006) 65-69.

[258] F. Ploessl, M. Giera, F. Bracher. *Multiresidue analytical method using dispersive solid-phase extraction and gas chromatography/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood*. J. Chromatogr. A 1135 (2006) 19-26.

[259] K. Makino, T. Yano, Y. Maiguma, D. Teshima, T. Sendo, Y. Itoh, R. Oishi. *A Rapid and Simultaneous Determination of Several Analgesic Antiinflammatory Agents by Capillary Zone Electrophoresis*. Therapeut. Drug Monitor. 25 (2003) 574-580.

[260] Q. Chu, L. Jiang, X. Tian, J. Ye. *Rapid determination of acetaminophen and p-aminophenol in pharmaceutical formulations using miniaturized capillary electrophoresis with amperometric detection*. Anal. Chim. Acta 606 (2008) 246-251.

[261] S. Heitmeir, G. Blaschke. *Direct assay of nonopioid analgesics and their metabolites in human urine by capillary electrophoresis and capillary electrophoresis-mass spectrometry*. J. Chromatogr. B 721 (1999) 109-125.

[262] V. Ghasemi, J. B. Raoof, R. Ojani, R. Hosseinzadeh. *Voltammetric determination of ascorbic acid on a ferrocene derivative-modified carbon paste electrode*. Bull Electrochem. 21 (2005) 115-122.

[263] N. Pejic, S. Blagojevic, S. Anic, L. Kolar-Anic. *Determination of ascorbic acid in pharmaceutical dosage forms and urine by means of an oscillatory reaction system using the pulse perturbation technique*. Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 2009-2017.

[264] T. Selvaraju, R. Ramaraj. *Simultaneous detection of ascorbic acid, uric acid and homovanillic acid at copper modified electrode*. Electrochim. Acta 52 (2007) 2998-3005.

[265] R. P. da Silva, A. W. O. Lima, S. H. P. Serrano. *Simultaneous voltammetric detection of ascorbic acid, dopamine and uric acid using a pyrolytic graphite electrode modified into dopamine solution*. Anal. Chim. Acta 612 (2008) 89-98.

[266] H. Ihara, Y. Shino, Y. Aoki, N. Hashizume, N. Minegishi. *A simple and rapid method for the routine assay of total ascorbic acid in serum and plasma using ascorbate oxidase and o-phenyldiamine*. J. Nutr. Sci. Vitaminol. 46 (2000) 321-324.

[267] E. K. Janghel, V. K. Gupta, M. K. Rai, J. K. Rai. *Microdetermination of ascorbic acid using methyl viologen*. Talanta 72 (2007) 1013-1016.

[268] A. Martinovic, L. Kukoc-Modun, N. Radic. *Kinetic spectrophotometric determination of thiols and ascorbic acid*. Anal. Lett. 40 (2007) 805-815.

[269] P. Ortega-Barrales, A. Ruiz-Medina, M. L. Fernández-de Córdoba, A. Molina-Díaz. *A flow-through solid-phase spectroscopic sensing device implemented with FIA solution measurements in the same flow cell:*

determination of binary mixtures of thiamine with ascorbic acid or acetylsalicylic acid. Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 227-232.

[270] Z. Legnerova, D. Šatínský, P. Solich. *Using on-line solid phase extraction for simultaneous determination of ascorbic acid and rutin trihydrate by sequential injection analysis.* Anal. Chim. Acta 497 (2003) 165-174.

[271] T. Pérez-Ruiz, C. Martínez-Lozano, A. Sanz, A. Guillén. *Successive determination of thiamine and ascorbic acid in pharmaceuticals by flow injection analysis.* J. Pharm. Biomed. Anal. 34 (2004) 551-557.

[272] B. Rezaei, A. A. Ensafi, S. Nouroozi. *Flow-injection determination of ascorbic acid and cysteine simultaneously with spectrofluorometric detection.* Anal. Sciences 21 (2005) 1067-1071.

[273] Z. Chen, B. Chen, S. Yao. *High-performance liquid chromatography/electrospray ionization-mass spectrometry for simultaneous determination of taurine and 10 water-soluble vitamins in multivitamin tablets.* Anal. Chim. Acta 569 (2006) 169-175.

[274] H. L. Lee, S. C. Chen. *Microchip capillary electrophoresis with electrochemical detector for precolumn enzymatic analysis of glucose, creatinine, uric acid and ascorbic acid in urine and serum.* Talanta 64 (2004) 750-757.

[275] Y. Du, L. Jia, H. Liu, D. Xing. *Comparison of on-line concentration methods in capillary zone electrophoresis for analysis of water-soluble vitamins.* Anal. Lett. 40 (2007) 2005-2015.

[276] S. Dong, S. Zhang, X. Cheng, P. He, Q. Wang, Y. Fang. *Simultaneous determination of sugars and ascorbic acid by capillary electrophoresis with amperometric detection at a carbon paste electrode modified with polyethylene glycol and Cu₂O.* J. Chromatogr. A 1161 (2007) 327-333.

- [277] F. R. P. Rocha, O. Fatibello-Filho, B. F. Reis. *A multicommuted flow system for sequential spectrophotometric determination of hydrosoluble vitamins in pharmaceutical preparations*. *Talanta* 59 (2003) 191-200.
- [278] J. Ghasemi, B. Abbasi, A. Niazi, E. Nadaf, A. Mordai. *Simultaneous Spectrophotometric Multicomponent Determination of Folic Acid, Thiamine, Riboflavin, and Pyridoxal by Using Double Divisor-Ratio Spectra Derivative-Zero Crossing Method*. *Anal. Lett.* 37 (2004) 2609-2623.
- [279] C. Bodson, W. Dewe, Ph. Hubert, L. Delattre. *Comparison of FT-NIR transmission and UV-Vis spectrophotometry to follow the mixing kinetics and to assay low-dose tablets containing riboflavin*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41 (2006) 783-790.
- [280] A. Niazi, J. Zolgharnein, S. Afiuni-Zadeh. *Spectrophotometric determination of ternary mixtures of thiamin, riboflavin and pyridoxal in pharmaceutical and human plasma by least-squares support vector machines*. *Anal. Sciences* 23 (2007) 1311-1316.
- [281] L. H. Wang, H. C. Heng. *Simultaneous Determination of water-soluble vitamins in human urine by Fluorescence in a Flow-Injection Analysis*. *J. Liq. Chrom. & Rel. Tech.* 29 (2006) 329-338.
- [282] F. Feng, K. Wang, Z. Chen, Q. Chen, J. Lin, S. Huang. *Flow injection renewable drops spectrofluorimetry for sequential determination of vitamins B₁, B₂ and B₆*. *Anal. Chim. Acta* 527 (2004) 187-193.
- [283] A. Safavi, M. A. Karimi, M. R. H. Nezhad. *Flow injection analysis of riboflavin with chemiluminescence detection using a N-halo compounds-luminol system*. *Luminescence* 20 (2005) 170-175.
- [284] M. Wang, L. Zhao, M. Liu, J. M. Lin. *Determination of riboflavin by enhancing the chemiluminescence intensity of peroxomonosulfate-cobalt (II) system*. *Spectrochim. Acta A* 66A (2007) 1222-1227.

[285] P. Vinas, N. Balsalobre, C. López-Erroz, M. Hernández-Córdoba. *Liquid Chromatographic Analysis of Riboflavin Vitamers in Foods using Fluorescence Detection*. J. Agric. Food Chem. 52 (2004) 1789-1794.

[286] Y. Zhang, Z. Zhang, W. Yang, S. Tian. *Determination of thiamine and riboflavin by reversed-phase high performance liquid chromatography with chemiluminescence detection*. Sepu 21 (2003) 391-393.

[287] P. Chen, W. R. Wolf. *LC/UV/MS-MRM for the simultaneous determination of water-soluble vitamins in multi-vitamin dietary supplements*. Anal. Bioanal. Chem. 387 (2007) 2441-2448.

[288] J. Qin, Y. Fung, D. Zhu, B. Lin. *Native fluorescence detection of flavin derivatives by microchip capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence intensified charge-coupled device detection*. J. Chromatogr. A 1027 (2004) 223-229.

[289] F. Priego-Capote, M. D. Luque de Castro. *Determination of B₂ and B₆ vitamers in serum by capillary electrophoresis-molecular fluorescence-charge coupled detector*. Electrophoresis 26 (2005) 2376-2383.

[290] J. Bai, H. Xu, Q. Liu, J. Chen, L. Bai. *Capillary electrophoresis detection scheme for vitamin B₁ and vitamin B₂ based on the potassium hexacyanoferrate (III) chemiluminescence system*. Microchim. Acta 160 (2008) 165-171.

[291] V. O. Consigliere, N. R. M. Vals, J. F. Magalhaes. *First-derivative spectrophotometric determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical preparations*. Anal. Lett. 34 (2001) 1875-1888.

[292] B. Uslu, S. A. Ozkan, H. Y. Abou-Enein. *Spectrophotometric determination of melatonin and pyridoxine HCl in binary mixture using first derivative of the ratio spectra method*. Anal. Lett. 35 (2002) 2305-2317.

[293] M. H. Sorouraddin, M. R. Rashidi, E. Ghorbani-Kalhor, K. Asadpour-Zeynali. *Simultaneous spectrofluorimetric and spectrophotometric*

determination of melatonin and pyridoxine in pharmaceutical preparations by multivariate calibration methods. *Farmaco* 60 (2005) 451-458.

[294] J. G. Portela, A. C. S. Costa, L. S. G. Teixeira. *Determination of vitamin B₆ in pharmaceutical formulations by flow injection-solid phase spectrophotometry.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 543-549.

[295] J. F. García-Reyes, E. J. Llorent-Martínez, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *The potencial of combining solid-phase optosensing and multicommutation principles for routine analysis of pharmaceuticals.* *Talanta* 68 (2006) 1482-1488.

[296] H. Abdollahi, M. H. Sororaddin, A. Naseri. *Simultaneous spectrofluorometric determination of piroxicam and pyridoxine using generalized rank annihilation method.* *Anal. Sciences* 22 (2006) 263-267.

[297] V. D. Vaze, A. K. Srivastava. *Determination of pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical preparations by calixarene based potentiometric sensor.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* 47 (2008) 177-182.

[298] M. L. Marszall, A. Lebiezinska, W. Czarnowski, P. Szefer. *High-performance liquid chromatography method for the simultaneous determination of thiamine hydrochloride, pyridoxine hydrochloride, and cyanocobalamin in pharmaceutical formulations using coulometric electrochemical and ultraviolet detection.* *J. Chromatogr. A* 1094 (2005) 91-98.

[299] T. Marunouchi, M. Ono, T. Nakajima, Y. Ito, T. Aketo. *Simultaneous determination of active ingredients in an ophthalmic solution by isocratic tandem-mode HPLC connected reverse phase column and strong cation exchange column.* *J. Pharm. Biomed. Anal.* 40 (2006) 331-337.

[300] P. Vinas, N. Balsalobre, C. López Erroz, M. Hernández-Córdoba. *Determination of vitamin B₆ compounds in foods using liquid chromatography with post-column derivatization fluorescence detection.* *Chromatographia* 59 (2004) 381-386.

- [301]** D. L. Mann, G. M. Ware, E. Bonnin, R. R. Eitenmiller, E. Barna, S. Christiansen, J. L. De Borde, J. Devries, P. Gilliland, J. Hemmer, A. Kalman, E. Konings, D. Levin, L. Salvati, D. Woollard. *Liquid chromatographic analysis of vitamin B₆ in reconstituted infant formula: collaborative study*. J. AOAC Int 88 (2005) 30-37.
- [302]** L. J. Nuñez-Vergara, J. A. Squella, J. C. Sturm, H. Baez, C. Camargo. *Simultaneous determination of melatonin and pyridoxine in tablets by gas chromatography-mass spectrometry*. J. Pharm. Biomed. Anal. 26 (2001) 929-938.
- [303]** E. Nemetlu, M. Celebier, B. Uyar, S. Altinoez. *Validation of a rapid micellar electrokinetic capillary chromatographic method for the simultaneous determination of isoniazid and pyridoxine hydrochloride in pharmaceutical formulation*. J. Chromatogr. B 854 (2007) 35-42.
- [304]** L. Jia, Y. Liu, Y. Du, D. Xing. *Pressurized capillary electrochromatographic analysis of water-soluble vitamins by combining with on-line concentration technique*. J. Chromatogr. A 1154 (2007) 416-422.
- [305]** E. E. K. Baidoo, P. I. Benke, C. Neusuess, M. Pelzing, G. Kruppa, J. A. Leary, J. D. Keasling. *Capillary Electrophoresis-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry for the Identification of Cationic Metabolites via a pH-Mediated Stacking-Transient Isotachophoretic Method*. Anal. Chem. 80 (2008) 3112-3122.
- [306]** K. Yoshimura. *Implementation of ion-exchanged absorptiometric detection in flow analysis systems*. Anal. Chem. 59 (1987) 2922-2924.
- [307]** K. Yoshimura. *Application of ion-exchanger phase absorptiometry to flow analysis. Determination of trace amounts of chromium (VI) in water*. Analyst 113 (1988) 471-474.
- [308]** D. Chen, M. D. Luque de Castro, M. Valcárcel. *Fluorimetric flow-through sensor for the determination of pyridoxal*. Microchem. J. 44 (1991) 215-221.

- [309] N. Kiba. *Chemiluminometric flow-through sensors*. J. Flow Inj. Anal. 23 (2006) 3-8.
- [310] S. Casado-Terrones, J. F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez. *The development and comparison of a fluorescence and a phosphorescence optosensors for determining the plant growth regulator 2-naphthoxyacetic acid*. Sens. Act. B B107 (2005) 929-935.
- [311] J. F. Fernández-Sánchez, A. Segura-Carretero, C. Cruces-Blanco, A. Fernández Gutiérrez. *The development of solid-surface fluorescence characterization of polycyclic aromatic hydrocarbons for potential screening tests in environmental samples*. Talanta 60 (2003) 287-293.
- [312] J. M. Traviesa-Álvarez, J. M. Costa-Fernández, R. Pereiro, A. Sanz-Medel. *Flow-through solid-phase energy transfer-room temperature phosphorescence for orthophosphate determination at trace levels*. Talanta 62 (2004) 827-833.
- [313] J. F. García-Reyes, P. Ortega-Barrales, A. Molina-Díaz. *Flow-through fluorescence-based optosensor for the screening of zinc in drinking water*. Anal. Sciences 23 (2007) 1179-1183.
- [314] S. Ortega-Algar, N. Ramos-Martos, A. Molina-Díaz. *A flow-through fluorimetric sensing device for determination of α and β -naphthol mixtures using a partial least-squares multivariate calibration approach*. Talanta 60 (2003) 313-323.
- [315] A. Ruiz-Medina, P. Ortega-Barrales, M. L. Fernández-de-Córdova, A. Molina-Díaz. *Use of a continuous flow solid-phase spectroscopic sensor using two sensing zones: determination of thiamine and ascorbic acid*. J. AOAC Int. 85 (2002) 369-374.
- [316] E. J. Llorent-Martínez, A. Domínguez-Vidal, P. Ortega-Barrales, M. de la Guardia, A. Molina-Díaz. *Implementation of multicommutation principle with flow-through multiptosensors*. Anal. Chim. Acta 545 (2005) 113-118.

[317] J. Wang, E. H. Hansen, M. Miró. *Sequential injection-bead injection-lab-on-valve schemes for on-line solid phase extraction and preconcentration of ultra-trace levels of heavy metals with determination by electrothermal atomic absorption spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry*. Anal. Chim. Acta 499 (2003) 139-147.

[318] IUPAC, *Nomenclature, symbols, units and their usage in spectrochemical analysis II*. Spectrochim. Acta B 33B (1978) 241-245.

[319] *Guidelines for Data Acquisition and Data Quality Evaluation in Environmental Chemistry*. Anal. Chem. 52 (1980) 2242-2249.

[320] J. L. Vílchez, R. Blanc, R. Avidad, A. Navalón. *Spectrofluorimetric determination of paracetamol in pharmaceuticals and biological fluids*. J. Phar. Biomed. Anal. 13 (1995) 1119-1125.

[321] M. Anastassiades, S. J. Lehotay, D. Štajnbaher, F. J. Schenk. *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*. J. AOAC Int. 86 (2003) 412-431.

[322] S. Carda-Broch, J. S. Esteve-Romero, M. C. García-Álvarez-Coque. *Chromatographic determination of diuretics in urine samples using hybrid micellar mobile phases with fluorimetric detection*. Anal. Chim. Acta 375 (1998) 143-154.

[323] J. M. Brogard, F. Conte, J. Lavillaureix. *Comparative pharmacokinetic profiles of cinoxacin and pipemidic acid in humans*. Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet. 8 (1983) 251-259.

[324] E. Klinge, P. T. Männistö, R. Mäntylä, J. Mattila, U. Hänninen. *Single- and multiple-dose pharmacokinetics of pipemidic acid in normal human volunteers*. Antimicrob. Agents Chemother. 26 (1984) 69-73.

Anexo

VII. ARTÍCULOS INCLUIDOS EN LA MEMORIA

En este Anexo se recogen los once artículos desarrollados por el autor de la presente Memoria sobre el Proyecto de Tesis presentado y admitido a trámite con fecha 29 de mayo de 2008.

Todos ellos han sido publicados en revistas científicas de carácter internacional, diez de ellos en el área de Química Analítica, mientras que el otro artículo ha sido publicado en el área de Farmacia.

Los artículos incluidos en la presente Memoria son los siguientes:

1. *"Flow-Through Fluorescence-Based Optosensor with On-Line Solid-Phase Separation for the Simultaneous Determination of a Ternary Pesticide Mixture"*, J. AOAC Int. 88 (2005) 860-865.
2. *"Terbium-sensitized luminescence optosensor for the determination of norfloxacin in biological fluids"*, Anal. Chim. Acta 532 (2005) 159-164.
3. *"Multicommutated flow-through fluorescence optosensor for determination of furosemide and triamterene"*, Anal. Bioanal. Chem. 383 (2005) 797-803.
4. *"Multicommutated optosensor for the determination of pipemidic acid in biological fluids"*, Anal. Biochem. 347 (2005) 330-332).
5. *"Chemiluminescence optosensing implemented with multicommutation: Determination of salicylic acid"*, Anal. Chim. Acta 580 (2006) 149-154.
6. *"Multicommutated Flow-through Multi-optosensing: A Tool for Environmental Analysis"*, Spectroscopy Letters 39 (2006) 619-629.

- 7.** "Multicommuted fluorescence based optosensor for the screening of bitertanol residues in banana samples", *Food Chem.* 102 (2007) 676-682.
- 8.** "Fluorescence optosensing implemented with sequential injection analysis: a novel strategy for the determination of labetalol", *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 2065-2069.
- 9.** "Fluorimetric SIA optosensing in pharmaceutical analysis: Determination of paracetamol", *J. Pharm. Biomed. Anal.* 45 (2007) 318-321.
- 10.** "Fast determination of salicylic acid in pharmaceuticals by using a terbium-sensitized luminescent SIA optosensor", *J. Pharm. Sci.* 97 (2008) 791-797.
- 11.** "SIA multiptosensor based on a dual-luminescence system using two sensing zones: Application to multivitamin determination", *Microchim. Acta* 162 (2008) 199-204.