

UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA

**«Determinación Fluorimétrica sobre superficies
sólidas de compuestos biogénicos, con la utilización
de un sensor de fibra óptica»**

**Autor: Rosa María Linares Aponte
Director: Dra. D^a Ana María Afonso Perera y
Dr. D. Venerndo González Díaz**

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología



Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Universidad de La Laguna

TERESA MARÍA BORGES MIQUEL, Profesora Titular de Química Analítica y Directora del Departamento de Química analítica, Nutrición y Bromatología de la Universidad de La Laguna,

INFORMA: Que la presente Memoria, titulada “DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS DE COMPUESTOS BIOGÉNICOS, CON LA UTILIZACIÓN DE UN SENSOR DE FIBRA ÓPTICA”, que presenta la Lcda. Rosa M^a Linares Aponte, para optar el Grado de Doctor en Química por esta Universidad, ha sido realizada en los laboratorios de este Departamento, bajo la dirección de los Dres. D. Venerando González Díaz y Dña. Ana María Afonso Perera.

Y para que conste, firmo el presente informe en La Laguna, a ocho de septiembre de mil novecientos noventa y ocho.



Departamento de Química Analítica,
Nutrición y Bromatología
Universidad de La Laguna

VENERANDO GONZÁLEZ DÍAZ, Catedrático de Química Analítica , y ANA MARÍA AFONSO PERERA, Profesora Titular de Química Analítica de la Universidad de La Laguna

AUTORIZAN la presentación del trabajo “DETERMINACIÓN FLUORIMÉTRICA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS DE COMPUESTOS BIOGÉNICOS, CON LA UTILIZACIÓN DE UN SENSOR DE FIBRA ÓPTICA”, realizado por la Licenciada en Química Rosa M^a Linares Aponte, para optar el Grado de Doctor en Química por la Universidad de La Laguna.

Y para que conste y surta los efectos oportunos, firman la presente en La Laguna, a ocho de septiembre de mil novecientos noventa y ocho.

Deseo hacer constar mi más sincero agradecimiento a los directores de este trabajo, Dres. D. Venerando González Díaz y Dña. Ana María Afonso Perera, que con su trabajo han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

Asimismo, quiero agradecer al Dr. Juan H. Ayala Díaz su dedicación y apoyo en todo momento.

Agradezco el asesoramiento que me ha prestado el licenciado José E. Conde, así como la ayuda y estímulo que me ha brindado la licenciada Ana M^a Campos Trujillo.

Por otra parte, deseo agradecer la colaboración del Dr. Roberto Lorenzo Martín, profesor titular del Departamento de Biología Vegetal de la Universidad de La Laguna y del Dr. Pedro Abreu González, profesor titular del Departamento de Enfermería de La Universidad de La Laguna, por su aportación a este trabajo.

También deseo manifestar mi gratitud al Centro de Inspección de Comercio Exterior de S/C de Tenerife y al Servicio de Medio Ambiente de La Universidad de La Laguna, por su contribución a esta Memoria.

Quiero agradecer profundamente a mi familia, especialmente a Juan y a Ángel, por su contribución a esta Tesis y por el enorme sacrificio que les ha supuesto la realización de la misma.

Y por último, deseo agradecer su ayuda a todas aquellas personas que de una forma u otra han colaborado en la realización de este trabajo.

A Juan y
a Ángel

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
<i>1.- Características e interés de derivados del Indol y de Aminas Biogénicas .</i>	<i>3</i>
<i>2.- Determinación analítica de derivados del Indol y Aminas Biogénicas .</i>	<i>12</i>
<i>3.- Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución</i>	<i>19</i>
<i>4.- Fluorescencia sobre superficies sólidas</i>	<i>25</i>
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29

Capítulo 1

PARTE EXPERIMENTAL	35
I.1.- APARATOS UTILIZADOS	37
I.2.- REACTIVOS Y DISOLUCIONES	39
<i>I.2.1.- Reactivos</i>	<i>39</i>
<i>I.2.2.- Disoluciones</i>	<i>41</i>
I.3.- PROCEDIMIENTOS	41
I.4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN E INYECCIÓN	45
<i>I.4.1.- Inyección de la muestra</i>	<i>46</i>
<i>I.4.2.- Sistemas de detección</i>	<i>47</i>

Capítulo 2

FLUORESCENCIA DE DERIVADOS DEL INDOL EN SOPORTES SÓLIDOS. DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA CON DETECCIÓN FLUORESCENTE ...	51
II.1.- INTRODUCCIÓN	53
II.2.- CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DE LOS DERIVADOS DEL INDOL	54
II.3.- SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS	65
II.4.- RELACIÓN SEÑAL/RUIDO	69
II.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	72
II.6.- DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS INDÓLICOS EN SUERO DE RATA .	76

Capítulo 3

DANSILACIÓN DE POLIAMINAS ASISTIDA POR MICROONDAS Y DETERMINACIÓN

POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	79
III.1.- INTRODUCCIÓN	80
III.2.- DANSILACIÓN DE POLIAMINAS ASISTIDA POR MICROONDAS	87
III.2.1.- <i>Influencia de las variables experimentales</i>	89
III.2.2.- <i>Calidad de los resultados</i>	99
III.3.- DANSILACIÓN DE POLIAMINAS EN MUESTRAS REALES	101
III.4.- DETERMINACIÓN DE DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN	105
III.4.1.- <i>Características cromatográficas</i>	105
III.4.2.- <i>Características analíticas</i>	108

Capítulo 4

COMPORTAMIENTO FLUORESCENTE DE POLIAMINAS DANSILADAS SOBRE SUPER- FICIES SÓLIDAS . DETERMINACIÓN POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN FLUORESCENTE	113
IV.1.- INTRODUCCIÓN	115
IV.2.- CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DE LOS DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS	116
IV.3.- SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS	126
IV.4.- RELACIÓN SEÑAL/RUIDO	131
IV.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	133
IV.6.- DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS EN TEJIDOS VEGETALES	137

Capítulo 5

DETERMINACIÓN DE AMINAS BIOGÉNICAS POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN. EFECTO DE LA PRESENCIA DE SURFACTANTES NO- IÓNICOS COMO ADITIVOS EN LA FASE MÓVIL	141
V.1.- INTRODUCCIÓN	143
V.2.- SENSIBILIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EMITIDA POR LOS DERIVADOS DANSILADOS DE LAS POLIAMINAS	145
V.3.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE EN LOS PROCESOS DE RETENCIÓN	152
V.4.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE SURFACTANTE A LA FASE MÓVIL EN LA RELA- CIÓN SEÑAL/RUIDO	157

V.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	159
V.6.- APLICACIONES ANALÍTICAS	163
V6.1.- <i>Determinación de poliaminas en tejidos vegetales</i>	163
V6.2.- <i>Determinación de poliaminas en muestras de cerveza</i>	165

Capítulo 6

DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS EN CERVEZAS	169
VI.1.- INTRODUCCIÓN	171
VI.2.- CONTENIDO DE POLIAMINAS EN CERVEZAS	173
VI.3.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS	181

Capítulo 7

LINEALIDAD Y CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS ASOCIADAS A LA CALIBRACIÓN, EN HPTLC CON DETECCIÓN FLUORESCENTE.....	191
VII.1.- INTRODUCCIÓN	193
VII.2.- CALIBRACIÓN EN HPTLC	196
VII.3.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS	214
CONCLUSIONES	227
BIBLIOGRAFÍA	230

Introducción

1.- CARACTERÍSTICAS E INTERÉS DE DERIVADOS DEL INDOL Y DE AMINAS BIOGÉNICAS.

Derivados del Indol

Dentro del conjunto de compuestos que son objeto de esta Memoria, algunos de ellos se encuentran entre las auxinas y compuestos relacionados, mientras que otros son aminas biogénicas de gran importancia.

Las auxinas son sustancias que estimulan el alargamiento de coleótilos decapitados. En el tallo promueven el alargamiento de las células e influyen sobre la floración, fructificación y dominancia apical. Su existencia fue demostrada por Went en 1928 [1].

Se admite como estructura característica de las auxinas la correspondiente al ácido Indol-3-Acético, cuya importancia como hormona del crecimiento fue establecida por Kögl [2].

En las plantas verdes, el ácido Indol-3-Acético deriva del Triptófano, mediante una conversión enzimática en la que están implicados otros compuestos indólicos, como la Triptamina y el ácido Indol-3-Pirúvico, a través de diferentes procesos, entre los que se encuentran la transaminación y descarboxilación, seguidos de dos pasos posteriores de oxidación. Asimismo, puede encontrarse este ácido en la orina humana, en cantidades apreciables, como consecuencia de la degradación del Triptófano que proviene de las proteínas.

El aminoácido L-Triptófano se considera como precursor primario del ácido Indol-

3-Acético, ya que no existe ningún camino para la biosíntesis de este ácido a partir del Indol, que no implique al Triptófano como intermediario [3,4]. Numerosas investigaciones realizadas en microorganismos y plantas superiores [5-9], han evidenciado que el Triptófano es el principal intermediario en la ruta biosintética del ácido Indol -3- Acético (Figura 1).

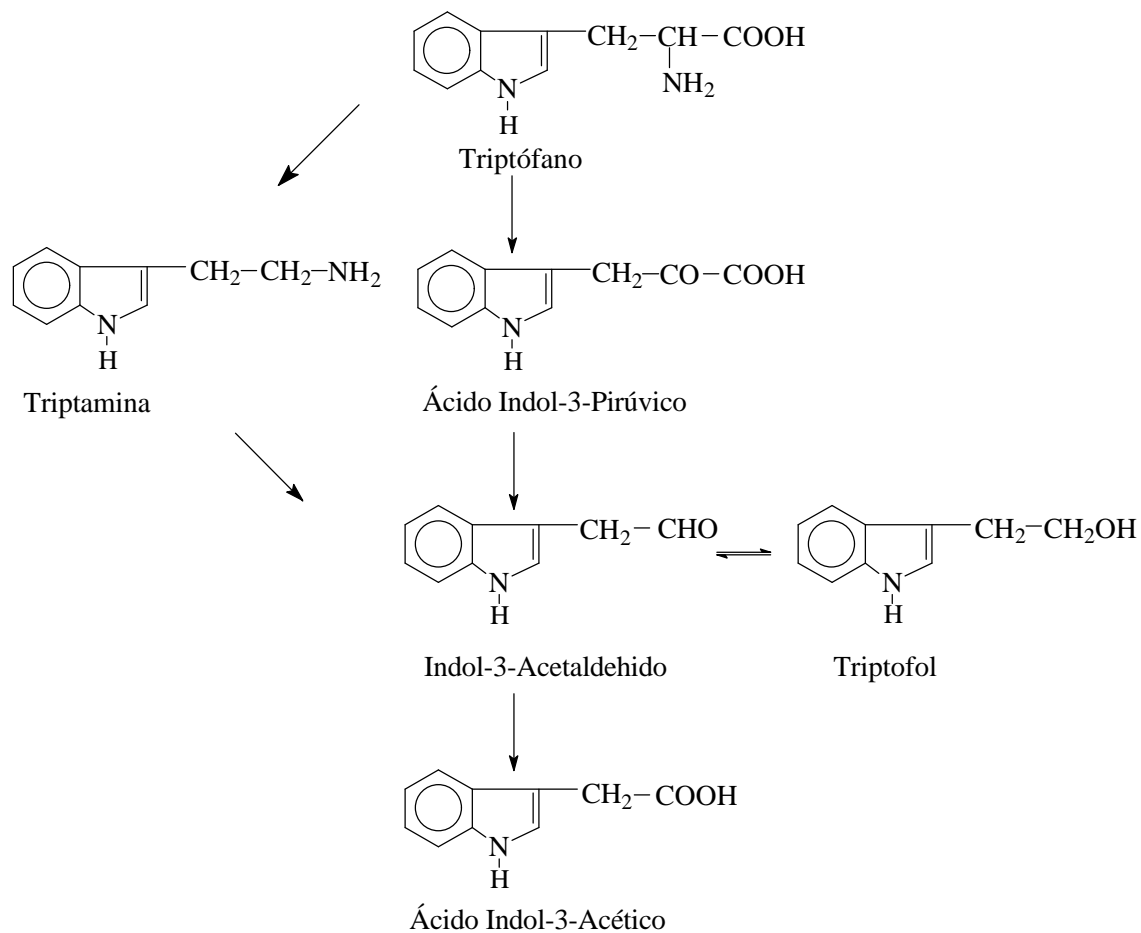


Figura 1.- Ruta biosintética del ácido Indol-3-Acético

Las aminas biogénicas, o de origen natural, han sido objeto de numerosas investigaciones, sobre todo en el campo de las Neurociencias. El término biogénicas, ha sido asociado a menudo a aminas como las Catecolaminas y la Serotonina, aunque, bajo este nombre, también pueden englobarse muchas otras aminas. El papel de estas aminas como neurotransmisores no está claro, pero sus concentraciones en el cerebro están marcadas por ciertas drogas psicotópicas. Asimismo, las aminas biogénicas han sido implicadas en gran variedad de desórdenes neurológicos y psiquiátricos [10].

La Serotonina es una sustancia ampliamente distribuida en el organismo humano, pudiéndose localizar del orden del 1-2% de la concentración total de esta amina en nuestro cerebro. Su importancia radica, por una parte, en sus propiedades vasoconstrictivas y, por otra, en su papel neurotransmisor y su participación en gran número de funciones fisiológicas y psicológicas, como la emoción, sueño, hambre, sed y actividad sexual. Asimismo, ha sido establecida su implicación en desordenes nerviosos como migrañas, depresión y esquizofrenia [11-16].

La existencia de la Serotonina es conocida desde hace más de un siglo y se ha estudiado en profundidad su distribución en medios biológicos y sus propiedades bioquímicas, fisiológicas y farmacológicas [17-18]. Así, por ejemplo, se han establecido relaciones entre migraña y nivel de Serotonina en plasma [15-16].

Por otra parte, se conoce también la existencia de Serotonina en algunos alimentos de consumo ordinario, aunque es poco conocido el papel que en ellos desempeña esta amina [19-21]. Según la teoría más ampliamente admitida, la Serotonina procede de la descarboxilación del aminoácido correspondiente, 5-Hidroxitriptófano [22]. Este proceso puede tener lugar por acción de microorganismos propios y característicos del proceso de fermentación y/o maduración del alimento, o bien debido a proliferaciones microbianas no estrictamente relacionadas con dicha elaboración [20, 23-24], que podrían surgir como consecuencia de contaminaciones durante la manipulación del alimento. En consecuencia, es posible relacionar la presencia de determinadas aminas con una falta de higiene en las operaciones previas o posteriores a la comercialización del producto [22].

A la ingestión de alimentos que contienen Serotonina se han atribuido los siguientes efectos [20]:

- Aumento de la excreción urinaria del ácido 5-Hidroxi-3-Indolacético, pudiendo dar lugar a diagnósticos erróneos de tumores “carcinoides” y feocromocitoma.
- Trastornos intestinales si la ingestión es elevada.
- Fibrosis de endomiocardio, cuando la ingestión es continuada.
- Posibles crisis hipertensivas, si el individuo que ingiere Serotonina está sometido a tratamiento con medicamentos inhibidores de la Monoamino-oxidasa.

Entre los derivados del Triptófano con un grupo hidroxilo sustituido en posición 5, se incluyen compuestos farmacológicamente activos. El Triptófano regula la síntesis de la Serotonina en el cerebro, e induce el sueño [25-26]. El 5-Hidroxi-Triptófano, al igual que la Serotonina, es bien conocido como neuroregulador en diversas funciones fisiológicas [27].

En la ruta biosintética de la Serotonina (Figura 2), ésta es metabolizada en el sistema nervioso central y en el periférico, a ácido 5-Hidroxi-3-Indolacético, por medio de la Monoamino-oxidasa,. Asimismo, es precursora en la formación de Melatonina, a través de la N-Acetil-Serotonina, en la glándula pineal y en la retina [28].

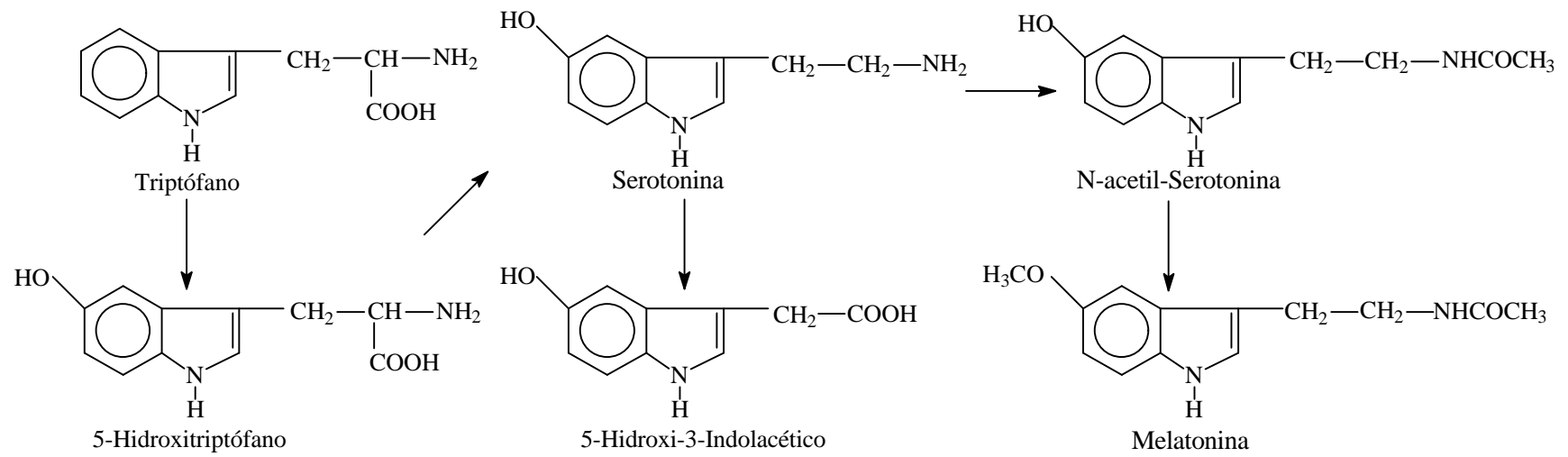


Figura 2.- Ruta biosintética de la Serotonina

Poliaminas

Las Poliaminas son compuestos nitrogenados alifáticos de bajo peso molecular y de naturaleza policatiónica. Engloban a un grupo de compuestos como la Putrescina, Cadaverina, Agmatina u Homoagmatina, que derivan de aminoácidos y se encuentran ampliamente distribuidos en las plantas. Participan en numerosos procesos de crecimiento y desarrollo de las plantas, entre los que cabe destacar la división celular, la diferenciación de hojas, flores y raíces, el desarrollo de la flor y fruto, la senescencia de órganos, etc. [29-31].

Muchas de las funciones desempeñadas por las poliaminas son semejantes a las ejercidas por las hormonas vegetales, como las auxinas. Además, se dispone de datos sobre la existencia de diversas interacciones entre poliaminas y fitohormonas en algunos sistemas vegetales [32].

Sin embargo, estas sustancias sólo ejercen su acción a elevadas concentraciones, y aún no se ha podido aclarar por completo cómo se desplazan a larga distancia por la planta, por lo que la mayor parte de los autores no las consideran todavía hormonas vegetales. Se cree que actúan uniéndose al ADN y estabilizando la molécula contra situaciones que llevarían a su desnaturalización, favoreciendo y acelerando la transcripción del ADN.

Con respecto a las auxinas y a otros reguladores del crecimiento, presentan la ventaja de no ser específicas de las plantas, ya que existen también en otros sistemas biológicos, como los animales o bacterias, en los que se ha demostrado de forma inequívoca que las poliaminas son compuestos esenciales para su crecimiento y desarrollo. Probablemente, éste ha sido el motivo del gran avance experimentado en este campo.

La diamina Putrescina y la triamina Espermidina se encuentran prácticamente en todos los organismos vivos, por lo que podría decirse que son biológicamente ubicuas. Los organismos procariotas poseen una mayor concentración de Putrescina que de

Espermidina, mientras que los eucariotas, normalmente poseen poca Putrescina y concentraciones altas de Espermidina y Espermina. La diamina Cadaverina, que normalmente procede de la descarboxilación del aminoácido Lisina, tiene una presencia más limitada; sin embargo, su distribución no ha sido estudiada completamente [33]. En la naturaleza existen otras poliaminas menos usuales y de distribución mucho más restringida.

Además, en los organismos vivos, las poliaminas no sólo se encuentran en forma libre, sino también conjugadas como amidas, unidas covalentemente a proteínas, ácidos nucleicos o a componentes celulares solubles, formando compuestos acetilados en las células animales, o bien cinamoil derivados en las células vegetales [34,35]. La función de estos compuestos está ligada a procesos como la reproducción, diferenciación floral o la resistencia frente a infecciones víricas [34, 36-37]. En cuanto a su función metabólica, se ha sugerido que podrían actuar como reservorio de poliaminas, liberándose más tarde en su forma libre, para realizar sus funciones durante el crecimiento [34]; aunque, también es posible que tengan funciones metabólicas por sí mismas [38-39].

Los precursores primarios para la síntesis de Putrescina en las plantas son los aminoácidos Ornitina y Arginina, que pueden interconvertirse mediante el ciclo de la Ornitina.

Las rutas de biosíntesis y degradación de las poliaminas en plantas están bien establecidas, ya que las principales enzimas metabólicas se han sintetizado a nivel bioquímico. Sin embargo, se desconocen aún los mecanismos de regulación enzimática a nivel molecular. Generalmente, se asume que las plantas superiores comparten con las bacterias, la existencia de dos vías alternativas para las síntesis de Putrescina: Una vía directa, catalizada por Ornitina descarboxilasa (ODC) y otra vía, indirecta, a través de una serie de intermediarios, catalizada por Arginina descarboxilasa (ADC).

En las plantas superiores, la Espermidina y Espermina son sintetizadas generalmente a partir de Putrescina y Metionina, como ocurre también en bacterias,

levaduras y mamíferos. Para que la Putrescina se convierta en Espermidina, es necesario añadir un grupo propilamino, procedente originariamente del aminoácido Metionina, que es convertido en s-Adenosilmetionina (SAM) y después descarboxilado, en reacciones catalizadas por las enzimas SAM-sintasa y SAM-descarboxilasa, respectivamente [35, 40-43].

El metabolismo de las poliaminas está regulado por diversos tipos de estímulos, tales como hormonas, luz, temperatura, ritmos cardiacos, estrés y senescencia.

El crecimiento y desarrollo de las plantas está bajo el control de ciclos diurnos de luz y temperatura, y dependen también de los ritmos endógenos circadianos. Este hecho se explica teniendo en cuenta que las poliaminas pueden actuar como reguladores del crecimiento y desarrollo. La luz regula el metabolismo de las poliamina en diferentes plantas y órganos a través de la enzima ADC. También la termorregulación se ejerce a nivel de esta enzima, aunque tampoco se descarta la posibilidad de que el nivel de SAM sea factor limitante.

El nivel de Putrescina se ve modificado en plantas sometidas a condiciones de deficiencia de K^+ y a otros tipos de estrés, como el osmótico, el ácido, las altas concentraciones de NH_4^+ , la exposición a contaminantes atmosféricos, tales como SO_2 ó Cd^{2+} , y las bajas temperaturas. Este control de las poliaminas por estrés, se realiza principalmente a nivel de la amina ADC. Cabe destacar que la respuesta de todas las plantas frente al estrés no es siempre igual [44], produciéndose aumentos o disminuciones según la especie.

Aunque estos compuestos se encuentran de forma natural en los sistemas fisiológicos, pueden producir efectos tóxicos cuando se consumen en grandes cantidades.

Entre las aminas biogénicas que con mayor frecuencia se han encontrado en alimentos destacan la Histamina, Serotonina y Tiramina. También se ha descrito la presencia de Putrescina, Cadaverina, Triptamina, Espermina, Espermidina y otras.

Las poliaminas son constituyentes normales en diferentes alimentos, como queso, vino, etc. En frutas, se ha visto que la concentración libre de las aminas decrece durante su desarrollo y aumenta durante el proceso de maduración [45-46]. También se ha encontrado en alimentos envejecidos, podridos o fermentados. Su presencia en grandes cantidades ha sido asociada con el deterioro de la comida [47].

La Histamina, por su parte, es bien conocida como agente causante de síntomas alérgicos, actuando otras aminas como estimuladores de la misma. Así, la cantidad de Histamina que puede absorberse en el intestino aumenta de 6 a 10 veces, en presencia de Putrescina y otras diaminas como la Cadaverina y Espermidina, debido a la competencia de éstas por los centros de unión a la mucosa intestinal [48]

Según la teoría más ampliamente admitida, estas aminas procederían de la descarboxilación de los correspondientes aminoácidos, de forma más o menos compleja.

La descarboxilación puede ocurrir por acción de microorganismos propios y característicos del proceso de fermentación y/o maduración, necesarios para la elaboración del alimento (quesos, embutidos, vinos, etc), o bien, son debidos a proliferaciones microbianas no esencialmente relacionadas con dicha elaboración. En este último caso, podrían aparecer en los alimentos debido a procesos de contaminación, durante la manipulación del mismo. Por ello, en principio, cabe relacionar la presencia, al menos a partir de un cierto nivel, de determinadas aminas, con una falta de higiene en las operaciones relacionadas con la comercialización del producto.

Así, el nivel de algunos de estos compuestos se ha empleado como índice de calidad de determinados productos alimenticios, como el pescado. Dicho índice (IC), se establece mediante la expresión:

$$IC = \frac{\text{Histamina} + \text{Cadaverina} + \text{Putrescina}}{1 + \text{Espermina} + \text{Espermidina}}$$

Los contenidos de Histamina, Cadaverina, Putrescina, Espermina y Espermidina, se

expresan en ppm.

Cuanto mayor sea el cociente, tanto mayor será el grado de descomposición. Ello será debido a unos valores relativamente elevados de Histamina, Cadaverina y Putrescina, mientras que los de Espermina y Espermidina, pueden incluso disminuir al avanzar la descomposición.

2.- DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE DERIVADOS DEL INDOL Y AMINAS BIOGÉNICAS.

Derivados del Indol

Para llevar a cabo la determinación de mezclas de derivados del Indol y de aminas biogénicas, es necesario un paso previo de separación de los compuestos que se quieren determinar, para lo cual suelen usarse técnicas cromatográficas. La cromatografía de gases está limitada por los pasos previos de purificación, que son largos y complicados. La cromatografía en capa fina, en sus modalidades ordinaria y de alta resolución, se han empleado más con fines preparativos o identificativos, que para la cuantificación de estas sustancias. La técnica más utilizada actualmente para el análisis de estos compuestos, es la Cromatografía Líquida de alta Resolución, en columna.

La detección de auxinas y compuestos relacionados después de su separación por HPLC se ha llevado a cabo aprovechando su fluorescencia natural, por absorción de radiación UV/V [49-50], así como haciendo uso de detección electroquímica [51-69].

En la Tabla 1 se resumen algunas de las determinaciones de estos compuestos por HPLC, indicando el sistema de detección utilizado y el tipo de muestra analizada. Solamente se han incluido aquellos compuestos que se estudian en la presente Memoria.

La Cromatografía en Capa Fina se ha empleado para la purificación rápida del ácido Indol-3-Acético en numerosas muestras [29], así como para el aislamiento de compuestos conjugados de este ácido [30-31]. Los respectivos indoles pueden determinarse por revelado de las placas con el reactivo de van Urk-Salkowski [32], usando Gel de Sílice como soporte [33] o Celulosa [34]. El ácido Indol-3-Acético también se ha determinado por densitometría UV , después de su separación en Gel de Sílice y revelado con o-Ftalaldehído [37].

El Triptófano y su metabolito, el 5- Hidroxi-Triptófano, han sido determinados en diferentes muestras, como en orina, con detección por Fosforescencia después de separar físicamente la porción de soporte que contiene el analito [38]. Ambos compuestos, contenidos en muestras de vinos, se han detectado por Fluorescencia, junto a otros compuestos, después de revelar las placas con distintos reactivos [39].

Tabla 1.- Determinación por HPLC de derivados del Indol.

COMPUESTOS	DETECCIÓN	TIPOS DE MUESTRA	REF.
Ácido 3-Indolacético	Fluorescencia	Plantas, raíces	70
5-Hidroxi-3-Indolacético	Electroquímica	Muestras biológicas	69
Triptófano	UV [215 nm]	Queso	49, 50
5-Hidroxi-3-Indolacético, Serotonina.	Electroquímica	Muestras biológicas	68
Triptófano	Fluorescencia	Alimentos	71
Triptófano, Serotonina, 5-Hidroxi-3-Indolacético	Fluorescencia	Tejidos humanos	72
Serotonina, 5-Hidroxi-3-Indolacético,	Electroquímica	Muestras biológicas	73
5-Hidroxi-3-Indolacético, Serotonina, Triptófano	Electroquímica	Muestras fisiológicas	51
5-Hidroxi-3-Indolacético, Serotonina	Electroquímica	Fluidos del cuerpo humano	52
5-idroxi-3-Indolacético, 3-Indolacético	Electroquímica	Plasma humano	53
5-Hidroxi-3-Indolacético, Serotonina	Electroquímica	Cerebro y Fluido fisiológico humanos	54
5-Hidroxi-3-Indolacético, Triptófano	Fluorescencia	Muestras fisiológicas	55
5-Hidroxi-3-Indolacético, Triptófano	Electroquímica	Fluido cerebroespinal	56
5-Hidroxi-3-Indolacético, Triptófano, Serotonina	Electroquímica	Cerebro y Tejido de cerebro de rata	57, 64-67
5-Hidroxi-3-Indolacético, Serotonina	Electroquímica	Tejido cerebral	56, 59-63

Poliaminas

La determinación de aminas biogénicas y, entre ellas las poliaminas, han sido objeto de numerosos estudios en los últimos años, debido a su importante papel en diversos sistemas fisiológicos animales y vegetales.

La determinación de estos compuestos requiere en la mayoría de los casos, del uso de agentes derivatizantes, cuya elección ha de realizarse teniendo en cuenta la técnica empleada para la separación. En HPLC se recurre a la espectrofotometría, a la fluorescencia, a la detección electroquímica y, en menor medida, a otros métodos de detección, como la espectrometría de masas. En CG se emplean como detectores el FID, TSD, NPD y MS. La determinación por HPTLC empieza a avanzar con el uso de la densitometría de absorción y la fluorescencia, mediante el uso de reactivos de derivatización que den señal y disminuyan los límites de detección. Diferentes reactivos fluorogénicos han sido utilizados, destacando o-Ftaldehído con 2-Mercaptoetanol, Fluorescamina y Cloruro de Dansilo.

La derivatización con o-Ftaldehído y 2-Mercaptoetanol, convierte las aminas primarias en compuestos fluorescentes. Esta reacción es rápida, pero el producto fluorescente es inestable en medio acuoso, pudiéndose realizar la derivatización en pre- o post-columna. La Fluorescamina cubre un campo de aplicación similar al o-Ftalaldehyído, aunque con menos ventajas. El Cloruro de Dansilo reacciona con aminas primarias y secundarias. Puede ser usado en derivatización pre-columna, aunque debido a su propia fluorescencia, los productos fluorescentes de los analitos deben ser separados del exceso de reactivo antes de ser analizados.

En la Tabla 2 , se han agrupado algunas determinaciones de aminas biogénicas por HPLC, incluyendo el agente derivatizante utilizado, el sistema de detección y la naturaleza de la muestra objeto de análisis. Se observa que, en general, el sistema de detección más utilizado es la Fluorescencia, seguido de la espectrofotometría UV o con diodos en fila y, en menor medida, la detección Electroquímica.

Como se ha dicho para los derivados del Indol, la CG es una técnica menos empleada que la Cromatografía Líquida de Alta Resolución. La Tabla 3 reúne distintas determinaciones de poliaminas mediante Cromatografía de Gases. En general, se requiere la formación de derivados y, en cuanto a la detección, se han utilizado distintos tipos: NPD, ECD, FID y MS, principalmente [74-86].

Por último, también la Cromatografía Líquida en Capa Fina se ha empleado en el análisis de Poliaminas, después de su derivatización, usando Celulosa [44] o Gel de Sílice [38-39] como fases estacionarias preferidas, con diferentes fases móviles y varios métodos de detección [36].

Principalmente, la Cromatografía Líquida en Capa Fina se ha empleado para la determinación de aminas biogénicas con fines cualitativos, mediante el tratamiento o revelado de la placa con diferentes reactivos [43-44, 87-88] o, en menor proporción, para análisis cuantitativo. En este caso, la cuantificación suele realizarse mediante separación de la mancha del soporte y disolución del analito para su posterior determinación, como en el caso de los dansilderivados [35, 41-42], o por densitometría en la propia placa [41]. Las muestras analizadas son, preferentemente, alimentos [35, 39-40, 42] y muestras biológicas [38].

Tabla 2.- Determinación de poliaminas por HPLC.

COMPUESTOS	DETECCIÓN	AGENTE DERIVATIZANTE	TIPOS DE MUESTRA	REFERENCIA
Putrescina	UV (340nm)	Cloruro de Dansilo	Tejidos de tabaco	89
Putrescina, Cadaverina	Fluorescencia	OPA-Mercaptoetanol	Vino	90, 91
Espermidina, Espermina, Putrescina	UV (254nm)	Cloruro de Benzoilo	Vegetales	92, 93
Putrescina, Cadaverina, Espermidina	Fluorescencia	Cloruro de Dansilo	Vino	94
Cadaverina, Putrescina	UV	Cloruro de Dansilo	Alimentos	95-100
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	Cloruro de Dansilo	Muestras biológicas	101-102
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	UV	OPA-Mercaptoetanol	--	103
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	UV (254 nm)	Cloruro de Benzoilo	Plantas superiores	104-107
Cadaverina, Putrescina, Espermina, Espermidina	Fluorescencia	Fluorescamina	Cerveza, Mosto y Vino	102
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	Cloruro de Dansilo	Plantas superiores	79, 108, 109
Putrescina, Espermidina, Espermina	UV (227nm)	Cloruro de Benzoilo	Plantas superiores	110
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	Cloruro de 9-Fluorenilmetilcloroformato	Vino, Jugo de frutas, Jugos vegetales	111, 112
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	Electroquímica	--	Comida para animales	113
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Diodo-array	Cloruro de Dansilo	Aceitunas de mesa	114
Putrescina, Cadaverina	Visible (546nm)	--	Queso, Vino, otros alimentos	72
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	Carbamato de 6-aminoquinolil-N- hidroxisuccinimidilo	Vino	115-117
Putrescina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	Cloruro de Dansilo	Muestras fisiológicas	118
Putrescina, Cadaverina,	UV (260 nm)	2-Hidroxinaftaldehido	Tomate	119
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina,	Fluorescencia	Cloruro de 9-Fluorenilmetilcloroformato	Vino	112
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Fluorescencia	OPA- Mercaptoetanol	Plasma y Sangre	74-78,120, 121

Tabla 3.- Determinación de poliaminas por CG.

COMPUESTOS	DETECCIÓN	AGENTE DERIVATIZANTE	TIPOS DE MUESTRA	REFERENCIA
Putrescina, Cadaverina	NPD	Perfluoropropionilo	Atún enlatado, Salmón, Gambas.	74
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina,	NPD	Anhídrido Heptafluorobutírico	Orina	75
Putrescina, Cadaverina	TSD	--	--	76
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	NPD	Metilheptafluorbutiril	Fluidos Biológicos	77
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	ECD	Cloruro de pentafluorobenzoilo	Orina	79
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina,	FID	Isobutiloxicarbonilo	Orina	80
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	NPD	Isobutiloxicarbonilo	Plasma	81
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	ECD	Pentafluoropropionilo	Orina	82
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	ECD	Anhdrido Heptafluorbutirico	Orina	83
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina			Extractos de tejidos	78
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	MS	--	Orina	84
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	MS	Pentafluoropropionilo	Orina	85
Putrescina, Cadaverina, Espermina, Espermidina	MS	Metilheptafluorbutiril	Fluido cerebroespinal	86

3.- CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Básicamente, no puede considerarse la HPTLC o Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución como una técnica nueva, ya que no existen diferencias fundamentales con la modalidad convencional y los procedimientos son similares. La HPTLC es el resultado del perfeccionamiento de los distintos componentes del sistema cromatográfico: Calidad del soporte, consistencia de las capas, equipos para aplicar las muestras, técnicas de desarrollo, revelado y sistemas de detección.

La diferencia fundamental entre ambas técnicas se encuentra en la calidad de los soportes o sorbentes, en lo que se refiere a purificación, tamaño reducido de partículas y distribución homogénea de las mismas. De todos los sorbentes, el más utilizado es la Gel de Sílice y en mucha menor proporción la Celulosa microcristalina.

La HPTLC es una técnica instrumental muy ligada al uso de capas optimizadas cinéticamente, preparadas a partir de partículas con una distribución del tamaño muy uniforme, que oscila entre 5 y 15 μm , frente a los 16-60 μm de las capas de TLC, control preciso sobre las operaciones de aplicación de muestra, desarrollo del cromatograma y evaluación "in situ" del cromatograma, así como la posibilidad de automatización [122].

Las capas utilizadas en HPTLC son más compactas y, por tanto, su capacidad de muestra es menor, por lo que es necesario aplicar volúmenes inferiores de muestra. Como consecuencia disminuye también el diámetro inicial y final de las manchas. De esta forma, se obtienen manchas más compactas, se consiguen límites de detección mejores y disminuye considerablemente la distancia que necesitan los solutos para ser separados.

Si bien la velocidad de la fase móvil es menor en HPTLC, debido al pequeño tamaño de las partículas del soporte, la longitud del lecho cromatográfico necesaria para que se consiga la separación también es considerablemente menor. Por ello, el tiempo requerido para la separación es también bastante más corto.

La aplicación de la muestra es uno de los procesos más críticos en Cromatografía

en Capa Fina de Alta Resolución, ya que es el que más influye en la calidad de la separación y en la cuantificación de la muestra. Para conseguir una resolución, reproducibilidad y sensibilidad máximas, el tamaño de las manchas aplicadas debe ser pequeño (<1mm) y lo más uniforme posible. Se pueden usar aparatos automáticos que depositan la muestra mediante microjeringa, a la vez que evaporan el disolvente con una corriente de gas inerte.

En términos comparativos, puede señalarse que: el número de platos teóricos conseguidos con HPTLC es de unos 5000 frente a los 600 de TLC. Por otra parte, la mejora en la eficacia da lugar a un menor ensanchamiento de banda y manchas más compactas. Por último, la variación de la AEPT (Altura Equivalente de Plato Teórico) a lo largo del desarrollo cromatográfico es mucho menor en HPTLC, unos 12 μm , frente a los 30 μm de TLC.

La cromatografía plana ofrece algunas posibilidades únicas para aumentar tanto la separación como la detección, constituyendo una técnica importante para el análisis de mezclas complejas, identificación de componentes y análisis de trazas.

HPTLC y HPLC son técnicas complementarias. La separación tiene lugar por los mismos mecanismos de retención, diferenciándose por su desarrollo cinético, formato de la fase estacionaria, y uso del modo de desarrollo en TLC y de la elución en HPLC para llevar a cabo la separación [123].

TLC debe ser considerada para aquellas aplicaciones en las que deben analizarse muestras que requieran mínima preparación de la muestra, donde el uso de esta técnica permite reducir el número de pasos de preparación de la muestra y cuando se requieran reacciones post-cromatográficas para detectar los analitos separados. Otra gran ventaja es la posibilidad de detección off-line, utilizando gran variedad de métodos selectivos de detección, que pueden ser aplicados secuencialmente. Asimismo, los analitos separados pueden ser guardados para su posterior cuantificación.

Una de las razones que hacen preferir la HPLC para el análisis, es su gran

capacidad de separación para muestras que contengan mayor número de componentes de los que se pueden resolver por TLC. Por otra parte, existe un gran número de fases estacionarias disponibles para el desarrollo de métodos. Hay un amplio rango de opciones de detección, y la automatización para operaciones sin personal, es normalmente más sencilla. Otras razones, tales como la familiaridad, disponibilidad de equipos y la experiencia, justifica que en muchos casos se utilice HPLC, en determinaciones donde HPTLC debería ser lógicamente la primera opción [124].

Sin embargo, es más importante apreciar el carácter complementario de los métodos de cromatografía líquida, que excluir un método por el otro para todo tipo de muestras.

En numerosas aplicaciones [122], los analitos necesitan un cromóforo, como es el caso de ácidos orgánicos, lípidos, carbohidratos, surfactantes, etc. La facilidad de usar reacciones postcromatográficas para su determinación, es la razón principal para la elección de TLC.

La posibilidad de analizar muestras con mínima influencia de la matriz, es importante para el análisis de drogas en fluidos biológicos, residuos de pesticidas en cultivos, drogas veterinarias en productos cárnicos y para verificar productos de plantas en farmacia y comercio. La separación simultánea de muestras en paralelo es importante en estudios de screening y otras aplicaciones, donde un número grande de muestras del mismo tipo tienen que ser analizadas, por ejemplo, en higiene industrial, detección de drogas de abuso en fluidos biológicos y análisis regulatorio. También se han encontrado ventajas económicas del uso de TLC para la investigación preliminar de residuos de sulfonamida en muestras de carne, con confirmación por HPLC, en comparación con el uso exclusivo del método de multiresiduos de HPLC [125].

Un hecho característico de las separaciones por TLC, empleando un desarrollo simple, controlado por flujo capilar, es la producción de una serie de zonas con un ancho de banda que crece aproximadamente de forma proporcional a la distancia de migración. La distancia de migración viene dada por las fuerzas de capilaridad envueltas en el

transporte de la fase móvil a través de la capa de fase estacionaria y, a cierta distancia de la posición de entrada del disolvente, éstas fuerzas se vuelven demasiado débiles para mantener una velocidad apropiada de la fase móvil. Así, resulta que la capacidad de separación en estos experimentos está limitada, en primer lugar, por el aumento de las dimensiones del ancho de banda en la dirección de la migración y, en último lugar, por la distancia total de migración.

Los métodos multidimensionales, usados para mejorar la capacidad de separación en cromatografía plana, consisten normalmente en desarrollos unidimensionales múltiples y bidimensionales, llevados a cabo bajo condiciones de capilaridad controlada o flujo forzado de la fase móvil, gradientes de la fase móvil y sistemas de automatización.

Por otra parte, el uso de flujo controlado capilarmente, acoplado al mecanismo de desarrollos múltiples, produce también un aumento significativo en la capacidad de separación de una fase dada. Aunque este método es más fácil de usar experimentalmente, también requiere tiempos mayores que los desarrollos que emplean flujo forzado [125-127].

Todos los desarrollos unidimensionales múltiples emplean técnicas sucesivas de desarrollo repetido de la fase estacionaria en la misma dirección, eliminando la fase móvil entre desarrollos y retornando la placa seca a la cubeta, haciendo llegar siempre el disolvente a la misma distancia. La mejor solución para separar los componentes de una mezcla en una placa, no suele ser el uso de una distancia de migración fija en desarrollos múltiples, generalmente se aumenta dicha distancia para evitar en los últimos pasos del desarrollo evitar que los componentes menos retenidos migren con el frente del disolvente [128-130], en los últimos pasos del desarrollo. Este desarrollo incremental múltiple proporciona una mejor separación, ya que minimiza las zonas de ensanchamiento y aumenta las separaciones de la zona centro, por migración de los componentes de la mezcla una distancia mayor, mientras se mantiene una velocidad de la fase móvil mayor que la obtenida en cromatografía múltiple, con migración a distancia fija. Este tipo de cromatografía es útil para la separación de mezclas de un amplio rango de polaridad [126,

131].

Sin embargo, no todos los compuestos pueden ser separados por desarrollo múltiple [126, 127]. Así, los compuestos con presión de vapor significativa, pueden ser perdidos en los sucesivos pasos de evaporación del disolvente. Ciertos disolventes de baja volatilidad y/o alta polaridad, como el ácido Acético o la Trietilamina, no deben usarse como fases móviles, debido a la dificultad para eliminarlos del soporte mediante vacío o por evaporación a flujo forzado, entre los distintos desarrollos. Además, los residuos del disolvente que quedan después de las distintas fases de secado, pueden modificar la selectividad de las fases móviles usadas en pasos sucesivos, dando lugar a separaciones irreproducibles. Las impurezas del disolvente pueden ser la fuente de picos fantasma o de líneas base irregulares en el análisis por densitometría. El Cloruro de Dansilo, por ejemplo, se hidroliza en las placas de Gel de Sílice a su forma ácida. Dicha hidrólisis es lenta e incompleta, dando lugar a múltiples picos en el cromatograma a intervalos uniformes, que se corresponden con el número de desarrollos.

Sistemas de detección

Una vez separados los componentes de una mezcla, se requiere la detección de las sustancias individuales, ya sea para su identificación, para la confirmación de la estructura de un compuesto o para su cuantificación.

Como ya se indicó, el análisis por TLC tiene la ventaja de que pueden eluirse simultáneamente varias placas para su evaluación posterior, permitiendo un análisis previo de la determinación cualitativa. Asimismo, puede centrarse el análisis en una sustancia concreta, sin tener que esperar a la elución de otras sustancias extrañas de la columna, como en cromatografía líquida en columna. Pero, además, se tiene la posibilidad de observar la presencia de sustancias extrañas que se perderían en su elución por una columna cromatográfica.

La selectividad y la eficacia cromatográfica en TLC no se ven comprometidas por la necesidad de un detector, sino que la separación puede ser almacenada en la propia

placa para su evaluación posterior. En este sentido, la separación y la determinación pueden llevarse a cabo en sitios diferentes [132].

Numerosas técnicas de detección se han usado, acopladas a TLC, para la determinación de gran número de compuestos.

La determinación cuantitativa de los solutos separados mediante HPTLC se realiza sobre la placa por densitometría, midiendo la radiación absorbida o la fluorescencia emitida. El uso de potentes fibras ópticas ha supuesto un gran avance en este campo. En densitometría de absorción, las manchas se cuantifican mediante un haz de radiación monocromática que se hace pasar por una rendija, que selecciona el diámetro del haz, de forma que sea igual al de la mancha más grande. La radiación reflejada o dispersada se detecta utilizando un fotomultiplicador que dará señal máxima en las zonas de la placa que no contengan solutos absorbentes, mientras que la manchas absorbentes producirán una disminución de la radiación reflejada, que dependerá de sus concentraciones. La medida de fluorescencia mejora el límite de detección, el rango de linealidad y la selectividad, por lo que a veces se recurre a la formación de derivados fluorescentes para optimizar la cuantificación.

La espectroscopía de Fluorescencia es bastante empleada como técnica de detección cuantitativa en TLC. Comparada con la detección en el UV/V, la fluorescencia es mucho más sensible, dando límites de detección en el rango de picogramos [133]. Ofrece también mayor selectividad debido a la utilización de dos longitudes de onda (de excitación y emisión) y a que los compuestos no fluorescentes no son detectados.

El acoplamiento TLC-MS ha sido usada de forma considerable, con la elución del analito en el soporte y posterior introducción del material aislado en la cámara de ionización del espectrometro. Pero, a pesar de su efectividad, presenta ciertos inconvenientes, entre los que hay que destacar el tiempo que consume y la posibilidad de introducción de contaminantes en el proceso de separación por parte del soporte, así como posibles pérdidas durante la manipulación [134-135].

El uso de la Espectroscopía Infrarroja con Transformada de Fourier (IR-TF) como técnica de detección, aporta la gran capacidad discriminadora de este método, que lo convierte en una poderosa herramienta de identificación de compuestos. Aún cuando no se tengan espectros de referencia de los compuestos, se puede obtener una valiosa información sobre la estructura molecular de los analitos. Los compuestos pueden ser analizados directamente sobre la placa [136-141], lo que da lugar a la aparición de interferencias espectrales debidas a la fase estacionaria [140]. Asimismo, se pueden extraer los analitos de la placa y redissolver en un disolvente que no de señal en el IR, previamente al análisis [138-139, 142-145].

La Espectroscopía Raman puede ser también un método útil para la identificación de compuestos separados por TLC. Las bandas Raman derivan de los modos de vibración fundamentales de la molécula, dando un espectro único que permite la identificación del analito. Al igual que en IR, se puede obtener información estructural del compuesto usando las frecuencias de los grupos funcionales [146].

4.- FLUORESCENCIA SOBRE SUPERFICIES SÓLIDAS.

El análisis fluorescente sobre superficies sólidas consiste en la medida de fluorescencia de compuestos adsorbidos en materiales sólidos. Una gran variedad de estos materiales se han empleado en análisis, tales como Gel de Sílice, Óxido de Aluminio, papel de filtro, Celulosa, etc. Diferentes tipos de papel de filtro han sido utilizados como sustrato [147].

Una diferencia fundamental entre la fluorescencia en disolución y la fluorescencia en superficies sólidas es que, en esta última, los compuestos fluorescentes son adsorbidos en pequeñas partículas del material sólido, y esto trae consigo la dispersión tanto de la radiación procedente de la fuente como de la radiación luminiscente. La radiación puede ser reflejada del material sólido o transmitida a través del mismo.

Generalmente, en análisis de fluorescencia sobre superficies sólidas, una fracción

de la muestra penetra dentro de la matriz del sólido, y la fluorescencia de la muestra es excitada en la superficie y dentro de la matriz del sólido.

Wendlandt y Hecht [128] estudian las diferencias entre reflexión especular y reflexión difusa, conceptos importantes en análisis fluorescente sobre superficies sólidas. La reflexión especular ocurre desde una superficie muy lisa y es descrita por las ecuaciones de Fresnel. La reflexión difusa resulta de la penetración de la radiación incidente en el interior del material sólido y ocurre una dispersión múltiple en los límites de las partículas individuales. La reflexión difusa ideal es definida por la condición de que la distribución angular de la radiación reflejada es independiente del ángulo de incidencia [129]. Varias teorías han sido desarrolladas para describir la reflexión difusa.

La fluorescencia sobre superficies sólidas es una técnica muy sensible y selectiva para el análisis traza de compuestos orgánicos [130]. Límites de detección de nanogramos son fácilmente obtenidos, y en muchos casos se pueden alcanzar límites de detección del orden de picogramos. Pequeñas cantidades de muestra, del orden de 1 μ l o menos, son empleadas para análisis por fluorescencia sobre superficies sólidas, característica muy importante cuando son usados materiales tóxicos o biológicos.

El análisis fluorescente sobre superficies sólidas ha encontrado amplia aplicación en diferentes campos. Así se han desarrollado diferentes métodos para el análisis cuantitativo y cualitativo de una gran variedad de contaminantes, por medida de la fluorescencia de los compuestos directamente sobre la superficie sólida. Sawiski y colaboradores [148] fueron los pioneros en el desarrollo y aplicación de esta técnica en el análisis de contaminantes atmosféricos.

Asimismo, la fluorescencia sobre superficies sólidas ha sido aplicada para la detección, identificación y cuantificación de Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos en muestras de agua [149-150]. Hurtubise [151] desarrolló un método para la determinación de Benzo(a)pireno, en muestras de agua, después de su extracción y separación de cromatoplasmas de Celulosa acetilada y detección fluorescente, alcanzando límites de detección de 0.08 ppb.

La TLC con detección fluorescente se ha aplicado también a la detección de compuestos del petróleo, así como en el análisis de aceites [152-154].

También la fluorescencia sobre superficies sólidas ha sido aplicada extensamente al análisis de alimentos, destacando la determinación de compuestos fenólicos [155-156], Histamina [157-158], N-nitrosaminas [159-160], etc. Asimismo, numerosos pesticidas se han analizado por la medida de fluorescencia sobre cromatoplasmas de TLC. En la bibliografía se encuentran algunas revisiones bibliográficas [161-162] dedicadas a la utilización de la derivatización fluorimétrica para el análisis de residuos de pesticidas. Por último, otros campos de aplicación de las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas han sido la industria farmacéutica, en Bioquímica, Medicina y Química Clínica [163].

El gran desarrollo en la instrumentación analítica en Cromatografía en Capa Fina [164-165], y concretamente la aplicación de sensores con fibra óptica, que permiten la medida de fluorescencia en puntos alejados de la fuente de excitación y detección, ha supuesto un gran desarrollo en las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas de compuestos previamente separados haciendo uso de TLC o HPTLC [131, 166-170].

Objetivos

Los derivados del Indol estudiados en la presente Memoria: ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina, son compuestos que forman parte de numerosos e importantes procesos bioquímicos, relacionados con aspectos fisiológicos y neurológicos de los seres vivos y, entre ellos, las personas. Por su parte, las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, también son sustancias biogénicas, estrechamente vinculadas a transformaciones que ocurren en alimentos de origen animal y vegetal, incluidas la fermentación, maduración, putrefacción, elaboración y conservación de los mismos. La estructura de los dos grupos de compuestos estudiados se muestra en las Figuras 1 y 2, respectivamente.

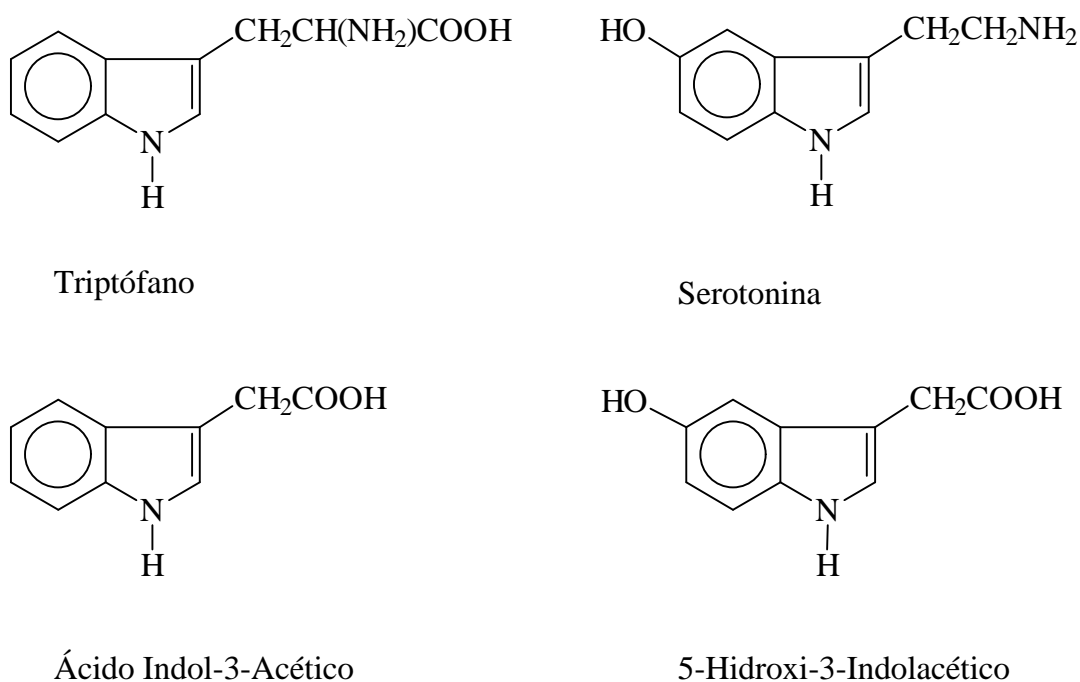


Figura 1.- Estructura de derivados del Indol.

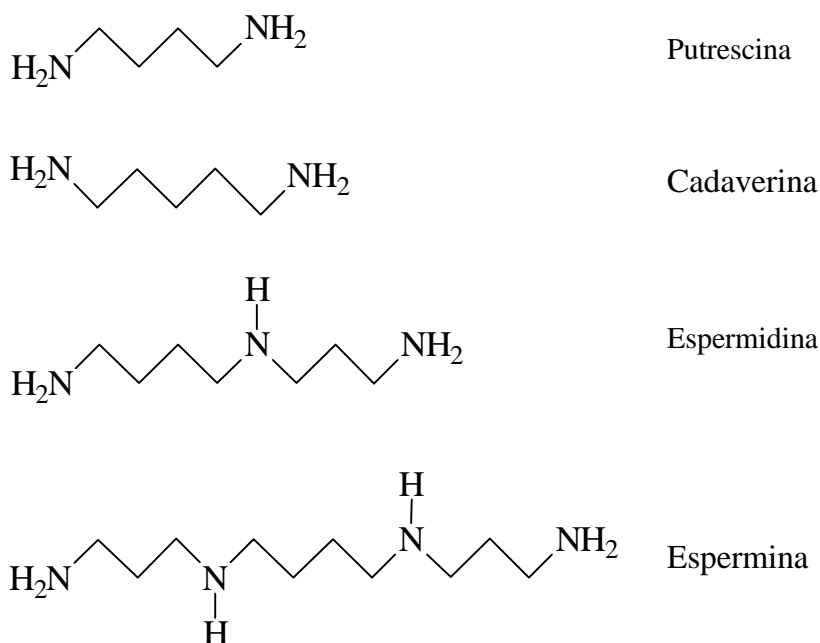


Figura 2.- Estructura de poliaminas.

Conocido el interés de ambos tipos de productos y algunas características de los mismos, como las siguientes:

- Los derivados del Indol citados presentan fluorescencia nativa. Sin embargo, las poliaminas no lo hacen, pero habitualmente se determinan haciendo uso de las medidas de fluorescencia después de la formación de derivados, reacciones que presentan como principal inconveniente su lentitud.
- Habitualmente dichos productos se determinan haciendo uso de métodos analíticos que requieren de operaciones previas de separación de componentes que dificultan o interfieren en la etapa de medida.

Se definió como objetivo central de la Tesis, el desarrollo de metodologías para el análisis de los compuestos citados, en muestras reales, que, además de presentar

suficiente sensibilidad y selectividad, permitan obtener resultados fiables y correctos, en el menor tiempo posible.

Para alcanzar dicho objetivo global, se propusieron algunos objetivos parciales, entre los que destacan los siguientes:

- S** Simplificación del tratamiento previo de las muestras o de las etapas de clean-up, introduciendo como técnica de separación la Cromatografía en Capa Fina convencional (TLC) o de Alta Resolución (HPTLC), en sustitución de otras técnicas cromatográficas habitualmente utilizadas como las de HPLC, con la ventaja adicional de poder tratar simultáneamente varias muestras o, de forma conjunta, muestras y patrones.
- S** Emplear como método de detección la fluorescencia convencional, con el empleo de una fibra óptica acoplada a un espectrofluorímetro, con objeto de aprovechar, por una parte, las ventajas de sensibilidad y selectividad que ofrece la técnica y, por otra parte, poder efectuar las medidas directamente sobre la fase estacionaria en que se han efectuado las separaciones.
- S** Mejorar la cinética de formación de los derivados fluorescentes de las poliaminas, empleando, entre otras, la radiación de microondas.
- S** Mejorar la señal fluorescente obtenida sobre el soporte sólido, mediante la incorporación directa de surfactantes, capaces de formar sistemas micelares, al soporte o a la fase móvil utilizada en la separación.

Los resultados obtenidos en el trabajo realizado a lo largo del desarrollo de estos objetivos, se incluyen en los siete capítulos que conforman la presente Memoria, cuyos contenidos se resumen a continuación:

- S** En el Capítulo II se estudia el comportamiento fluorescente de los cuatro derivados del Indol, en diferentes fases sólidas, escogidas entre las comunmente empleadas en medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas.
-

- Asimismo, se establece un nuevo método para la separación y cuantificación de los mismos, mediante la medida de su fluorescencia natural sobre soporte de celulosa.
- S** En el Capítulo III se hace uso de la radiación de microondas, con objeto de disminuir el tiempo de reacción en la formación de derivados fluorescentes de las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, con Cloruro de Dansilo. Por otra parte, se establece un método para la determinación de derivados dansilados de poliaminas por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.
- S** En el Capítulo IV se estudia el comportamiento fluorescente de los derivados dansilados de las poliaminas, en diferentes soportes sólidos, y se desarrolla un nuevo método para la determinación de dichos derivados, haciendo uso de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución, sobre soporte de Gel Sílice.
- S** El Capítulo V describe el efecto de la adición de surfactantes no iónicos a la fase móvil, en la separación y cuantificación de los derivados dansilados de poliaminas HPTLC con detección fluorescente.
- S** En el Capítulo VI se lleva a cabo la determinación de poliaminas dansiladas en muestras de cerveza y se estudian lcorrelaciones entre aminas, así como las posibles agrupaciones entre las muestras, haciendo uso del análisis multivariante.
- S** En el último capítulo se estudia la relación existente entre la señal fluorescente medida sobre superficies sólidas y las concentraciones de fluoróforo, y se establecen las principales características quimiométricas relacionadas con los métodos de análisis por HPTLC con detección fluorescente.
-

Capítulo 1
PARTE EXPERIMENTAL

I.1.-APARATOS UTILIZADOS

Espectrofluorímetro

Las medidas de fluorescencia y los espectros de excitación y emisión, sobre los distintos soportes y en disolución, se realizaron con un espectrómetro de luminescencia Perkin -Elmer LS-50, equipado con una lámpara pulsante de Xenon, y conectado vía interfase RS232C a un ordenador Epson PCAX2e. El control del aparato se lleva a cabo mediante el software “Fluorescence Data Manager”.

Para las medidas en disolución se utilizaron células de cuarzo de 1 cm de paso de luz, termostalizadas a $25\pm 0.1^{\circ}\text{C}$ con un termostato-criostato Selecta Frigitherm S 382.

Lector de placas

Para el análisis por fluorescencia sobre superficies sólidas, el espectrómetro de luminescencia puede acoplarse a un accesorio mediante una fibra óptica bifurcada, que permite transmitir la radiación de fluorescencia emitida por una sustancia depositada sobre la superficie, cuando es excitada a una determinada longitud de onda. La placa puede ser leída en las direcciones X e Y, para la localización y/o cuantificación de los analitos, mediante dos motores de paso independientes, que permiten el movimiento de la fibra óptica en ambas direcciones. El accesorio es controlado a través del mismo programa que el espectrofluorímetro, permitiendo repetir las lecturas comenzando en diferentes puntos de los ejes X e Y.

Horno de Microondas

La dansilación de las poliaminas se realizó con un microondas CEM (Matthews, NC, USA) MDS 2000. El aparato puede proporcionar hasta unos 630 W (100%) de potencia de energía microondas, a una frecuencia de 2450 Mhz, y permite el seguimiento de las condiciones de reacción por medio de la medida en continuo de la presión en un recipiente de control. El sistema tiene capacidad para el almacenamiento de métodos de trabajo y de datos, pudiendo acoplarse a una impresora para la exportación de datos, durante o después de realizada la reacción.

Los recipientes usados para la dansilación en microondas son vasos de digestión CEM PFA Teflon. Los vasos son diseñados para análisis de alta pureza y pueden soportar temperaturas de 200 °C y presiones de 13.6 bar.

Inyector automático

En los estudios realizados en fase sólida, las muestras fueron depositadas sobre los distintos soportes por la técnica del spray-on, usando un aparato Linomat IV Camag (MuttENZ, Switzerland) controlado por microprocesador, que permite el almacenamiento en memoria de hasta 10 programas. El dispositivo permite controlar la posición, el volumen, tamaño y velocidad de deposición de la sustancia a inyectar, mientras una corriente de nitrógeno evapora el disolvente.

Se puede manipular manualmente o programar la posición exacta para la colocación de la gota, en placas cuyo tamaño puede alcanzar hasta 200 mm, fijando la distancia entre gotas sobre el soporte (1-190 mm). La inyección se realiza con jeringas cuyo volumen puede ser ajustado con exactitud entre 1 y 100 µl. La velocidad con que se deposita la muestra puede ser controlada (4-12 sg/µl) para obtener mayor precisión y sensibilidad. El ancho de banda de la gota que se deposita en la placa puede ser variado entre 0 y 190 mm.

Cromatógrafo líquido

El equipo de HPLC está constituido por un sistema de distribución multi-disolvente Waters (Milford, MA, USA) modelo 600, equipado con un inyector de muestras U6K, un detector espectrofotométrico Waters Lambda-Max 481 LC de longitud de onda variable y un integrador Waters modelo 740. La columna analítica es μ Bondapack C₁₈, 10 μ m, 125 D (30 cm x 3.9 mm) con una precolumna μ Bondapack C₁₈, ambas suministradas por Waters.

Otros instrumentos:

- Centrifugadora Ultra-Turrax.
- Las medidas de pH se realizaron con un Potenciómetro digital Radiometer PHM84, equipado con un electrodo doble de vidrio-calomelanos saturado.

I.2.-REACTIVOS Y DISOLUCIONES.

I.2.1.- Reactivos:

- El ácido Indol-3-Acético, el 5-Hidroxitriptófano y el Sulfato de Serotonina-Creatinina fueron suministrados por Aldrich Chemical Company, Inc. (Beerse, Belgium). El D-Triptófano utilizado se adquirió a Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)
 - Hidrocloruro de Putrescina, Dihidrocloruro de Cadaverina, Trihidrocloruro de Espermidina, Tetrahidrocloruro de Espermina y Cloruro de Dansilo fueron suministrados por Aldrich Chemical Company, Inc (Beerse, Belgium).
-

- Polioxietilen-10-lauril éter (POLE), polioxietilen-20-estearil éter (Brij 78) y Triton X-100 fueron adquiridos a Sigma Chemical Co.
- Ácido Perclórico (70% , $D=1.54 \text{ g ml}^{-1}$) Merck (Darmstadt, Germany), calidad reactivo analítico.
- Cloroformo (99% , $D=1.48 \text{ g ml}^{-1}$) PRS de Panreac (Barcelona, España), calidad ACS.
- Metanol (99.8% , $D=0.79 \text{ g ml}^{-1}$) y Amoniaco (25% , $D=0.91 \text{ g ml}^{-1}$), suministrado por Merck (Darmstadt, Germany), calidad reactivo analítico.
- Trietilamina (TEA) de Fluka (Buchs, Switzerland), calidad reactivo analítico.
- Acetonitrilo, de grado HPLC (Merck).
- Agua purificada mediante un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford. MA. USA).
- Acetona, calidad reactivo analítico (Merck).

Todos los reactivos utilizados se emplearon sin ningún tipo de purificación previa.

Las superficies sólidas usadas en las experiencias con Cromatografía en Capa Fina son placas 10x10 mm, de 0.1 mm de grosor, con las siguientes fases estacionarias: Celulosa, Gel de Sílice (HPTLC) y Sílice modificada químicamente C18, de Merck. Asimismo, se empleó papel de filtro Whatman-41 y papeles para Cromatografía de Intercambio Iónico de fosfato de celulosa (P81) y Dietilaminoetil celulosa (DE81), suministrados también por Whatman (Whatman International Ltd., Maidstone, England).

Los soportes no contienen indicador de fluorescencia y se activaron antes de su uso, bajo lámpara de IR.

I.2.2.-Disoluciones:

- Disoluciones de ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina. Se prepararon por pesada directa de 100 mg de cada producto y posterior disolución con Metanol:Agua (60:40) (v:v) en un matraz aforado de 100 ml. Las disoluciones se conservan protegidas de la luz mediante papel de aluminio para evitar descomposiciones fotoquímicas.
- Disoluciones de Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina. Se prepararon por pesada directa de 100 mg del clorhidrato de cada amina y posterior disolución con ácido perclórico al 5% en un matraz aforado de 100 ml. Las disoluciones son protegidas de la luz con papel de aluminio.
- Las disoluciones menos concentradas de los derivados del Indol y las poliaminas se prepararon por diluciones exactas de las anteriores con los disolventes adecuados.
- Cloruro de Dansilo. Se preparó por pesada directa del producto y posterior disolución en acetona para obtener una concentración de 5 mg/ml.
- Reguladora Bórax- NaOH pH=9.5. Se preparó Bórax 0.025 M por pesada directa de 1.257 g de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ y disolución en 250 ml de agua destilada. Este volumen fue mezclado con 92 ml de NaOH 0.1M (1 g en 250 ml) y enrasado a 500 ml con agua destilada.

I.3.- PROCEDIMIENTOS

Determinación de ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina:

Para la determinación del ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina se emplean disoluciones de 10 ng/ μl en Metanol:Agua (60:40) (v-v), preparadas por dilución a partir de las disoluciones iniciales de 1 mg/ml, y se depositan

volúmenes comprendidos entre 1 y 10 μl sobre fase estacionaria de Celulosa, previamente activada.

Los compuestos se eluyen con Cloroformo:Metanol:Amoniaco (12:7:1) (v:v:v), hasta que el disolvente alcanza una distancia, de aproximadamente 8 cm, desde la parte inferior de la placa.

Sobre las placas, una vez secas, se localizan los compuestos con el lector de placas y se realizan los espectros y las medidas de fluorescencia a $\lambda_{\text{exc}} = 280 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}} = 347 \text{ nm}$. Las medidas de intensidad de fluorescencia, como altura de pico, son corregidas con la señal del blanco, que corresponde a la señal emitida por la fase estacionaria, después de efectuada la elución, a las longitudes de onda indicadas.

Procedimiento para la determinación de ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina en suero:

Una alícuota de 1 ml de suero es tratada con 100 μl de ácido perclórico (70%), para su desproteinización y, posteriormente, se centrifuga a una velocidad de 3000 rpm, durante 5 min. A 400 μl de la disolución de sobrenadante se le añaden 32 μl de disolución que contiene 40 ng/ μl de cada uno de los indoles y se diluye al doble de volumen con Metanol:Agua (60:40) (v:v). Los derivados indólicos se determinan en las mismas condiciones que en el apartado anterior, a partir de 1-2 μl de suero enriquecido.

Dansilación convencional:

Se mezclan 2 ml de una disolución de aminas, con una concentración de 1 mg/ml, con 2 ml de disolución saturada de Bicarbonato de sodio y 3 ml de disolución de Cloruro de Dansilo en Acetona, a una concentración de 5 mg/ml. La disolución resultante se agita durante un minuto y se deja reaccionar toda la noche, en la oscuridad. Terminada la

reacción, se extraen las aminas dansiladas con dos porciones de tolueno de 2 ml, agitando 1 min en cada extracción. El extracto en tolueno se separa después de cada extracción y se diluye con el mismo disolvente a 10 ml, en matraz aforado.

Dansilación de poliaminas en microondas:

Para llevar a cabo la reacción de derivatización de las poliaminas con Cloruro de Dansilo se parte de una disolución, similar a la utilizada en el apartado anterior, que contiene: Disolución de las aminas, Bicarbonato de sodio saturado y Cloruro de Dansilo en Acetona. Se agita la mezcla durante 1 minuto en el propio recipiente de microondas, se cierra el vaso y se introduce en el microondas. La reacción de dansilación se lleva a cabo utilizando un 40% de potencia (252 W) durante 5 min, manteniendo una presión máxima de 3.4 bar (50 psi) en el interior del reactor. El recipiente se deja enfriar antes de su apertura y se transfiere la mezcla a un tubo de extracción, en el que se realizan dos extracciones con porciones de 2 ml de tolueno, agitando 1 min cada vez. El extracto es separado después de cada paso y diluido con Tolueno a 10 ml, en matraz aforado. De esta forma, se obtienen disoluciones de 50 ng/μl de las aminas dansiladas.

Extracción de poliaminas en tejidos de plantas:

Las muestras fueron sometidas a diferentes tratamientos para la adición de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas. La extracción de tejidos se llevó a cabo mediante la homogeneización en Ultra-Turrax a razón de 100 mg de peso fresco de tejidos de fruto de plátano (*Musa acuminata* Colla AAA cv. Dwarf cavendish) cultivados “in vitro” en un medio de Murashige y Skoog’s [171], por cada ml de ácido perclórico al 5%. Después de 1 hora sobre hielo, los extractos fueron centrifugados durante 20 min a 27000g. La determinación de las aminas presentes en las muestras, se realizó por HPLC o por HPTLC, siguiendo los procedimientos descritos en otros apartados.

Determinación de poliaminas por HPLC:

Los extractos dansilados se separaron mediante una columna con fase estacionaria C18, usando un gradiente de acetonitrilo y agua, en un tiempo total de 30 min. La separación comienza con un 30% de Acetonitrilo, se mantiene 8 min y luego se incrementa linealmente durante 5 min hasta alcanzar el 90% del mismo disolvente. Se mantiene esta composición durante 7 min y, finalmente, se rebaja nuevamente el porcentaje de Acetonitrilo hasta el 60%, de forma lineal, en 10 min. La velocidad de flujo durante el análisis se mantiene a 1.4 ml/min. Las disoluciones a inyectar se preparan, por dilución con Acetonitrilo, a partir del extracto dansilado, cuya concentración es de 50 ng/ μ l.

Determinación de poliaminas por HPTLC en ausencia de surfactante:

Volúmenes comprendidos entre 1 y 10 μ l de extracto dansilado se aplicaron sobre fase estacionaria de Gel de Sílice a una velocidad de 10 sg/ μ l. Las placas fueron desarrolladas con Cloroformo:Trietilamina (2:1) (v:v), hasta que el disolvente alcanza una distancia de unos 8 cm, medidos desde el origen.

Antes de su análisis, las placas se secan al aire libre. Los analitos son localizados con el lector de placas y sobre ellos se realizan los correspondientes espectros de excitación y emisión, así como las medidas de intensidad de fluorescencia a $\lambda_{exc} = 338$ nm y $\lambda_{em} = 502$ nm, utilizando rendijas de 10 nm. Como blanco para la corrección de la intensidad de fluorescencia se empleó la señal correspondiente al soporte, después de efectuar la elución, a las longitudes de onda de excitación y emisión empleadas en la medida del analito.

Determinación de poliaminas por HPTLC en presencia de surfactante:

Para la determinación de poliaminas en presencia de surfactante, se añadió a la fase móvil, constituida por Cloroformo:TEA (2:1) (v:v), un 5% de POLE y se llevó a cabo la elución de volúmenes comprendidos entre 1 y 10 μ l del extracto dansilado, de igual forma a la utilizada para la determinación efectuada en ausencia de surfactante. Las sustancias se cuantifican a $\lambda_{exc} = 338$ nm y $\lambda_{em} = 502$ nm, utilizando rendijas de 5 nm.

Determinación de poliaminas en muestras de cerveza:

La cerveza es desgasificada mediante agitación magnética. Posteriormente, se tomaron 2 ml de muestra y se dansilaron siguiendo el procedimiento descrito anteriormente. El análisis del extracto dansilado se llevó a cabo por HPLC o por HPTLC, de forma análoga a la descrita para los patrones.

I.4.- OPTIMIZACIÓN DE LOS SISTEMAS DE DETECCIÓN E INYECCIÓN

La variabilidad de las medidas realizadas en Cromatografía Plana con detección fluorescente, depende de tres factores principales relacionados con la reproducibilidad de:

- La inyección de las muestras.
- Las condiciones cromatográficas.
- Las medidas.

Por lo tanto, se hace necesario optimizar los sistemas de inyección de la muestra y de la medida de la fluorescencia emitida por los analitos, después de ser separados cromatográficamente. Con tal finalidad se utilizó, como referencia, una disolución del derivado dansilado de Espermidina, en Tolueno, y placas de Gel de Sílice de HPTLC.

I.4.1.- Inyección de la muestra

Se ha llevado a cabo la optimización de los parámetros controlables con el inyector utilizado y que pueden influir en la aplicación de la gota sobre el soporte sólido. Tales parámetros son: el volumen depositado, la velocidad de deposición de la muestra, el tamaño y la posición de la gota.

Para investigar la influencia del volumen de muestra aplicado en la intensidad de la radiación emitida, se depositaron volúmenes comprendidos entre 1 y 14 μl , de la disolución de control, de forma que la cantidad de derivado dansilado (50 ng), y la velocidad de deposición (10 $\text{sg}/\mu\text{l}$) permanecían constantes.

Los resultados se muestran en la Figura I.1, en la que podemos observar que no existen diferencias importantes en la intensidad de la radiación emitida, para los distintos volúmenes inyectados.

En otro grupo de experiencias, se investigó la influencia de la velocidad de deposición de la gota, encontrándose una velocidad óptima de 10 $\text{sg}/\mu\text{l}$. Por una parte, la deposición es mejor cuanto mayor es el tiempo invertido en el proceso; pero debe optimizarse, porque el empleo de tiempos de inyección demasiado largos hace aumentar el tiempo de análisis y no conducen a intensidades de fluorescencia significativamente mayores.

Con objeto de alcanzar buenas eficacias, el tamaño de gota se ha seleccionado para que sea lo menor posible y, al mismo tiempo, tenga un área mayor que el campo de vista del haz de detección de la fibra óptica. La distancia entre gotas se ha fijado normalmente en 9 mm.

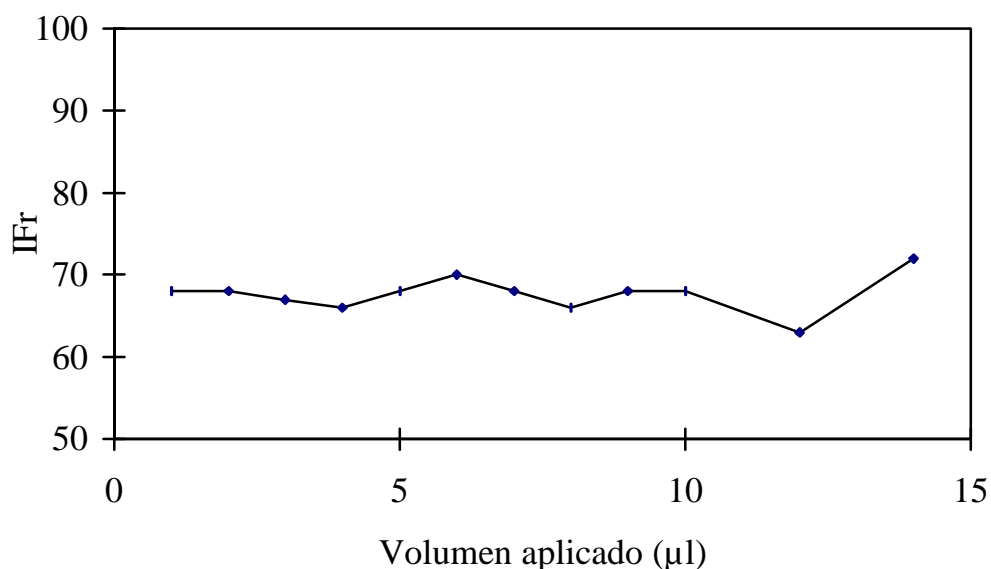


Figura I.1.- Variación de la intensidad de fluorescencia con el volumen de muestra aplicado. $\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 505 \text{ nm}$. Rendijas: 10 nm.

I.4.2.- Sistema de detección

Ahora bien, la luz que incide sobre la superficie de una placa de TLC es transmitida y dispersada por dicha superficie. La muestra fluorescente retenida en la superficie sólida emite difusamente la luminescencia, en respuesta a la excitación, comportándose así como una fuente de luz secundaria. La luz que alcanza el detector consiste en una señal de fondo y superpuesta a la misma, la emisión de fluorescencia de los componentes de la muestra. De esta forma, la habilidad del sistema para detectar y medir la emisión correspondiente a de la muestra, está limitada por las magnitudes de la señal de fondo y el ruido.

La sensibilidad de un sensor de fibra óptica para la radiación fluorescente, está directamente relacionada con la eficacia en la captura de la señal óptica. Durante dicha captura se producen pérdidas de la señal, porque los fotones emitidos irradian en todas las direcciones y el rayo es dispersado, de tal manera que sólo una pequeña fracción de la emisión total entra en la segunda fibra. La captura de la luz emitida es más eficaz cuanto más pequeña es la distancia desde el final de la segunda fibra hasta la placa y cuando el área de la gota depositada en la placa es mayor que el campo de enfoque del haz de detección de la fibra.

Influencia del ancho de rendijas en la captura de la señal

Con objeto de mejorar la eficacia en las determinaciones de fluorescencia sobre superficies sólidas, utilizando un sensor de fibra óptica, se ha estudiado la influencia del ancho de las rendijas de excitación y emisión en la intensidad de la radiación emitida. Se ha medido experimentalmente la intensidad de fluorescencia del derivado dansilado de una de las aminos estudiadas, la Espermidina, utilizando diferentes rendijas de excitación y emisión. Para ello, se depositan sobre una placa de Gel de Sílice 50 ng de Espermidina y se lee la radiación emitida. Se mantienen fijas las rendijas de excitación y se varían las de emisión, repitiendo el proceso para diferentes rendijas de excitación.

Como puede observarse en la Figura I.2, la modificación de las rendijas de excitación no conduce a variaciones significativas de la intensidad de fluorescencia. Por el contrario, según la citada Figura se produce un incremento importante de la intensidad de la radiación emitida, cuando se aumentan las rendijas de emisión, similar para las distintas rendijas de excitación.

Por otra parte, la señal correspondiente al blanco también aumenta con el incremento de las rendijas de emisión. Sin embargo, este aumento es proporcional al aumento de la señal emitida por el compuesto estudiado.

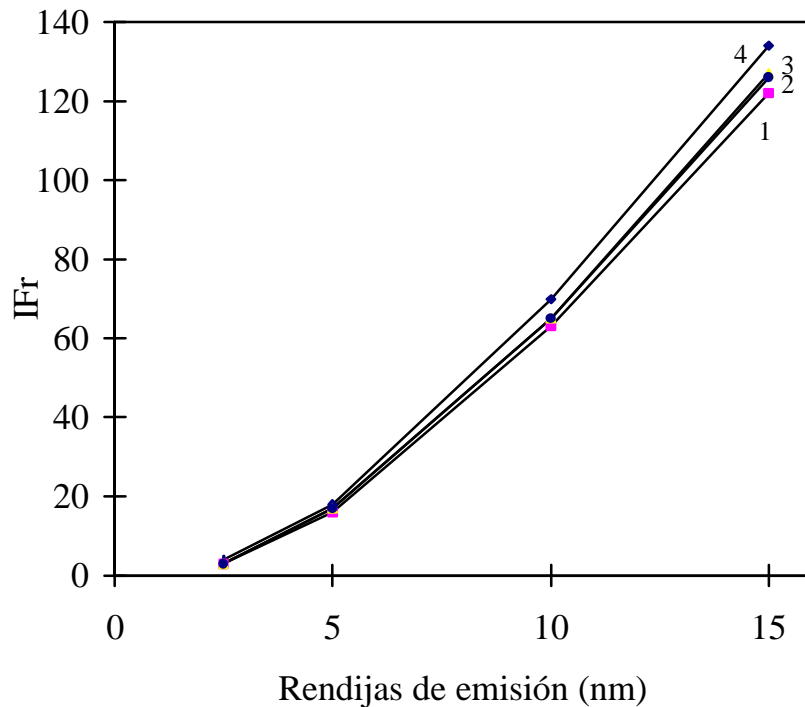


Figura I.2.-

Infl

uencia de las rendijas de excitación y emisión en la intensidad de fluorescencia.

Ancho de la rendija de excitación: (1) 2.5 nm, (2) 5 nm, (3) 10 nm y (4) 15 nm

No se han estudiado las variaciones sufridas en la emisión para anchos de rendija superiores a los 15 nm, ya que el pequeño diámetro de la fibra óptica limita el uso de rendijas superiores a este valor.

El uso de una rendija de excitación menor que la de emisión, significaría que el diámetro del rayo enfocado hacia la placa sería inferior al diámetro del extremo colector de la fibra, de tal manera que la mayor parte de la emisión procedente de la placa se perdería, sin ser captada por el extremo de la fibra óptica.

Capítulo 2
FLUORESCENCIA DE DERIVADOS DEL
INDOL EN SOPORTES SÓLIDOS.
DETERMINACIÓN
POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA CON
DETECCIÓN FLUORESCENTE

II.1.- INTRODUCCIÓN.

Los compuestos denominados genéricamente como derivados del Indol, engloban una gran cantidad de sustancias que intervienen en procesos importantes que ocurren en el mundo animal y vegetal.

Para realizar el estudio incluido a continuación, se han seleccionado cuatro derivados del Indol: ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5- Hidroxitriptófano y Serotonina que, además de su interés específico, se encuentran interrelacionados en la naturaleza. Así, como se comentó en la Introducción, el Triptófano es el precursor primario del ácido Indol-3-Acético en algunas rutas biosintéticas. Por otra parte, resulta evidente la relación entre el 5-Hidroxitriptófano, y su producto de descarboxilación, la Serotonina, con los dos derivados anteriores.

Se conoce la presencia de algunos o todos estos derivados en muestras de distinto tipo, que van desde alimentos de diferente naturaleza a fluidos fisiológicos, tejidos vegetales y animales, etc. A su vez, es reconocida su participación en procesos naturales relacionados con el crecimiento de plantas o su floración, así como en desórdenes neurológicos y psíquicos , y en otros muchos. De aquí el interés de disponer de métodos analíticos rápidos y fiables para la determinación de derivados del Indol en muestras naturales.

En tal sentido, puede aprovecharse el hecho de que la modificación del entorno en que se encuentra una sustancia, puede afectar profundamente a los espectros de fluorescencia de las moléculas poliatómicas. De aquí, que una estrategia para provocar cambios en la sensibilidad de las determinaciones espectrofluorimétricas, consista en seleccionar un medio adecuado para realizar las medidas. Así, los procesos fluorescentes

pueden ser considerablemente diferentes, con relación a los observados en disolución, cuando las moléculas capaces de emitir radiación por dicha vía son retenidas, adsorbidas o enlazadas químicamente a matrices sólidas.

En Cromatografía en Capa Fina con detección fluorescente, el soporte sólido, al tiempo que constituye la fase estacionaria, es el medio en el cual los solutos son retenidos después de realizada la separación. Consecuentemente, la selección de la fase estacionaria debe hacerse teniendo en cuenta sus propiedades cromatográficas y su posible influencia en las características espectrofluorimétricas de los analitos.

En este Capítulo, se propone un nuevo método de análisis, basado en la utilización de la fluorescencia natural que presentan los derivados del Indol, y la capacidad de la Cromatografía en Capa Fina para separar analitos. El ácido Indol-3-Acético, el Triptófano, la Serotonina y el 5-Hidroxitriptófano se separan por TLC y se cuantifican directamente en las placas, por medida de la fluorescencia emitida, mediante la utilización de un sistema de fibra óptica conectada a un Espectrofluorímetro convencional.

II.2.- CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DE LOS DERIVADOS DEL INDOL.

Se ha estudiado el comportamiento fluorescente de cuatro derivados del indol: Ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina, en diferentes medios o fases sólidas. Los soportes ensayados fueron: Celulosa, papel Whatman-41, papel constituido por celulosas modificadas, como el DE-81 y P-81, Gel de Sílice y alquilsílice C-18. Los espectros de fluorescencia de las diferentes sustancias se han realizado directamente después de depositar los respectivos derivados sobre los soportes, sin previa elución. Las Figuras II.1 a II.6, muestran los espectros de emisión de los derivados indólicos citados, a las respectivas longitudes de onda de excitación máxima,

en los diferentes soportes sólidos utilizados. Las principales características espectrofluorimétricas observadas se agrupan en la Tabla II.1.

En general, las longitudes de onda de excitación son similares para todos los compuestos estudiados, en los diferentes medios, presentando valores que oscilan entre 276 y 280 nm. Estas pequeñas variaciones que, en ningún caso sobrepasan el ancho de rendija utilizado, pueden estar asociadas a causas instrumentales.

En cuanto a las longitudes de onda de emisión, en algunos casos se encuentran mayores diferencias. Así sucede con el ácido Indol-3-Acético, que presenta λ_{em} extremas de 335 nm en los soportes de C-18 y DE-81, y de 364 nm cuando se encuentra retenido en celulosa P-81. Para los otros derivados, los valores de las longitudes de onda de emisión presentan oscilaciones menores: 334-337 nm para la Serotonina, 334-350 nm para el Triptófano y 335-338 nm para el 5-Hidroxitriptófano.

Sin embargo, las intensidades de fluorescencia emitidas por estos compuestos dependen en gran medida de la superficie sólida usada. Los valores de la intensidad de fluorescencia emitida corregidos (I_f^*), mediante la sustracción en cada caso de la señal emitida por la respectiva superficie, se agrupan en la Tabla II.1. En general, los menores valores de intensidad corresponden al ácido Indol-3-Acético. Con respecto a la naturaleza de los soportes, los diferentes tipos de papel proporcionan, en la mayoría de los casos, las mayores intensidades de fluorescencia.

Con fines comparativos, hemos realizado los espectros de disoluciones de los derivados en estudio, usando un medio Metanol:agua (60:40) (v:v) a pH = 2. Sus características espectrofluorimétricas se encuentran en la Tabla II.1 y los espectros de emisión, a la longitud de onda de máxima excitación, se muestran en la Figura II.7. Al comparar los resultados obtenidos al emplear disoluciones acuo-metanólicas y los obtenidos cuando los compuestos se encuentran retenidos en superficies sólidas, se observa que no existen diferencias significativas en los máximos de excitación y emisión.

Por su parte, las intensidades halladas en disolución no se pueden comparar con

las encontradas en los soportes sólidos, pero es de destacar que no existen grandes diferencias entre la fluorescencia emitida por las disoluciones acuo-metanólicas de los distintos compuestos estudiados.

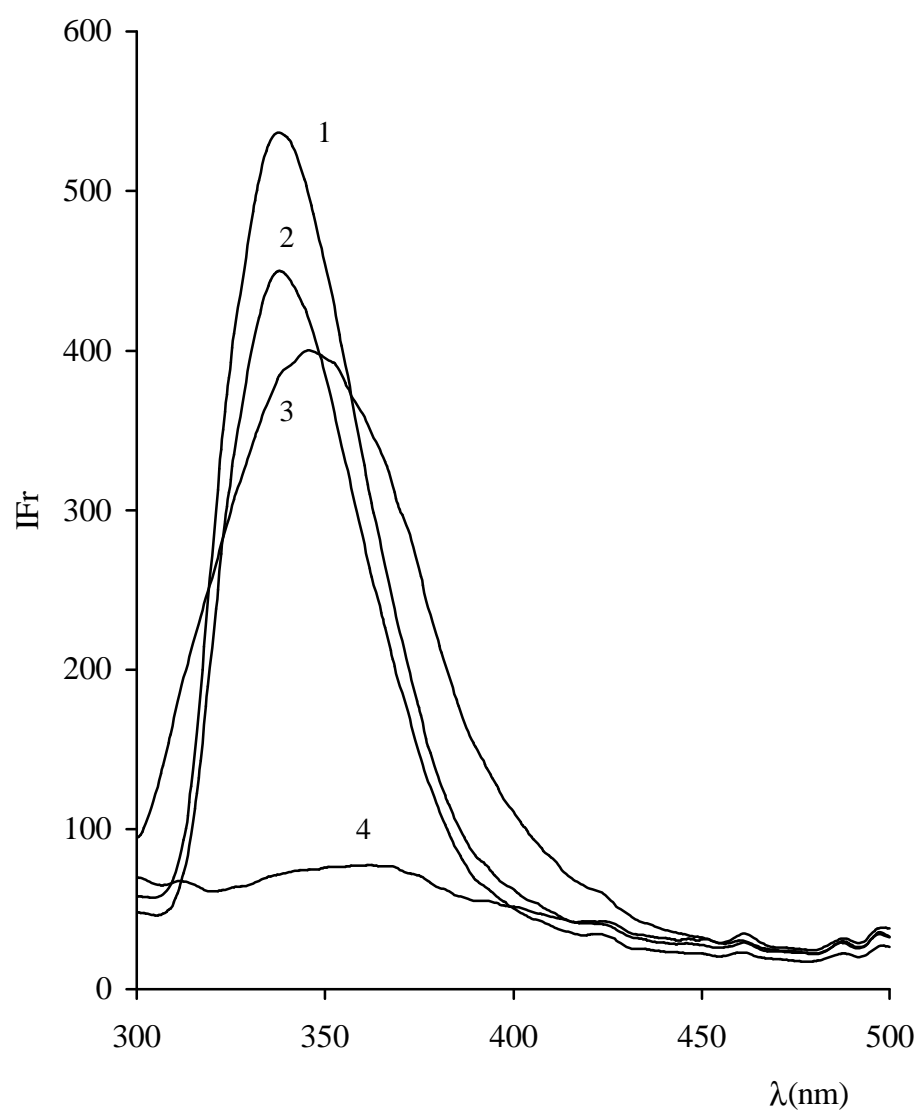


Figura II.1.- Espectros de emisión de 40 ng de cada uno de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria de papel Whatman-41, a las λ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 5-Hidroxitriptófano, (2) Serotonina, (3) Triptófano y (4) ácido Indol-3-Acético. Rendijas: 5 nm

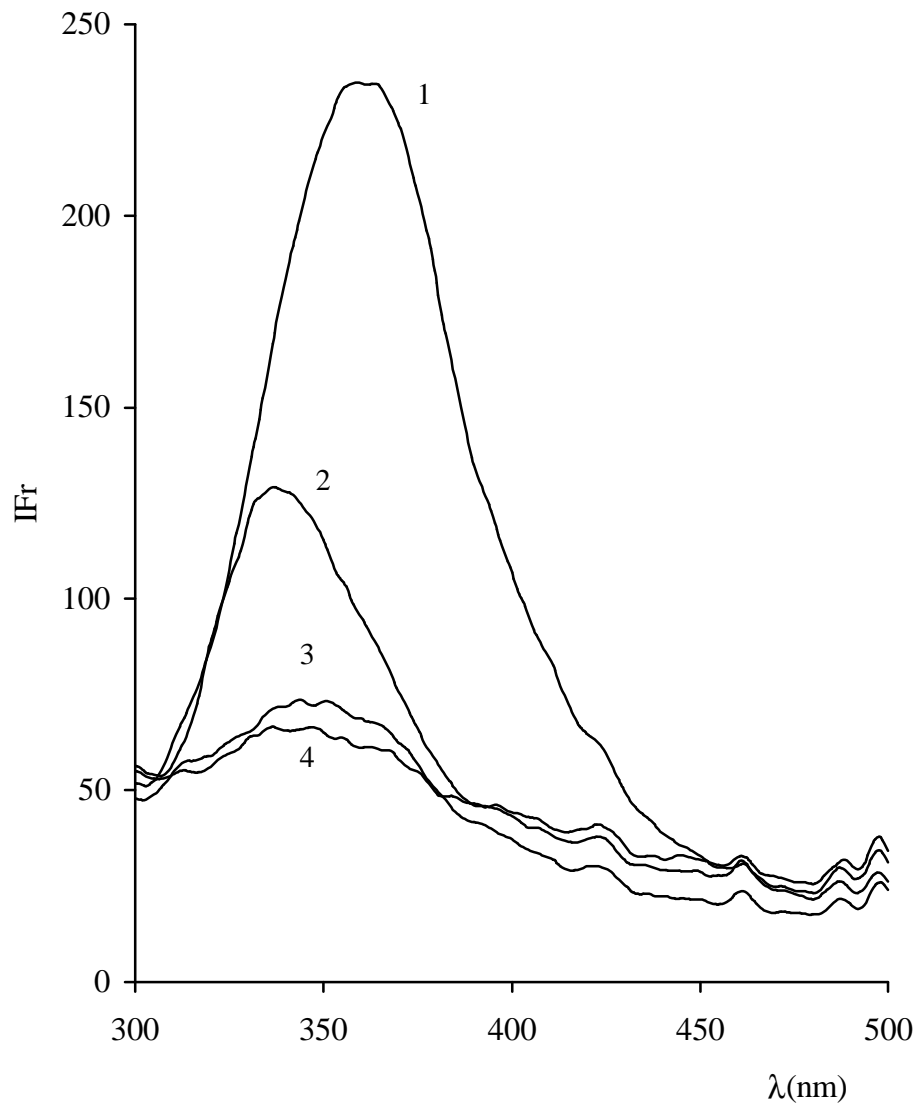


Figura II.2- Espectros de emisión de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria de Celulosa, a las λ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 500 ng de ácido Indol-3-Acético, (2) 60 ng de 5-Hidroxitriptófano, (3) 60 ng de Triptófano y (4) 60 ng de Serotonina.

Rendijas: 5 nm

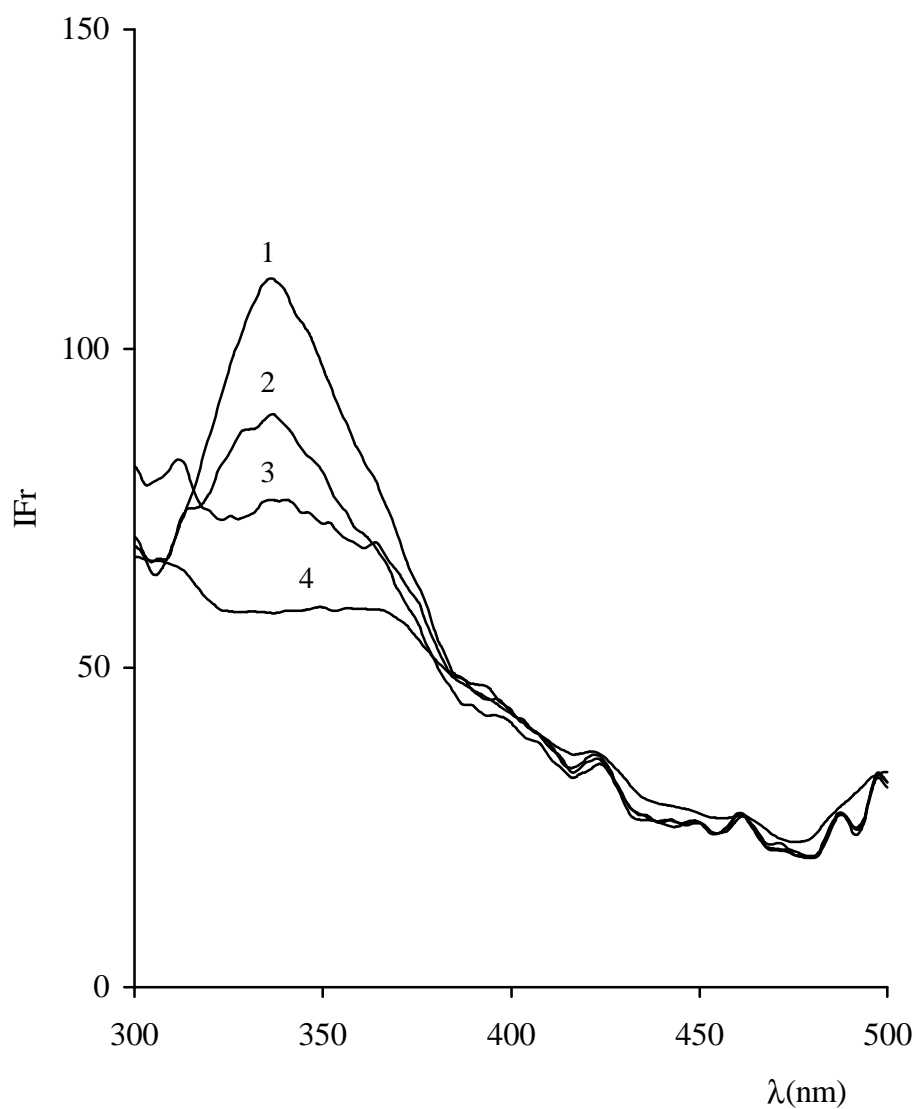


Figura II.3.- Espectros de emisión de cada uno de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria de Gel de Sílice, a las λ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 400 ng de ácido Indol-3-Acético, (2) 40 ng de Serotonina, (3) 40 ng de 5-Hidroxitriptófano y (4) 40 ng de Triptófano.

Rendijas: 5 nm

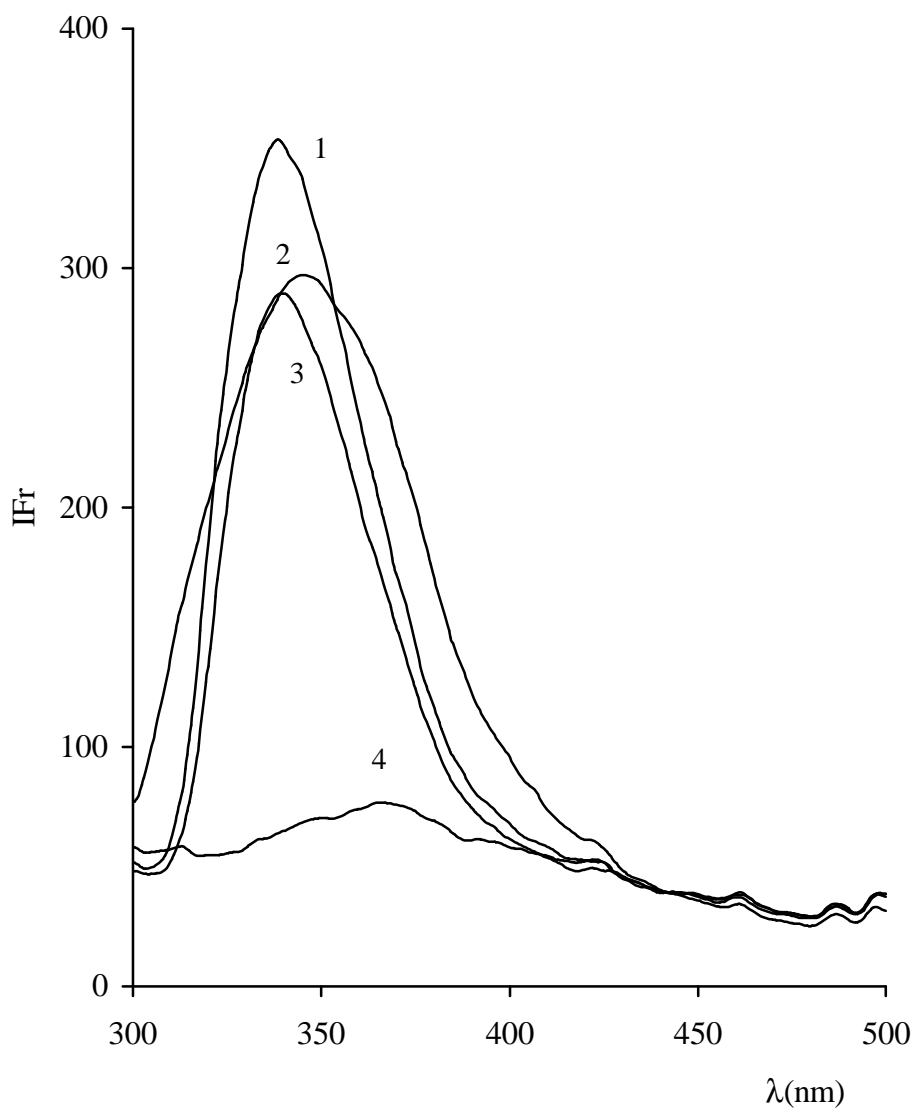


Figura II.4.- Espectros de emisión de 40 ng de cada uno de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria P-81, a las δ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 5-Hidroxitriptófano, (2) Triptófano, (3) Serotonina y (4) ácido Indol-3-Acético. Rendijas: 5 nm

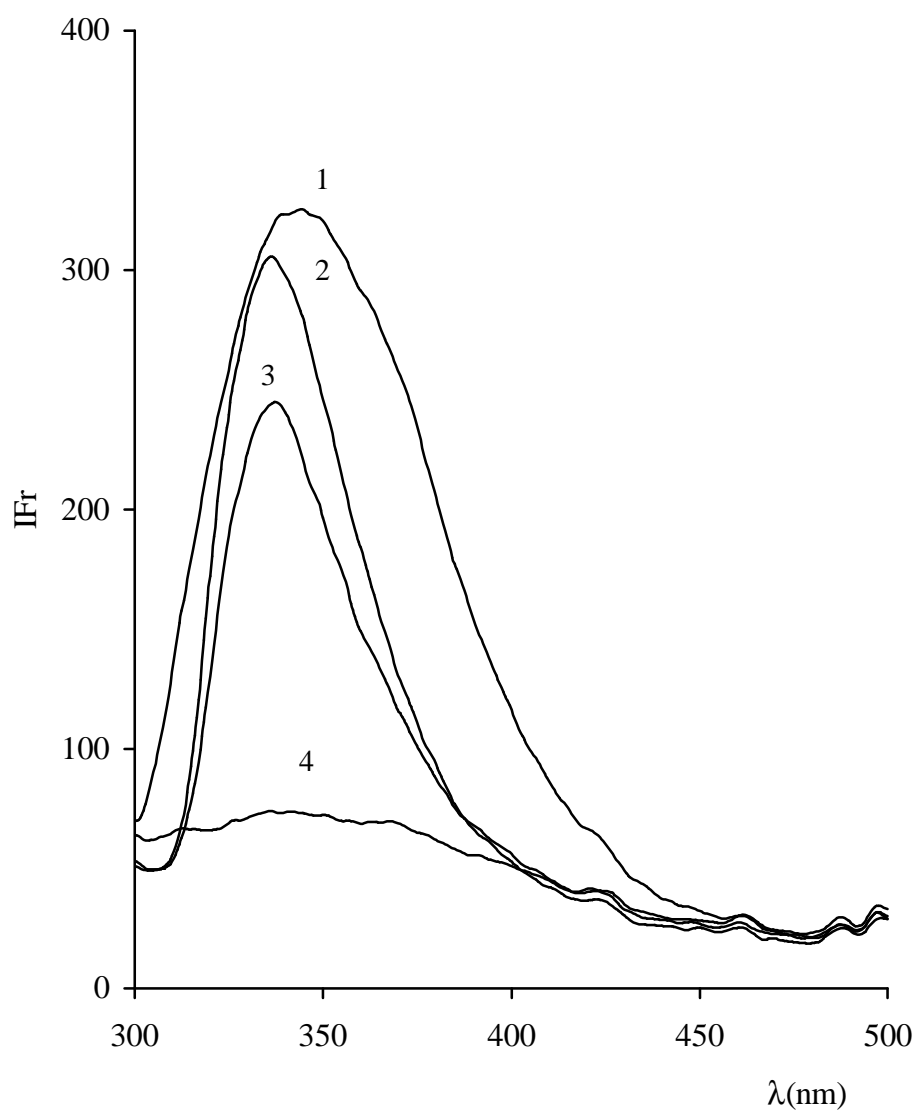


Figura II.5.- Espectros de emisión de 40 ng de cada uno de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria DE-81, a las λ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) Triptófano, (2) Serotonina, (3) 5-Hidroxitriptófano y (4) ácido Indol-3-Acético.

Rendijas: 5 nm

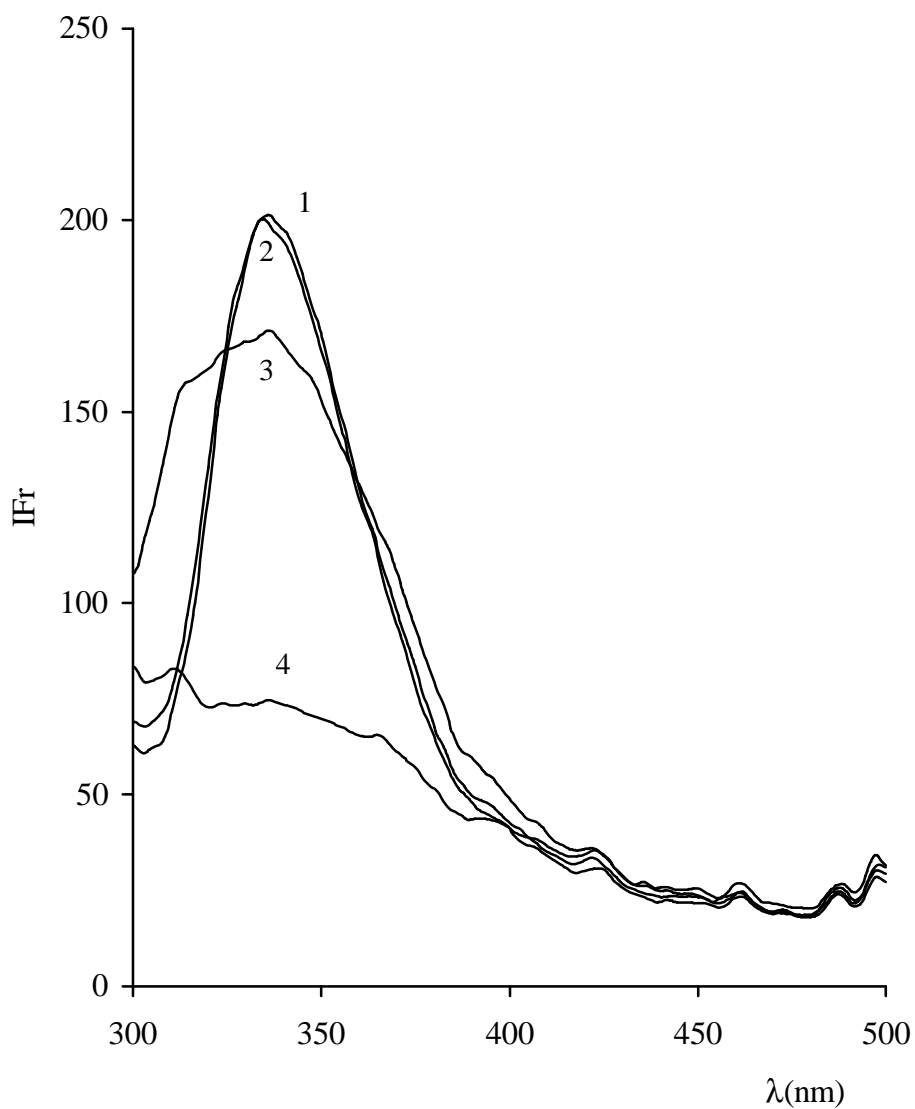


Figura II.6.- Espectros de emisión de 40 ng de cada uno de los derivados del Indol sobre una fase estacionaria de C-18, a las δ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 5-Hidroxitriptófano (2) Serotonina, (3) Triptófano y (4) ácido Indol-3-Acético. Rendijas: 5 nm

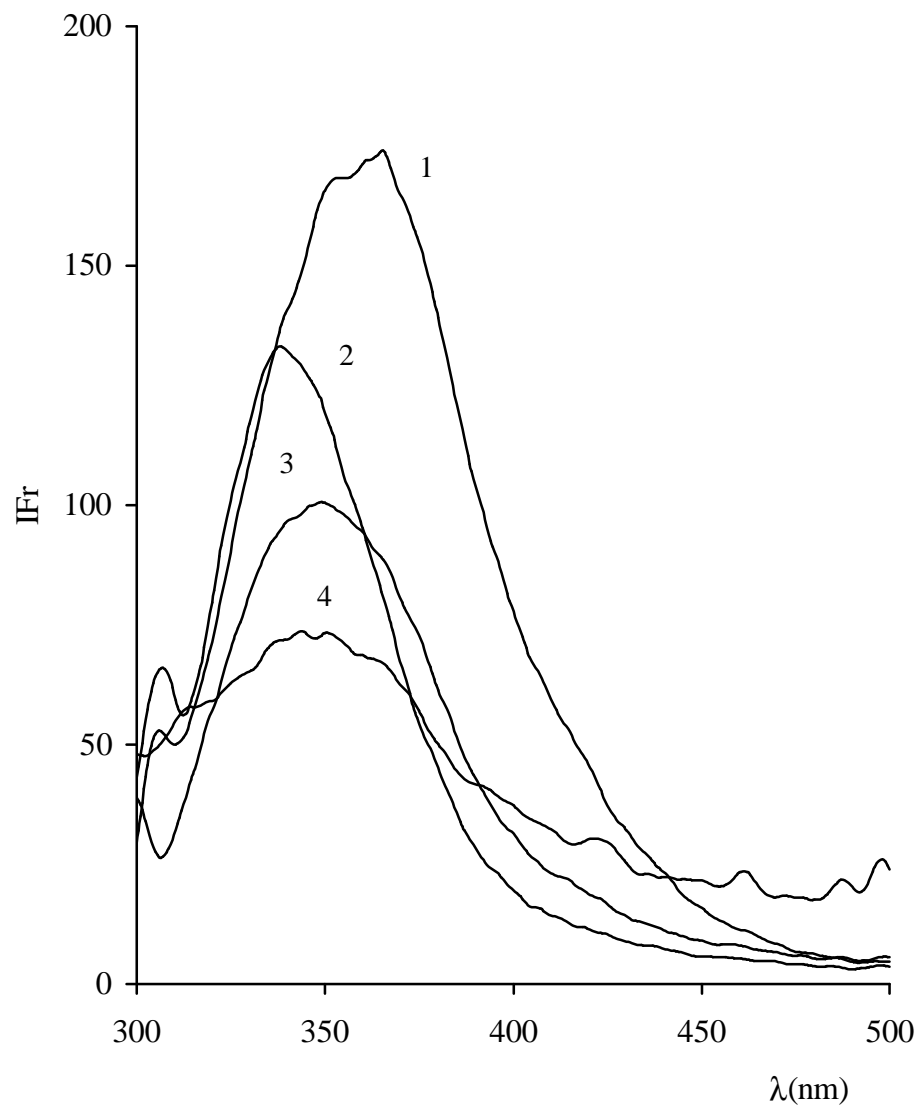


Figura II.7.- Espectros de emisión de disoluciones acuo-metanólicas (60:40), a pH=2, de los derivados del Indol, a las λ_{exc} indicadas en la Tabla II.1. (1) 180 ppb de ácido Indol-3-Acético, (2) 198 ppb de Serotonina, (3) 198 ppb de Triptófano y (4) 180 ppb de 5-Hidroxitriptófano.
Rendijas: 5 nm

Tabla II.1.- Características espectrofluorimétricas de los derivados del Indol, en medio acuoso (22 ppm), y en diferentes superficies sólidas (40 ng). Rendijas 5 nm.

Soporte	Serotonina		Triptófano		Ac. Indol-3-Acético		5-Hidroxitriptófano	
	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	If*	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	If*	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	If*	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$	If*
Disolución acuosa pH=2	276/337	134	270/350	171	275/359	175	274/336	118
Papel Whatman-41	277/337	392	278/346	334	278/361	20	278/337	464
Placa de Celulosa	276/347	10	278/350	21	280/358	15	278/337	41
Placa de Gel de Sílice	278/336	46	278/338	15	275/348 ¹	10	278/337	30
Papel P-81	278/336	210	279/344	210	278/364	8	277/338	264
Papel DE-81	278/336	212	279/344	252	279/335	23	277/337	172
Placa de C-18	277/334	118	277/334	212	277/335	8	276/335	127

¹ C_{IAA} = 400 ng, Rendijas 10 nm.

II.3.- SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS.

Cuando las diferentes fases sólidas empleadas para estudiar el comportamiento fluorescente de los derivados del Indol, son utilizadas como fases estacionarias para la separación cromatográfica de dichos compuestos, los mejores resultados, en cuanto a eficacia y resolución, se obtienen con Celulosa y Gel de Sílice. Sin embargo, al considerar la intensidad de la fluorescencia emitida por los derivados del Indol, se observa que en la última de las fases estacionarias, se obtienen sensibilidades inferiores a las que se encuentran al emplear Celulosa, excepto en el caso de la Serotonina.

En atención a lo expuesto, fue seleccionada la Celulosa como fase estacionaria para la separación y cuantificación de la Serotonina, ácido Indol-3-Acético, 5-Hidroxitriptófano y Triptófano, por TLC.

En cuanto a la fase móvil, se han propuesto diferentes sistemas para eluir compuestos como los estudiados en este trabajo. Entre ellos, y teniendo en cuenta los resultados obtenidos por otros autores [10, 172], se ha ensayado el comportamiento de los siguientes eluyentes:

1. Etanol(95%) - Amoniaco(25%) (6:1) (v:v)
2. n-Butanol - Ácido Acético - Agua (12:5:2) (v:v:v)
3. Isopropanol - Amoniaco (25%) (4:1) (v:v)
4. Cloroformo - Metanol - Amoniaco(25%) (12:7:1) (v:v:v)

En la Tabla II.2 se han agrupado los valores de R_f obtenidos al eluir los compuestos citados, utilizando Celulosa como fase estacionaria y cada una de las fase móviles relacionadas.

Como índice para establecer la calidad de la separación conseguida, entre compuestos que eluyen de forma consecutiva, se ha utilizado la Resolución, definida por la expresión:

$$R_s = \frac{2 \cdot (P_2 \& P_1)}{(W_2 \% W_1)}$$

en las que P_1 y P_2 representan las distancias recorridas por los analitos, expresadas en mm, medidas desde el punto de aplicación, mientras que por W_1 y W_2 se representan los anchos de banda a media altura. En la Tabla II.3 se encuentran los resultados obtenidos al medir los valores de R_s , para cada par de compuestos, eluidos sobre Celulosa, utilizando las fase móviles antes mencionadas.

Los resultados obtenidos muestran que, para el conjunto de los analitos considerados, las mejores resoluciones corresponden, en general, a la fase móvil Cloroformo:Metanol Amoniaco (12:7:1), excepto en el caso del par Triptófano / 5-Hidroxitriptófano, aunque el valor correspondiente al mismo es suficientemente elevado. Asimismo, los valores de R_f obtenidos al emplear dicha fase móvil, resultan especialmente adecuados con fines analíticos. La Figura II.8 muestra un cromatograma representativo.

Tabla II.2.- Valores de R_f de los derivados del Indol para los distintos sistemas de elución indicados. Fase estacionaria: Celulosa.

Eluyente	Valores de R_f			
	5-Hidroxitriptófano	Triptófano	ác. Indol-3-Acético	Serotonina
1	0.05	0.51	0.68	0.95
2	0.03	0.39	0.65	0.90
3	0.03	0.29	0.40	0.66
4	0.015	0.19	0.37	0.85

Tabla II.3.- Resoluciones obtenidos para los derivados indólicos, utilizando los

distintos sistemas de elución empleados. Fase estacionaria: Celulosa.

Eluyente	Valores de R_s		
	5-Hidroxitriptófano-Triptófano	Triptófano-ác. Indol-3-Acético	ác Indol-3-Acético-Serotonina
1	3.33	1.10	1.44
2	1.75	1.33	1.17
3	2.00	0.60	1.10
4	1.85	1.50	2.30

A modo de resumen, en la Tabla II.4 se recogen las propiedades cromatográficas más significativas de los derivados del Indol investigados, sobre una fase estacionaria de Celulosa y con el sistema de elución seleccionado. Para estudiar la reproducibilidad de los valores de R_f se realizaron siete cromatogramas en las mismas condiciones experimentales. Los valores encontrados, así como sus desviaciones estándar, se recogen en la Tabla II.4. Como puede observarse, aparte de los valores de R_f y R_s ya comentados, las incertidumbres halladas para los valores de R_f , para un nivel de confianza del 95%, afectan como máximo en ± 0.03 mm.

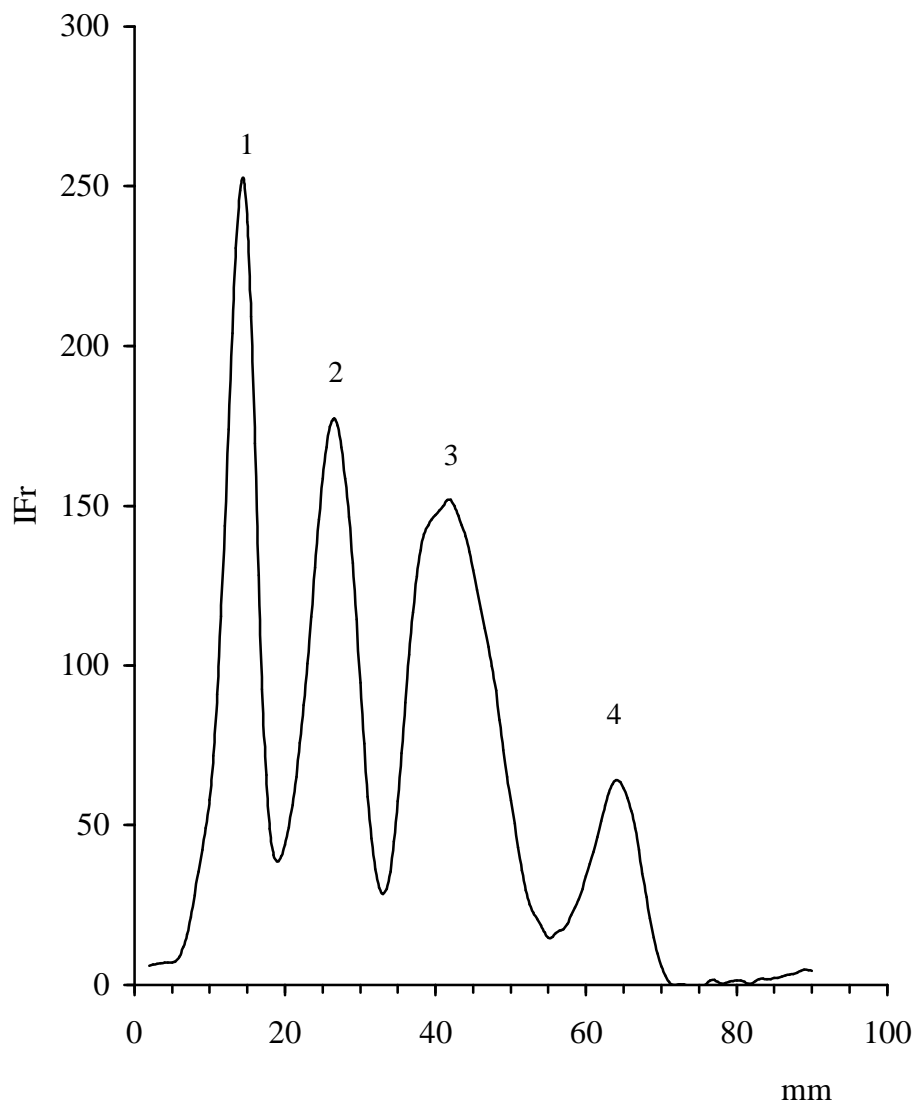


Figura II.8.- Cromatograma de una mezcla de 100 ng de cada uno de los derivados del Indol. (1) 5-Hidroxitriptófano, (2) Triptófano, (3) ácido Indol-3-Acético y (4) Serotonina. Fase estacionaria: Celulosa. Elución con Cloroformo:Metanol:Amoniaco (12:7:1). $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 347 \text{ nm}$ Rendijas:5 nm

Tabla II.4.- Características cromatográficas de los derivados del indol, usando como fase estacionaria Celulosa y, como fase móvil Cloroformo-Metanol-Amoniaco (12:7:1).

Compuesto	Rf \pm I	C.V. (%)	Rs
5-Hidroxitriptófano	$0.015 \pm 7 \cdot 10^{-4}$	5.52	1.85
Triptófano	0.193 ± 0.015	9.53	1.5
Ác Indol-3-Acético	0.370 ± 0.028	8.16	2.3
Serotonina	0.846 ± 0.013	1.90	

II.4.- RELACIÓN SEÑAL/RUIDO.

Entre los aspectos negativos asociados a la utilización de medidas de fluorescencia sobre soportes sólidos para realizar determinaciones analíticas, se encuentra el que las señales puedan verse fuertemente condicionadas por la señal de fondo, así como la falta de reproducibilidad que puede afectar a las medidas.

La radiación que llega al detector, está formada por la suma de las intensidades de fluorescencia debidas a la emisión del propio soporte y de los analitos a determinar. En consecuencia, la detección se halla limitada por la magnitud de la señal de interés analítico y por el ruido de fondo. Dicha señal de fondo es normalmente incrementada por la gran cantidad de radiación dispersada. Además, el uso de una fibra óptica para transportar la radiación, permite que cierta cantidad de luz proveniente del entorno se sume a la intensidad de fluorescencia emitida por el analito, aumentando la señal de fondo.

Para evaluar la relación señal/ruido para cada uno de los compuestos estudiados,

una vez eluida la mezcla sobre el soporte, se ha hecho uso de la siguiente expresión [173]:

$$S/N = \frac{E_s}{(F_s^2 + F_{bk}^2)^{1/2}}$$

en la que E_s es la señal analítica obtenida al restar la señal correspondiente al blanco de la señal total para cada sustancia, mientras que F_s y F_{bk} son las desviaciones estándar de la señal analítica y del blanco, respectivamente.

Con tal finalidad, se han realizado al menos siete cromatogramas de disoluciones de cada uno de los analitos, conteniendo 40 ng de los mismos, eluidos con la fase móvil seleccionada. Las intensidades de fluorescencia obtenidas, a las longitudes de onda de excitación y emisión máximas, así como las correspondientes a los respectivos blancos se recogen en la Tabla II.5.

Los valores de la relación señal/ruido, tal como se muestran en la Tabla II.6, oscilan entre 5.2 y 10.2, correspondiendo la máxima relación a la Serotonina.

Tabla II.5.- Intensidades de fluorescencia de los derivados del Indol sobre un soporte de Celulosa. Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Amoniaco (12:7:1). C_{analito}: 40 ng. Rendijas: 5 nm.

COMPUESTO	Número de Experiencia / I _F *							
	1	2	3	4	5	6	7	8
5-Hidroxitriptófano	83.17 (56.39)	82.44 (50.33)	79.49 (50.33)	79.73 (50.33)	83.79 (50.33)	83.54 (47.00)	79.29 (50.33)	77.29 (50.33)
Ác Indol-3-Acético	72.14 (46.98)	72.58 (46.98)	67.6 (46.98)	71.7 (46.98)	68.5 (46.98)	69.93 (46.98)	73.28 (40.33)	72.36 (50.33)
Triptófano	65.27 (47.90)	68.42 (50.60)	68.19 (50.22)	67.14 (50.42)	60.26 (51.80)	69.45 (51.95)	65.97 (51.51)	65.97 (50.20)
Serotonina	65.91 (47.90)	66.70 (48.50)	67.80 (52.83)	64.65 (44.90)	65.91 (47.00)	65.93 (46.83)	67.11 (49.90)	65.13 (48.37)

* Entre paréntesis se indican las intensidades de fluorescencia correspondientes a los blancos.

Tabla II.6.- Relación señal/ruido para la detección de 40 ng de cada uno de los derivados indólicos. Rendijas: 5 nm. Fase estacionaria: Celulosa. Fase móvil: Cloroformo: Metanol: Amoniac (12:7:1).

Compuesto	Señales medidas		Desviaciones estándar		Relación S/N
	E _b	E _s	S _s	S _b	
Serotonina	50.33	30.76	2.43	1.78	10.2
Triptófano	50.99	15.61	2.89	0.72	5.2
Ác Indol-3-Acético	47.82	23.19	2.08	1.55	8.9
5-Hidroxitriptófano	48.37	18.06	1.09	2.37	6.8

II.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Con objeto de establecer la viabilidad de la determinación de los derivados indólicos considerados, mediante Cromatografía en Capa Fina con detección fluorescente, se han realizado un conjunto de experiencias que se comentan a continuación.

En primer lugar, se han registrado las respectivas curvas analíticas utilizando disoluciones de cada uno de los derivados con concentraciones inferiores a 100 ng. Para ello se depositaron en placas de celulosa desactivada, diferentes concentraciones de una mezcla de los cuatro analitos y se eluyeron con Cloroformo:Metanol:Amoniac (12:7:1) (v:v:v). A la señal obtenida para cada mancha, registrada como altura de pico, se le restó la señal correspondiente al soporte y se representaron las intensidades de fluorescencia obtenidas frente a la cantidad de derivado inyectado. Los resultados muestran que existe una relación lineal entre ambos parámetros.

El ajuste por mínimos cuadrados de la recta correspondiente y el tratamiento estadístico de los datos conduce a los resultados mostrados en la Tabla II.7. Los coeficientes de correlación encontrados en todos los casos son superiores a 0.997 y el análisis de varianza nos permite afirmar que, en todos los casos, más de un 99.5% de los datos pueden ser explicados por el método propuesto, con un nivel de confianza del 95%.

El estudio de precisión y exactitud de las medidas, según el método propuesto,

se realizó con una serie de siete muestras que contenían 40 ng de cada uno de los derivados indólicos. Los parámetros obtenidos al realizar la evaluación estadística se muestran en la Tabla II.8.

Los coeficientes de variación observados son relativamente pequeños, excepto en el caso del Triptófano y su derivado, el 5-Hidroxitriptófano, cuyos valores muestran mayor dispersión.

Tomando un nivel de confianza del 95% y 8 grados de libertad para la Serotonina y el Triptófano, y 7 para el ácido Indol-3-Acético y el 5-Hidroxitriptófano, los valores para la *t* de Student indican, que el método propuesto para la determinación de los derivados indólicos, es correcto y suficientemente preciso.

Asimismo, se han determinado los límites de detección del método, de acuerdo con la expresión propuesta por la IUPAC [174]. Como se muestra en la Tabla II.9, dichos valores oscilan entre 16.39 ng para el 5-Hidroxitriptófano y 22.50 ng para el ácido Indol-3-Acético.

Los límites de detección son superiores a los encontrados en la bibliografía para la determinación de estos compuestos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución [175]. Sin embargo, los límites de detección del ácido Indol-3-Acético descritos para la cuantificación por TLC usando OPA como agente derivatizante, son del orden de dos veces superiores a los obtenidos por el método que aquí se propone [176].

Para estudiar la aplicabilidad del método, se han preparado muestras sintéticas a las que se han añadido mezclas que contenían 40 y 80 ng de cada uno de los cuatro derivados indólicos, y se han hallado los porcentajes de recuperación para cada uno de estos compuestos. Para las dos cantidades estudiadas, los valores obtenidos se muestran en la Tabla II.9 y oscilan entre el 87 y 119 %.

Tabla II.7.- Parámetros analíticos de las rectas de calibración.

	Serotonina	Triptófano	Ác. Indol-3-Acét
Análisis de Regresión			
Ordenada en el Origen			
Valor estimado	49.73	51.78	44.40
Desviación estándar	0.276	0.742	0.793
Pendiente			
Valor estimado	0.255	0.424	0.411
Desviación estándar	0.006	0.015	0.016
Coefficiente de Correlación	0.999	0.998	0.998
Error de la Estima	0.356	0.957	1.024
Análisis de Varianza			
F	2054	784	643
100·R ²	99.8	99.6	99.5

Tabla II. 8. Parámetros estadísticos representativos de los métodos analíticos. Muestras con 40 ng para cada uno de los analitos.

Parámetros	Compuestos analizados			
	Serotonina	Triptófano	Ác. Indol-3-Acético	5-Hidroxitriptófano
O	39.22	40.76	40.88	38.38
S	1.15	2.86	2.14	2.42
S _m	0.38	0.95	0.76	0.86
C.V	2.91	6.96	5.23	6.35
E(%)	2.41	5.27	4.40	5.30
t _{tab}	2.306	2.306	2.365	2.365
t _{exp}	0.676	0.266	0.411	0.668
t' _{exp}	2.028	0.797	1.163	1.883
LD(ng)	19.56	19.32	22.50	16.39

Tabla II.9.- Recuperación de los derivados del Indol en muestras sintéticas.

Compuesto	Cantidades de derivado (ng)		R(%)
	Añadida	Hallada	
Serotonina	40	42.17	105.40
	80	75.12	106.10
Triptófano	40	41.42	103.55
	80	78.18	97.72
Ác. Indol-3-Acético	40	47.87	119.67
	80	88.75	110.94
5-Hidroxitriptófano	40	40.50	101.25
	80	69.80	87.25

II.6.- DETERMINACIÓN DE LOS COMPUESTOS INDÓLICOS EN SUERO DE RATA.

El método analítico puesto a punto, ha sido aplicado a la determinación de los derivados indólicos en muestras de suero de rata. Después de someter las muestras al tratamiento previo indicado en la Parte Experimental [177], el suero fue enriquecido por la adición de disoluciones que contenían diferentes cantidades de cada uno de los cuatro analitos. En la Tabla II.10 se recogen los porcentajes de recuperación obtenidos. Los valores hallados, que varían entre el 94.30 y 107.21%, pueden considerarse aceptables. La Figura II.9 muestra un cromatograma representativo.

La Serotonina no ha podido determinarse conjuntamente con los otros indoles. Sin embargo, se han calculado recuperaciones para este compuesto en una muestra de suero a la que sólo se ha añadido Serotonina. Como puede observarse en la Tabla II.10 los valores son comparables a los determinados para los demás indoles.

El método descrito permite la determinación conjunta de los derivados indólicos en estudio, excepto la Serotonina, que solo puede determinarse individualmente.

Tabla II.10.- Recuperaciones de los derivados indólicos en muestras de suero de rata.

Compuesto	Cantidades (ng)		R(%)
	Añadidas	Halladas	
Serotonina	50	48.50	97.20
	100	107.2	107.21
Triptófano	40	39.60	99.00
	80	78.79	98.49
Ác. Indol-3-Acético	40	42.31	105.78
	80	75.44	94.30
5-Hidroxitriptófano	40	38.44	96.10
	80	78.44	98.05

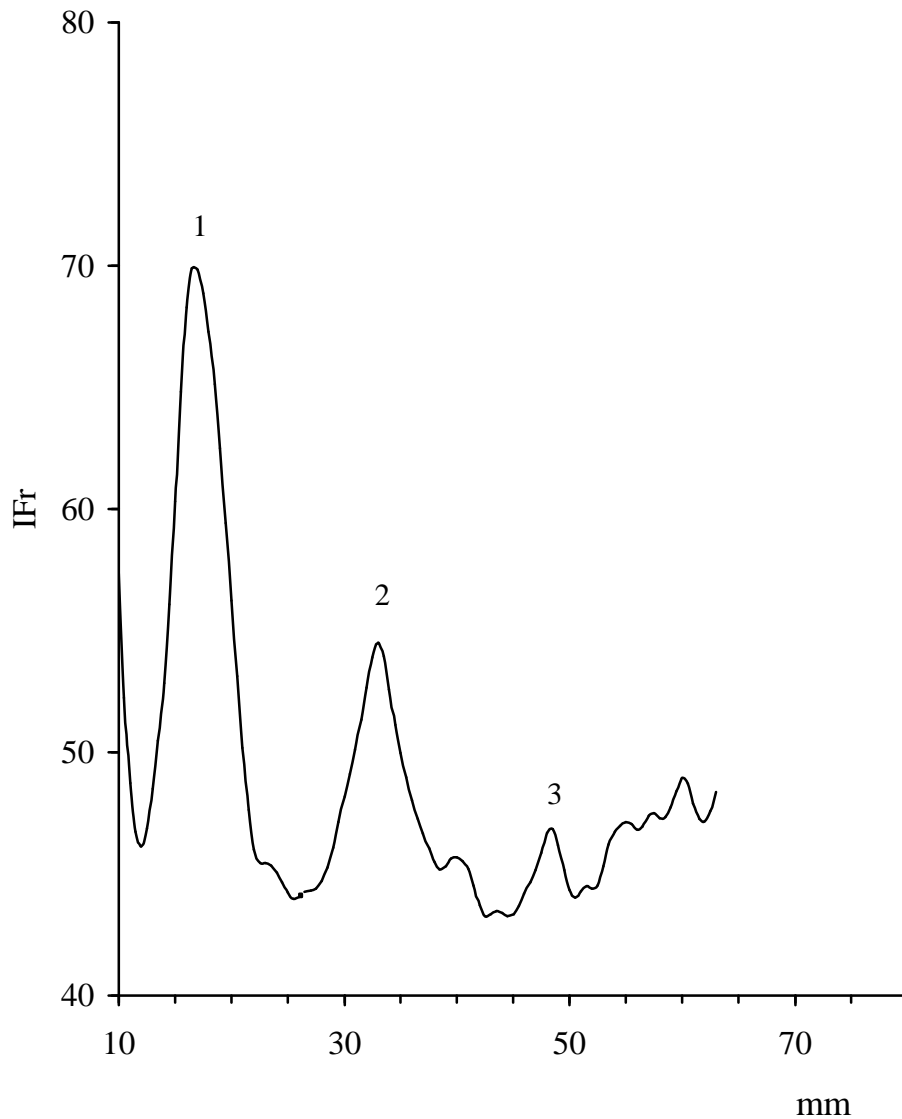


Figura II.9.- Cromatograma de una muestra de suero enriquecida con 50 ng de derivados indólicos. (1) 5-Hidroxitriptófano, (2) Triptófano y (3) ácido Indol-3-Acético. Fase estacionaria: Celulosa. Elución con Cloroformo:Metanol:Amoniaco (12:7:1) (v:v:v). $\lambda_{exc} = 280 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 347 \text{ nm}$ Rendijas:5 nm

Capítulo 3
DANSILACIÓN DE POLIAMINAS ASISTIDA
POR MICROONDAS Y DETERMINACIÓN
POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN

III.1.- INTRODUCCIÓN.

Más que las aplicaciones espectroscópicas, han sido otras aplicaciones prácticas las que han contribuido a popularizar el empleo de la radiación por microondas. El campo en que este tipo de radiación ha conocido un mayor desarrollo ha sido, sin lugar a dudas, su empleo en operaciones de secado y calentamiento.

Cuando la radiación de microondas atraviesa una muestra, su energía es absorbida por la muestra con una velocidad que depende de su factor de disipación. El factor de disipación (tag^*) es el cociente entre el factor de pérdida dieléctrica de la muestra (ϵ'') y su constante dieléctrica (ϵ'), por lo que

$$\text{tag}^* = \epsilon'' / \epsilon'$$

siendo la constante dieléctrica una medida de la capacidad de la muestra para obstruir el paso de las microondas, mientras que el factor de pérdida representa una medida de su capacidad para disipar dicha energía.

La disipación de la energía de las microondas en una muestra, condiciona su penetración. Este aspecto depende también de la frecuencia de la radiación, de manera que la penetración es proporcional a la inversa de la raíz cuadrada de la frecuencia de las ondas.

La disipación de energía en una muestra es la causa de su calentamiento y básicamente se produce por dos mecanismos, conducción iónica y rotación dipolar que, en la mayoría de los casos, tienen lugar conjuntamente.

La conducción iónica se refiere a la migración de los iones disueltos en el campo

electromagnético aplicado, y supone una disipación de energía, en forma de calor, correspondiente a un valor de $i \cdot R^2$, debido a la resistencia al flujo de los iones.

La conducción iónica depende de la naturaleza y movilidad de los iones y de su concentración en la disolución. Además, la disipación de la radiación de microondas por este mecanismo aumenta con la temperatura, por lo que, en la etapa final de calentamiento de muestras en disolución, este es el mecanismo que controla los procesos de digestión.

Es bien sabido que son las moléculas polares las que mejor absorben la radiación de microondas. Un estudio de la regresión entre el ϵ'' T que experimentan pequeños volúmenes de diferentes disolventes, en un horno de microondas, y su constante dieléctrica, ha revelado la existencia de un coeficiente de correlación lineal de 0.92, por lo que la constante dieléctrica de un disolvente puede considerarse un buen estimador de su capacidad para absorber la radiación de microondas.

El otro mecanismo que provoca el calentamiento de las muestras en horno de microondas es la rotación dipolar. Este proceso se debe al alineamiento, debido al campo eléctrico creado, de las moléculas que poseen un momento dipolar permanente o inducido.

Al aplicar la radiación de microondas a una muestra que contiene moléculas dipolares, estas tienden a orientarse en el campo electromagnético creado, provocándose una organización del sistema pero, al aumentar la temperatura se desordena, regresando a la situación inicial, con la consiguiente liberación de energía térmica. El calentamiento así producido no se transmite desde una fuente externa hasta la muestra, sino que se genera en ella misma.

La eficacia del mecanismo de rotación dipolar, en cuanto al calentamiento de las muestras, depende de las características de las moléculas que las integran, en especial de su tiempo de relajación dieléctrica que, a su vez, depende de la temperatura y la viscosidad.

Hasta ahora, sólo hemos hablado del efecto de la frecuencia de las microondas sobre el calentamiento de las muestras. Además, es necesario añadir que, para una frecuencia dada, el calentamiento de las muestras aumenta con la potencia aplicada y con el tiempo de irradiación, y decrece con la masa [178-179].

De todo lo anteriormente expuesto sobre el fundamento de la interacción de la radiación de microondas con la materia, se desprende que los sistemas químicos en los que el horno de microondas puede aportar ventajas sustanciales, viene descrito por los siguientes aspectos:

- Naturaleza polar de las muestras o del medio de reacción.
- Procesos que requieran un calentamiento.
- Procesos en los que los productos de reacción no se descompongan con el aumento de temperatura, lo que podría provocar su degradación por falta de un control estricto de las condiciones de reacción o digestión. Esto, sin embargo, no afecta a aquellos componentes que pueden desprenderse en forma gaseosa a temperaturas comprendidas entre 100 y 200 °C, pues podrían retenerse en el sistema de reacción, utilizando un reactor hermético a presión.

En los últimos años, ha despertado un gran interés la utilización de microondas en Química Analítica [180]. A continuación se incluyen algunas de las aplicaciones más relevantes.

Digestión en microondas para análisis elemental.

La mineralización de muestras asistida por microondas, para análisis elemental, ha llegado a establecerse como una técnica rutinaria y bien desarrollada. Desde los primeros experimentos llevados a cabo por Samra, en 1975 [181], se ha investigado la aplicación de la energía de microondas para la digestión ácida de una gran variedad de matrices: biológicas, geológicas, metálicas, medioambientales, etc, [180, 182-183], antes de la determinación de toda clase de elementos por Espectrometría de Absorción Atómica [184-186] o ICP [187-192]. Todos los autores destacan la mayor velocidad de la

digestión asistida por microondas, así como el aumento en la precisión, especialmente cuando se utilizan recipientes de mineralización cerrados.

Extracción asistida por microondas.

La extracción asistida por microondas de analitos orgánicos en diferentes tipos de matrices, ha sido ampliamente investigada recientemente. Algunas de sus ventajas se resumen a continuación:

- Requiere mucho menor volumen de disolvente orgánico. Puede ser alrededor de un 10% del necesario para la extracción Soxhlet o por ultrasonidos;
- Reduce el tiempo de extracción, y
- Es posible la extracción simultánea de múltiples muestras.

Así, la extracción asistida por microondas, ha sido propuesta como una alternativa a la extracción Soxhlet, al empleo de ultrasonidos y a la extracción de fluidos supercríticos, para la extracción de compuestos orgánicos como hidrocarburos aromáticos policíclicos, pesticidas, fenoles, PCBs, etc, contenidos en diferentes matrices sólidas [193-199].

Pueden citarse otras aplicaciones de la utilizaciones de la radiación de microondas en Química Analítica. Entre ellas pueden citarse la preconcentración, la desorción de sólidos y la aceleración de reacciones. A esta última dedicaremos el siguiente apartado.

Reacciones en hornos de microondas.

Las mismas ventajas que se obtienen en la disolución de muestras con el empleo de microondas, podrían obtenerse en otros procesos que vinieran gobernados por una etapa térmica, siempre y cuando tuvieran lugar en un medio lo suficientemente polar como para absorber la radiación de microondas por alguno de los dos mecanismos básicos: la rotación dipolar y la conducción iónica. En consecuencia, cualquier reacción

entre dos compuestos que de lugar a un determinado producto, podría acelerarse y mejorar su rendimiento, siempre y cuando el producto de reacción sea estable frente a la radiación de microondas y los compuestos reactivos absorbieran la misma con una cierta eficacia.

Hasta 1986 no se había propuesto el empleo de los hornos de microondas para acelerar reacciones en el laboratorio [200-201]. Sin embargo, la posibilidad de automatización y de llevar a cabo numerosas reacciones a la vez, en la misma cavidad de microondas, ha hecho que el número de reacciones orgánicas aceleradas por radiación de microondas haya aumentado, fundamentalmente en lo que a síntesis orgánica se refiere [202]. En la Tabla III.1 se recogen algunos ejemplos representativos, en los que se observan aumentos de velocidad de reacción de hasta 1240 veces.

Desde el punto de vista analítico, son relativamente escasos los trabajos en los que se describe el empleo de los hornos de microondas para acelerar reacciones orgánicas. En tal sentido, destaca la hidrólisis del Paracetamol [203], del Formetanato [204] y de benzodiazepinas a benzofenonas [205], así como la saponificación de la vitamina A a Retinol [206].

En este Capítulo se incluye el estudio de la dansilación de diferentes poliaminas, haciendo uso de la radiación de microondas para acelerar la reacción, así como la separación de los derivados dansilados haciendo uso de la Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Tabla III.1.- Comparación de tiempos de reacción y rendimientos para reacciones representativas, usando procedimiento clásico o la radiación por microondas.

Compuesto sintetizado	Tiempo de reacción		Rendimiento (%)	
	Clásico	Microondas	Clásico	Microondas
Hidrólisis de Benzamida a ácido Benzoico	1h	10 min	90	99
Oxidación de Tolueno a ácido Benzoico	25 min	5 min	40	40
Esterificación de ácido Benzoico	8 h	5 min	74	76
Reacción S _N 2 de 4-cianofenoxido con Cloruro de Benzilo	12 h	35	65	65

III.2.- DANSILACIÓN DE POLIAMINAS ASISTIDA POR MICROONDAS.

La dansilación convencional de poliaminas está basada en la reacción directa con Cloruro de Dansilo, en presencia de una alta concentración de Bicarbonato, según la reacción que aparece descrita en la Figura III.1. Los tiempos requeridos para llevar a cabo la dansilación oscilan, entre 12 horas a temperatura ambiente y 60 minutos a 37-45°C. En la Tabla III.2 se han recogido los diferentes tiempos y temperaturas utilizadas para llevar a cabo la dansilación de distintas poliaminas en diferentes tipos de muestras.

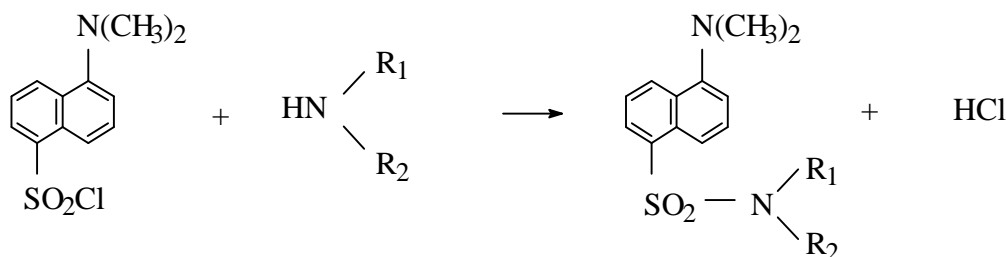


Figura III.1.- Reacción del Cloruro de Dansilo con aminas.

Como acabamos de comentar, muchas reacciones orgánicas son aceleradas drásticamente cuando se someten a la radiación de microondas.

Con la misma finalidad, se estudia a continuación la influencia de dicha radiación en algunos aspectos relacionados con los procesos implicados en la reacción de dansilación, con especial énfasis en la potencia empleada y el tiempo de reacción.

Para establecer la eficacia de la reacción, se comparan los resultados obtenidos con la utilización de la radiación de microondas, con los correspondientes a la dansilación efectuada por un método convencional contrastado. En ambos casos, la cuantificación de las poliaminas dansiladas se realiza por Cromatografía Líquida de Alta Resolución, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado III.4 de este Capítulo.

Tabla III.2.- Tiempos y temperaturas empleadas para la dansilación de poliaminas.

Poliaminas	Tipo de muestra	T (°C)	t(min)	Ref.
Triptamina, Putrescina, Cadaverina, Histamina, Tiramina, Espermidina	Vino	45	60	82
Triptamina, Putrescina, Cadaverina, Histamina, Tiramina, Espermidina	Queso, Atún	37	60	190
Putrescina, Cadaverina, Histamina, Espermidina	Salmón, Ostras, Gambas	TA*	>600	84
Putrescina, Cadaverina, Histamina, Tiramina, Espermidina, Espermina	Queso	39-40	60	83
Putrescina, Cadaverina, Histamina, Espermidina, Espermina	Atún	TA*	>600	86
Histamina, Tiramina, Putrescina	Mosto, Vino	40	30	191
Putrescina, Cadaverina, Histamina	Comidas proteicas	60	60	192
Putrescina, Cadaverina, Espermidina, Espermina	Tejidos de plantas	60	60	96
Putrescina, Cadaverina, Tiramina, Espermidina, Espermina	-	TA*	>900	193
Histamina	Suero de rata	45	35	194
Putrescina, Cadaverina, Tiramina, Espermidina, Espermina, Histamina	Tejidos de plantas	TA*	900	97
Tiramina, Putrescina, Cadaverina, Histamina, Tiramina, Espermidina	Aceituna	35	120	102
Triptamina, Putrescina, Cadaverina, Histamina, Tiramina, Espermidina	Sardina	TA*	>600	184

* TA: Temperatura ambiente.

III.2.1.- Influencia de las variables experimentales.

Además de la elección del disolvente, los parámetros que controlan la velocidad de calentamiento en un horno de microondas son: la potencia aplicada, la cantidad de muestra y el volumen del reactor. Variables que tendrán que optimizarse para obtener los máximos rendimientos de reacción en el menor tiempo posible.

La potencia aplicada modifica drásticamente la temperatura y la presión que alcanzan los disolventes en los reactores. Debido a la eficacia en el calentamiento de la mezcla de reacción, al aumentar la potencia se obtiene, en la mayoría de los casos, una aceleración de las reacciones.

Con objeto de comparar los resultados obtenidos por el método propuesto, con los obtenidos llevando a cabo una dansilación convencional, se mantuvieron constantes en todas las experiencias el volumen del reactor, la cantidad y naturaleza de las muestras. De aquí, que las variables a considerar en los estudios que se comentan a continuación son: la potencia de la radiación aplicada, la presión en el interior del reactor y el tiempo de reacción.

La presión y la temperatura que se alcanzan en el interior de los reactores, están íntimamente relacionadas con las variables potencia y tiempo. Con el equipo utilizado es posible aplicar una potencia máxima de 630 W, y permite establecer la relación entre la presión en el interior del reactor y el tiempo necesario para conseguirla, a cada potencia seleccionada, así como la máxima presión que queremos alcanzar, dentro del límite de 250 psi impuesto por los recipientes de reacción y las membranas de seguridad. En la Figura III.2, se representa, para una presión máxima de 200 psi, la presión alcanzada en el interior del reactor, en función del tiempo, para distintas potencias. A partir de la misma se deduce, que cuanto mayor es la potencia empleada, mayor es la presión que se alcanza en el interior del reactor en un tiempo determinado. Asimismo, se observa que el tiempo necesario para alcanzar una presión, varía considerablemente con la potencia suministrada por el equipo de microondas.

Los resultados agrupados en la Figura III.3, muestran la dependencia de la presión en el interior de los reactores con el tiempo, para una potencia de microondas constante (40%), y presiones máximas de 50 psi y 100 psi.

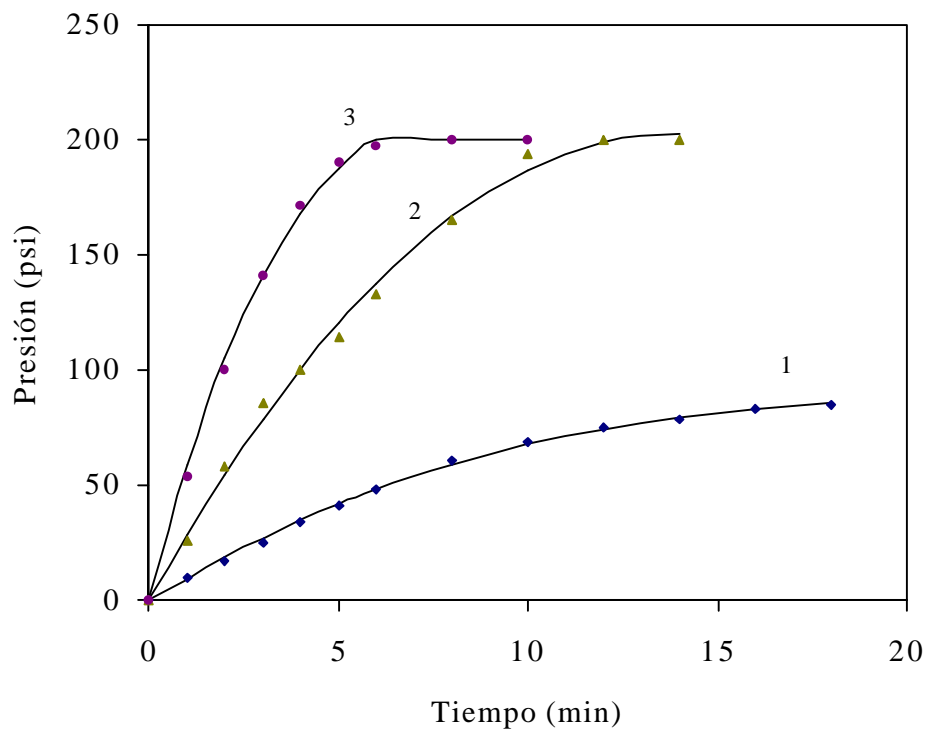


Figura III.2.-
Varia c i ó n
de la presi ó n
n con el tiempo a diferentes niveles de potencia, para una presión máxima de 200 psi. (1) 20%, (2) 40% y (3) 60% de potencia.

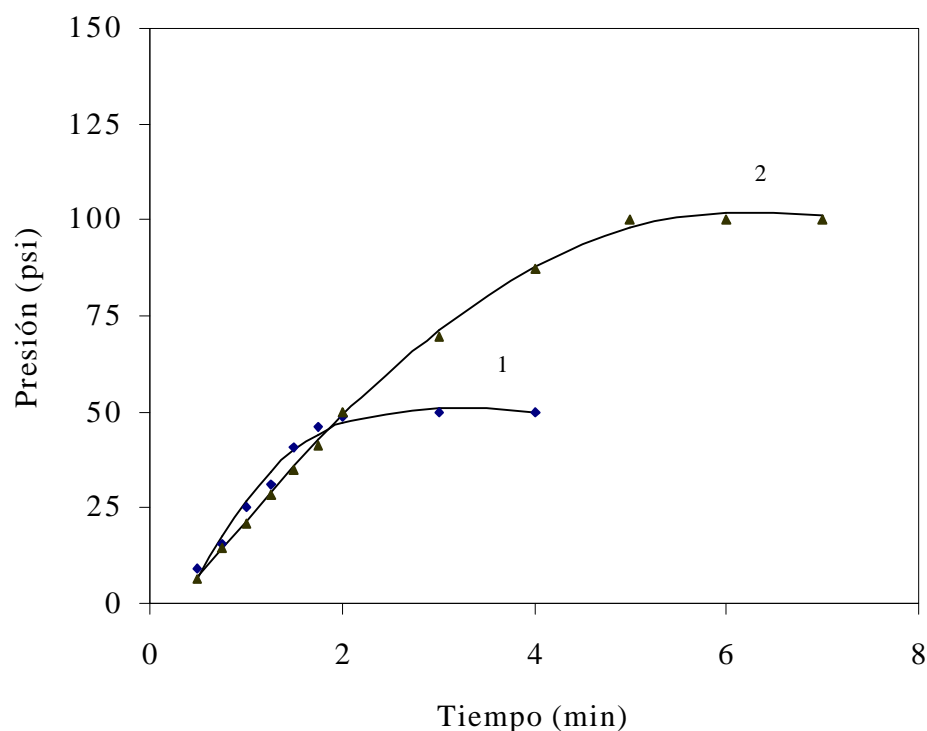
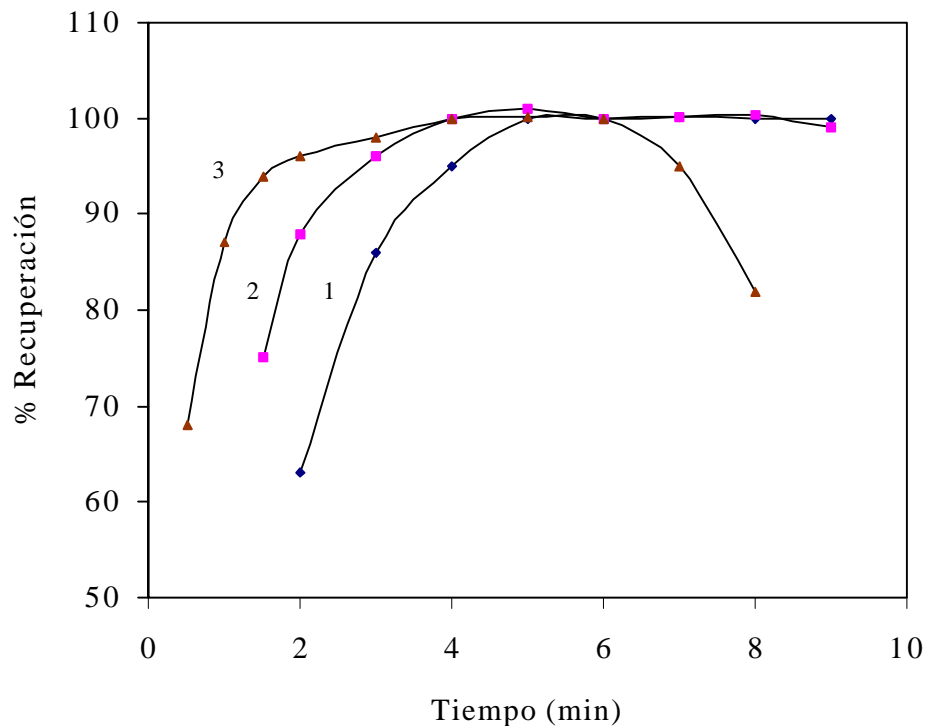


Figura III.3.- Variación de la presión con el tiempo, para presiones máximas de 50 y 100 psi. Potencia aplicada = 40% (252 W).

Debido a la eficacia en el calentamiento de la mezcla de reacción, al aumentar la potencia se obtiene, en la mayoría de los casos, una aceleración de las reacciones. Los estudios llevados a cabo con diferentes poliaminas muestran, que la eficacia de la dansilación aumenta a medida que aumenta la potencia aplicada. Sin embargo, a tiempos de reacción iguales o mayores de 5 min y para potencias elevadas, superiores a 60%, deben producirse procesos secundarios que afectan a la estabilidad de los derivados dansilados y, en consecuencia, se reducen los porcentajes de recuperación. En la Figura III.4, se muestran los resultados obtenidos para la dansilación de la Putrescina a potencias del 20%, 40% y 60%, correspondientes a 126 W, 252 W y 378 W, fijando una presión máxima de 13,6 bar (200 psi).



Figura

III.4.-

Efecto

de la potencia de la radiación en la eficacia de la dansilación de la Putrescina ($70 \mu\text{g/ml}$).

(1) 20%, (2) 40% y (3) 60%. $P_{\text{máxima}} = 200 \text{ psi}$

Se ha comprobado que para potencias del 40%, la dansilación de las poliaminas tienen lugar con altos rendimientos, y en tiempo relativamente cortos, cuando la presión máxima es alrededor de 50 psi. El uso de presiones menores conduce a tiempos de dansilación muy largos, mientras que presiones mayores proporcionan bajas recuperaciones, posiblemente por degradación de los derivados dansilados a las temperaturas alcanzadas en el interior de los reactores, como se comentó anteriormente. En la Tabla III.3 se muestran los resultados encontrados para presiones máximas de 100 y 50 psi, así como las presiones alcanzadas en el interior de los reactores a distintos tiempos y las recuperaciones para los tiempos indicados. Los resultados confirman las pequeñas recuperaciones que se obtienen a presiones elevadas. Sin embargo, para

presiones máximas de 50 psi y después de 4 minutos, tiempo requerido para alcanzar dicha presión, la recuperación es del 100%.

Tabla III.3.- Eficacia de la dansilación de Putrescina para distintas presiones y tiempos. Potencia aplicada 40% (252 W).

Presiones (psi)		Tiempo (min)	Recuperación (%)
máxima	alcanzada		
100	100	12	25
100	100	8	25
100	80	4	80
50	50	4	100

Con objeto de comprobar cómo varia la eficacia de la dansilación con el tiempo, para una presión máxima de 50 psi, y una potencia aplicada del 40%, se determinaron recuperaciones de cada una de las poliaminas para distintos tiempos de reacción. En la Figura III.5 se representan las variaciones de presión en el interior del reactor, así como las recuperaciones en función del tiempo, para la Putrescina. En la Tabla III.4 se han agrupado las recuperaciones obtenidas, en función del tiempo de reacción.

La Figura III.5 muestra que son necesarios alrededor de 2 minutos para alcanzar una presión de 50 psi con una potencia del 40%. En la misma Figura se muestra que bajo tales condiciones, la eficacia alcanzada en la dansilación de la Putrescina es aproximadamente del 90%. Para incrementar este porcentaje, podemos aumentar la potencia y/o la presión, con el consiguiente riesgo de degradación del producto dansilado. En tal situación, nosotros hemos optado por aumentar el tiempo de reacción, después de alcanzar la presión de 50 psi en el interior del reactor. Así, con tiempos adicionales de 2 a 3 minutos, una vez alcanzada la presión máxima, se obtienen resultados comparables

a los que se alcanzan a temperatura ambiente con tiempos de reacción de 12 horas.

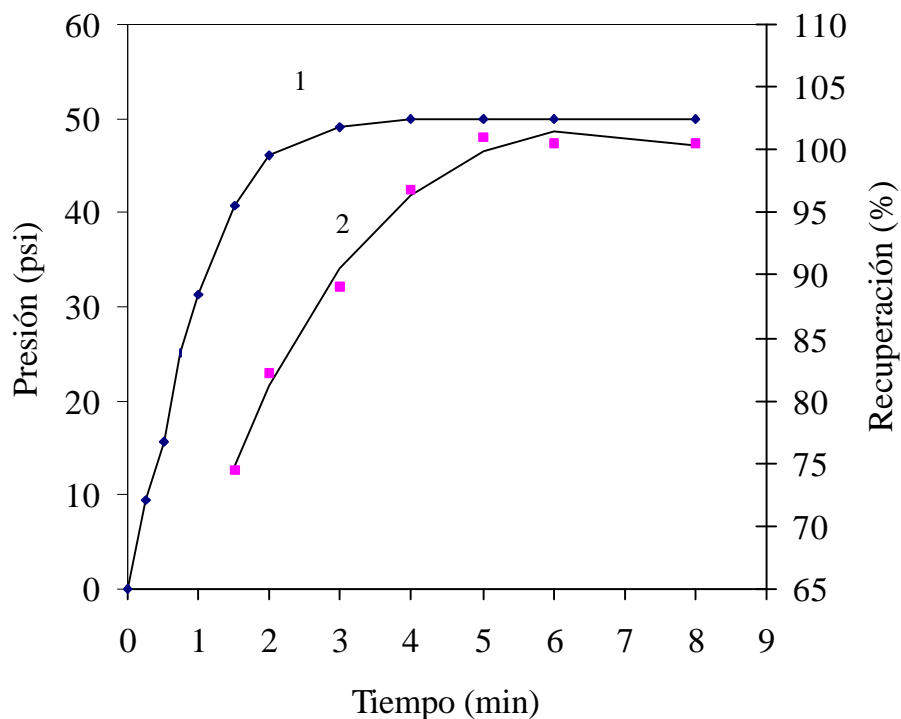
Tabla III.4.- Efecto del tiempo en la eficacia de la dansilación de Putrescina (70 $\mu\text{g/ml}$), para una potencia aplicada del 40% (252W) y una presión máxima de 50 psi.

Tiempo (min)	% Recuperación
1.5	74.48
2	82.50
3	89.08
4	96.86
5	100.93
6	100.46

Se han llevado a cabo experiencias con otras potencias, manteniendo la presión máxima en el interior del reactor a un valor de 50 psi. La Tabla III.5 muestra las recuperaciones obtenidas al mantener la irradiación durante 1 y 3 minutos adicionales, después de alcanzar la presión máxima de 50 psi en el interior del reactor. Se observa que, para las potencias estudiadas, dichos tiempos permiten dansilaciones cuantitativas. Los tiempos totales necesarios oscilan entre 10.5 y 4 minutos, para potencias comprendidas entre el 20 y el 60% (126 W y 378 W).

Con objeto de intentar establecer alternativas experimentales, se han realizado experiencias en las que se fija la presión máxima a 50 psi y se aplican diferentes potencias. Las variaciones de las presiones en el interior del reactor, a diferentes tiempos, se han agrupado en la Figura III.6. Puede observarse que al disminuir la potencia, se

alargan considerablemente los tiempos necesarios para alcanzar los 50 psi, o no llega a conseguirse la presión máxima, como sucede al aplicar una potencia del 10%.



F

figura III.5.- (1) Variación de la presión en el interior del reactor con el tiempo de reacción. (2) Efecto del tiempo de digestión en la eficacia de la dansilación. Presión máxima 50psi, Potencia aplicada del 40% (252W), $C_{\text{amina}} = 70 \mu\text{g/ml}$.

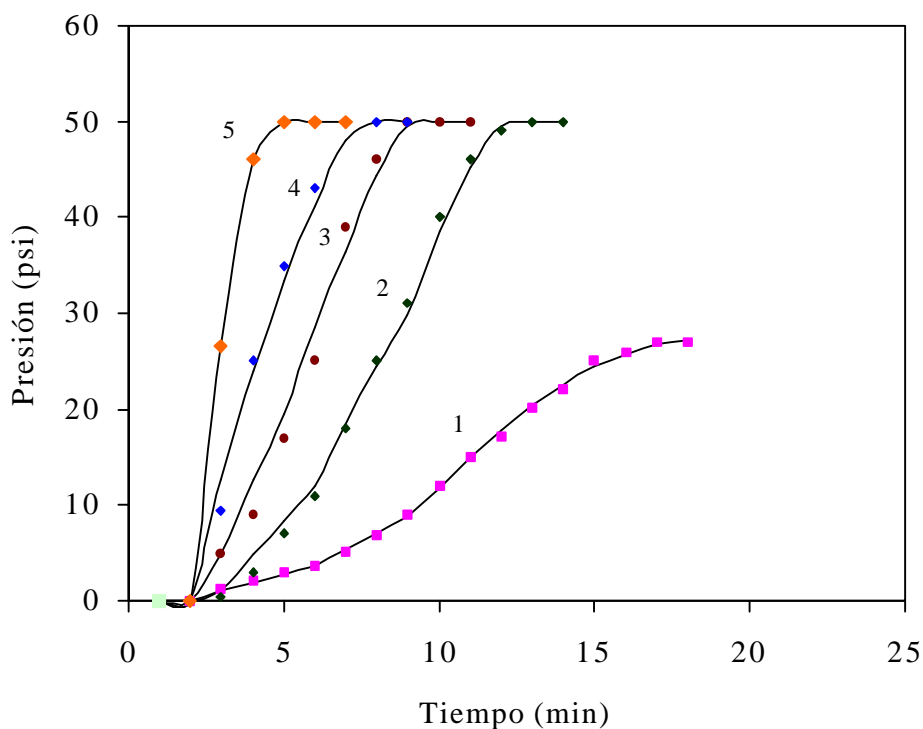


Figura III.6.- Dansilación de la Putrescina para distintas potencias. Variación de la presión en el interior del reactor con el tiempo de reacción, manteniendo la presión máxima a 50 psi. Potencias: (1) 10%, (2) 20%, (3) 30%, (4) 40% y (5) 60%.

Con objeto de comprobar que la eficacia de la dansilación era independiente de la cantidad de amina en el medio de reacción, se llevaron a cabo dansilaciones en disoluciones que contenían 18 y 36 ng de cada una de las poliaminas estudiadas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina. Las recuperaciones obtenidas oscilan entre 95.55% y 101.78%.

Así mismo, las dansilaciones de muestras que contienen las cuatro poliaminas en diferentes proporciones, muestran buenas recuperaciones. Los resultados encontrados se resumen en las Tablas III.6 y III.7.

Tabla III.5.- Eficacia de la dansilación de la Putrescina (70 $\mu\text{g/ml}$) para diferentes potencias aplicadas y tiempos de reacción.

Potencia (%)	Tiempos (min)		Recuperación (%)
	t	t _{total}	
20	1	8.5	99.06
	3	10.5	97.78
30	1	4.5	95.62
	3	6.5	98.72
60	1	2	97.84
	3	4	101.94

Tabla III.6. Recuperaciones de poliaminas después de la dansilación asistida por microondas, según el método propuesto.

Poliaminas	Amina añadida ($\mu\text{g/ml}$)	
	18	36
Putrescina	101	96
Cadaverina	99	96
Espermidina	98	100
Espermina	102	100

Tabla III.7.- Recuperaciones de poliaminas en muestras con diferentes proporciones de las mismas, después de su dansilación asistida por microondas. Las muestras contienen 12.5 ó 50 ng de cada una de las poliaminas.

Putrescina:Cadaverina: Espermidina:Espermina	Recuperaciones (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
4:4:4:1	97	99	92	99
4:4:1:4	99	100	88	88
4:1:4:4	95	98	88	88
1:4:4:4	108	90	88	88

Una de las ventajas de llevar a cabo la reacción bajo la acción de la radiación de microondas, es la posibilidad de efectuar varias dansilaciones al mismo tiempo. Manteniendo las condiciones experimentales antes establecidas: 40% de potencia aplicada y 50 psi de presión máxima, se ha procedido a dansilar varias muestras de forma simultánea. En este caso, el tiempo de reacción debe ser prolongado 10 minutos con 6 reactores y hasta 25 minutos con 10 reactores. Para acortar estos tiempos, puede recurrirse al empleo de potencias mayores, lo cual permite alcanzar la presión máxima en menor tiempo.

La Figura III.7 muestra la variación de la presión en el interior de los reactores, en función del tiempo, cuando se utilizan conjuntamente 2, 6 ó 10 reactores.

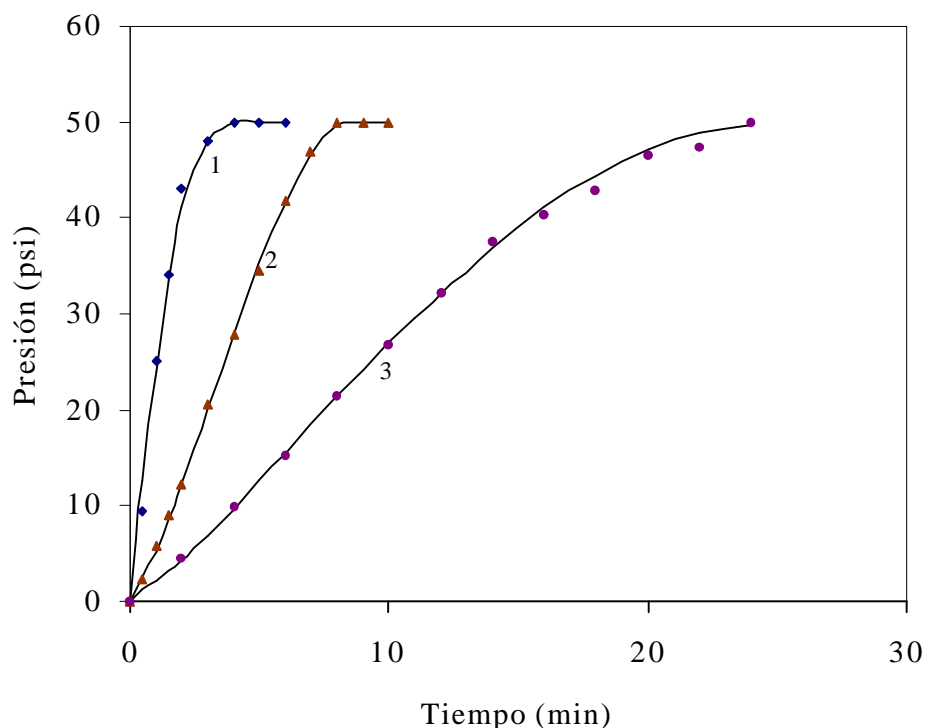


Figura III.7.- Variación de la presión en el interior de los reactores, en función del tiempo de reacción, cuando se emplean varios reactores. (1) 2 reactores; (2) 6 reactores y (3) 10 reactores.

III.2.2.- Calidad de los resultados.

Además de comprobar la eficacia del proceso de dansilación de poliaminas, haciendo uso de radiaciones de microondas, hemos querido establecer la fiabilidad de los resultados obtenidos. Para ello, se han comparado los resultados hallados, en cuanto a precisión y exactitud, con el método propuesto y con el empleado por diversos autores, basado en la reacción a temperatura ambiente durante 12 horas.

Con tal finalidad, se han danilado 6 muestras, conteniendo 50 ng de cada una de las poliaminas, empleando ambos métodos. Los resultados obtenidos se han agrupado en la Tabla III.8.

La aplicación de la prueba F ($F = S_1^2/S_2^2$), para un nivel de significación del 5%, nos indica que no hay diferencias significativas entre las varianzas de los dos métodos, puesto que $F_{\text{calculado}}$ (1.22) es menor que F_{tabulado} (5.820), para 6 grados de libertad y una prueba de dos colas.

Puesto que los métodos presentan desviaciones estándar que no son significativamente diferentes, se puede calcular una estimación de la desviación estándar conjunta a partir de las desviaciones estándar individuales, utilizándose la ecuación:

$$S^2 = \frac{(n_1-1) S_1^2 + (n_2-1) S_2^2}{(n_1+n_2-2)}$$

El $t_{\text{calculado}}$ vendrá dado por:

$$t = \frac{(\bar{X}_1 - \bar{X}_2)}{S \sqrt{(1/n_1 + 1/n_2)}}$$

donde t tiene (n_1+n_2-2) grados de libertad.

Por otra parte, el valor de $t_{\text{calculado}}$ (0.17), para una desviación estándar conjunta de 2.00, es menor que el t_{tabulado} (2.23) para 10 grados de libertad y un nivel de significación del 5%, lo que indica que no existen diferencias significativas entre las medias aritméticas de los dos métodos. Por consiguiente, puede decirse que el método propuesto no presenta errores sistemáticos.

Por otra parte, puesto que el valor de $F_{\text{calculado}}$ es menor que el valor de F_{tabulado} (4.284) para 6 grados de libertad y una prueba de una cola, podemos afirmar que la precisión de la danilación llevada a cabo en microondas, es considerablemente superior

que la dansilación a temperatura ambiente.

Tabla III.8. Comparación entre los métodos de dansilación propuesto y convencional.

	Tipo de dansilación	
	microondas	Temperatura ambiente, toda la noche
	52.6	47.2
	47.0	52.05
	48.4	46.4
	47.7	49.9
	47.2	50.0
	51.05	48.2
O	48.99	48.96
S	2.1	1.9

III.3.- DANSILACIÓN DE POLIAMINAS EN MUESTRAS REALES.

Es frecuente la necesidad de determinar poliaminas en muestras complejas y, en concreto, en matrices vegetales de diferente tipo. En la mayoría de los casos, el procedimiento analítico incluye la formación de derivados dansilados y su determinación por HPLC.

Con objeto de comprobar la aplicabilidad del método de dansilación establecido a muestras reales, se ha escogido un material biológico, tejido de fruto de banana (*Musa acuminata Colla AAA cv. Dwarf cavendish*), cultivado "in vitro" bajo un medio de

Murashige and Skoog's [167] y sujeto a diferentes tratamientos, con o sin reguladores del crecimiento o en presencia de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas. En cuanto a la determinación de las poliaminas contenidas en estas muestras, se ha empleado un método, con el uso de HPLC, que se comenta en el apartado siguiente.

La Tabla III.9 recoge los resultados hallados al utilizar el método convencional, basado en la dansilación a lo largo de toda la noche y el método propuesto. Los resultados muestran que existe una concordancia considerable entre ambos. Debe destacarse que debido a los bajos valores en las concentraciones de Cadaverina y Espermina en las muestras estudiadas, se hace necesario llevar a cabo su determinación por el método de las adiciones estándar.

Asimismo, en las Figuras III.8 y III.9 se muestran dos cromatogramas de una misma muestra, dansilada por ambos métodos, a temperatura ambiente y en microondas. Excepto en el tamaño de los picos, ligeramente superiores en el cromatograma correspondiente a la dansilación por microondas, los resultados son similares.

Tabla III.9.- Concentración ($\mu\text{g/g}$ de peso fresco) de poliaminas en tejidos de plantas.

	Muestra I		Muestra II	
	DAM	DTN	DAM	DTN
Putrescina	157	149	215	212
Cadaverina	2.8	3.2	7.7	10.3
Espermidina	90	83	87	90
Espermina	12	16	9.9	9.3

DAM: Dansilación asistida por microondas

DTA: Dansilación a temperatura ambiente.

III.4. DETERMINACIÓN DE DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN.

Tradicionalmente la determinación de poliaminas se ha llevado a cabo utilizando diferentes métodos cromatográficos, tales como la Cromatografía en Capa Fina [207-209], Cromatografía de Gases [210-212] y Cromatografía Líquida de Alta Resolución [72, 102, 110, 113].

Con objeto de poder validar el método propuesto en esta Memoria para la determinación de poliaminas, se ha puesto a punto un nuevo método para la determinación de estos compuestos por Cromatografía Líquida de Alta Resolución.

Las poliaminas son difíciles de analizar por técnicas cromatográficas simples, debido a su diversidad estructural y por carecer de un cromóforo común fácilmente detectable. En general, es frecuente el análisis de derivados de dichas aminas, siendo uno de los agentes derivatizantes más comunes el Cloruro de Dansilo [213-215].

III.4.1.- Características cromatográficas

Diferentes mezclas de disolventes y programas de gradientes se probaron con el fin de reducir el tiempo de análisis y obtener una buena resolución para las poliaminas estudiadas. Se obtuvieron buenos resultados usando como fase móvil una mezcla de Acetonitrilo y Agua en proporciones variables. El gradiente empleado se indica en la Tabla III.10, y en la Figura III.10, se muestra un cromatograma representativo.

Para comprobar la reproducibilidad del detector en la medida de los tiempos de retención de las diferentes poliaminas en estudio, se inyectaron diez muestras iguales, conteniendo cada una 50 ng de los distintos derivados dansilados. Como puede verse en la Tabla III.11, los valores obtenidos, que presentan coeficientes de variación del orden

de $\pm 0.54\%$, muestran una gran reproducibilidad.

Por otra parte, para comprobar la reproducibilidad del sistema de detección en las medidas de cantidades de amina, se realizaron inyecciones de 10 μl de cada disolución patrón. El valor medio de las áreas obtenidas es el valor que se ha tomado como referencia. A partir del mismo se obtiene la concentración de cada amina, por aplicación de la siguiente expresión:

$$C_i = C_p (\text{Área}_i / \text{Área}_p)$$

en la que C_i y Área_i son la concentración calculada y el área correspondiente a una amina determinada en la inyección i , y C_p y Área_p son los valores medios de la concentración y del área para cada patrón de amina. Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla III.12. Las desviaciones estándar relativas calculadas para las concentraciones, oscilan entre 3.14 y 4.32%, para la Espermidina y Espermina, respectivamente.

Tabla III.10.-Programa de elución en HPLC para análisis de poliaminas.

Tiempo (minutos)	Agua (%)	Acetonitrilo (%)
Inicial	40	60
8.0	40	60
13.0	10	90
20.0	10	90
30.0	40	60

Tabla III.11.- Reproducibilidad del sistema cromatográfico en relación a los tiempos de retención.

Amina	$(t_R \pm S)^*$		CV(%)
Putrescina	12.99	0.07	0.54
Cadaverina	15.04	0.06	0.39
Espermidina	21.46	0.04	0.19
Espermina	24.74	0.05	0.20

* Tiempo de retención medio \pm Desviación Estándar

Tabla III.12.- Reproducibilidad de la respuesta del detector a la concentración de aminas.

Amina	Concentración (ng)						S	CV(%)
	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆		
Putrescina	46.32	50.66	51.47	49.37	51.40	50.29	1.92	3.85
Cadaverina	48.19	51.90	53.83	51.23	54.28	51.57	2.18	4.21
Espermidina	47.92	51.76	52.90	51.25	51.70	52.18	1.61	3.14
Espermina	47.43	50.37	53.75	50.68	52.77	51.71	2.21	4.32

III.4.2.- Características analíticas.

En las determinaciones analíticas realizadas por cromatografía líquida, al igual que las realizadas por cualquier otro método analítico, deben determinarse los parámetros de calidad que caracterizan al método, entre estos parámetros podemos destacar los siguientes:

- Fiabilidad del método para la identificación de los compuestos, íntimamente relacionado con la selectividad de la detección y de la invariabilidad de las condiciones cromatográficas.
- La precisión de las determinaciones
- Repetibilidad de las determinaciones analíticas, desde el momento de iniciarse la preparación de las muestras.
- Rango de linealidad
- Límite de detección

Con objeto de determinar dichos parámetros se llevaron a cabo las experiencias que se describen a continuación.

Rectas de calibrado.

Las rectas de calibrado se establecieron preparando una serie de mezclas que contenían cantidades diferentes de poliaminas, comprendidas entre 0 y 60 ng, inyectando 10 µl de cada una de ellas en el cromatógrafo líquido y llevando a cabo dos réplicas. Las condiciones cromatográficas utilizadas son las descritas anteriormente.

Los datos correspondiente a las curvas de calibrado se encuentran en la Tabla III.13. A partir de los mismos se ha establecido el rango de linealidad obtenido en la determinación de cada amina, la recta de calibrado correspondiente, así como los respectivos coeficientes de regresión, llevándose a cabo la correspondiente validación de la regresión lineal, utilizando ANOVA.

Precisión

Para evaluar la precisión del método propuesto, se preparó una serie de 6 muestras conteniendo las aminas seleccionadas, con una concentración de 50 ng de derivado

dansilado, que se encuentra dentro del rango lineal de concentraciones para la determinación. Los diferentes parámetros estadísticos calculados se encuentran en la Tabla III.13, observándose que los resultados muestran que, para un nivel de confianza del 95% ($t=2.571$), el método puede considerarse correcto y sin error sistemático.

Límite de detección.

Existen diferentes métodos para calcular el límite de detección, la IUPAC recomienda tres veces la desviación estándar de la señal analítica correspondiente al blanco, dividida por la pendiente de la curva de calibración. En aquellas técnicas analíticas donde no es posible llevar a cabo la determinación de un blanco, como es el caso que nos ocupa, una estimación aproximada del límite de detección, puede calcularse a través de la ecuación [216]:

$$LD = 3 \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{(n+2)}{n+1}}$$

donde $S_{Y/X}$, representa la desviación estándar del ajuste de la recta de calibración, b la pendiente de dicha recta y n el número de patrones utilizados para obtener la recta de calibración.

Los resultados obtenidos se encuentran en la Tabla III.14, pudiendo observarse que los valores de los límites de detección, expresados como ng de amina libre, oscilan entre 1.74 y 0.35 ng para la Espermina y Cadaverina, respectivamente.

Tabla III.13.- Parámetros analíticos de las rectas de calibración.

	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
Análisis de Regresión				
Ordenada en el Origen				
Valor estimado·10 ⁻³	-20.7	-16.6	-18.1	-20.4
Desviación estándar·10 ⁻³	10.1	8.0	7.2	8.2
Pendiente				
Valor estimado·10 ⁻³	5.7	5.2	4.8	4.0
Desviación estándar·10 ⁻³	0.2	0.2	0.2	0.2
Coefficiente de Correlación	0.998	0.999	0.999	0.998
Análisis de Varianza				
F de la falta de ajuste	0.492	0.368	0.408	0.605
100·R ²	98.32	99.31	99.32	98.74

Tabla III.14.- Parámetros de calidad del método.

Parámetros	Poliaminas			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
O	49.92	51.83	51.32	51.11
S	1.79	2.07	1.53	1.98
CV(%)	3.58	3.99	2.98	3.88
Error(%)	3.76	4.19	3.13	4.08
t_{exp}	0.04	0.88	0.86	0.56
t'_{exp}	0.11	2.17	2.11	1.38
LD(ng)	1.65	0.35	1.14	1.74

Capítulo 4
COMPORTAMIENTO FLUORESCENTE DE
POLIAMINAS DANSILADAS SOBRE
SUPERFICIES SÓLIDAS . DETERMINACIÓN
POR CROMATOGRAFÍA EN CAPA FINA DE
ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN
FLUORESCENTE

IV.1.- INTRODUCCIÓN.

Para llevar a cabo la determinación de mezclas de aminas biogénicas y, entre ellas las poliaminas, es necesario un paso previo de separación de los compuestos que se quieren determinar, usando normalmente técnicas cromatográficas. La cromatografía de gases está limitada por los pasos de prepurificación, que son largos y complicados. La Cromatografía en Capa Fina ha sido utilizada muchas veces, preferentemente con fines preparativos o identificativos, más que para la cuantificación de estas sustancias. Sin embargo, los avances llevados a cabo en este campo permiten la determinación, llegando a límites de detección comparables a los obtenidos por HPLC. Esta última técnica es la más utilizada actualmente en el análisis de estos compuestos.

La determinación de estos compuestos, tal como hemos comentado, requiere el uso de agentes derivatizantes. Su elección depende de la técnica empleada para su separación.

El objetivo de este Capítulo es la puesta a punto de un nuevo método para la separación y cuantificación de los derivados dansilados de las siguientes poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, haciendo uso de la Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución (HPTLC) y en el empleo, como detector, de un espectrofluorímetro convencional, equipado con una fibra óptica que permite la medida directa en las placas. Los derivados se han obtenido mediante el método descrito en la Parte Experimental, utilizando Cloruro de Dansilo como agente derivatizante, con la ayuda de un horno de microondas. Las condiciones óptimas para realizar la así como la eficacia de la misma, se han establecido en el Capítulo anterior.

IV.2.- CARACTERÍSTICAS ESPECTROFLUORIMÉTRICAS DE LOS DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS.

Las poliaminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina carecen de fluorescencia natural. En consecuencia, es necesario recurrir a la formación de derivados para su determinación por técnicas espectrofluorimétricas. Como se ha comentado anteriormente, se ha utilizado Cloruro de Dansilo como agente derivatizante.

Teniendo en cuenta que la fluorescencia emitida por un fluoróforo depende en gran medida de la naturaleza del medio, se han estudiado las características espectrofluorimétricas de los cuatro derivados dansilados sobre distintas superficies sólidas y en medio acuoso. Las superficies sólidas ensayadas han sido: papel Whatman-41 y papel de celulosa modificada, como DE-81, P-81 y placas de Celulosa, Gel de Sílice y Sílice modificado químicamente, C-18.

Los espectros de fluorescencia, así como las medidas de intensidad de fluorescencia se han realizado a partir de los derivados dansilados depositados en el soporte escogido, sin previa elución. Las Figuras IV.1 a IV.6, muestran los espectros de emisión de cada uno de los derivados dansilados, a las longitudes de onda de excitación máximas, en los diferentes soportes sólidos utilizados. Los valores de las longitudes de onda de excitación y emisión máximas, así como las intensidades de fluorescencia, después de ser corregidas con la fluorescencia debida al soporte, se recogen en la Tabla IV.1.

Puede observarse que la intensidad de fluorescencia emitida depende en gran medida de la naturaleza del soporte. De acuerdo con los resultados obtenidos, los derivados estudiados muestran una intensidad de fluorescencia similar en los soportes de C-18 y de Gel de Sílice. También son comparables entre sí los resultados obtenidos en los distintos tipos de papel y en las placas de Celulosa. Sin embargo, las intensidades de fluorescencia en estos últimos son hasta tres veces superiores a las obtenidas en los otros dos soportes.

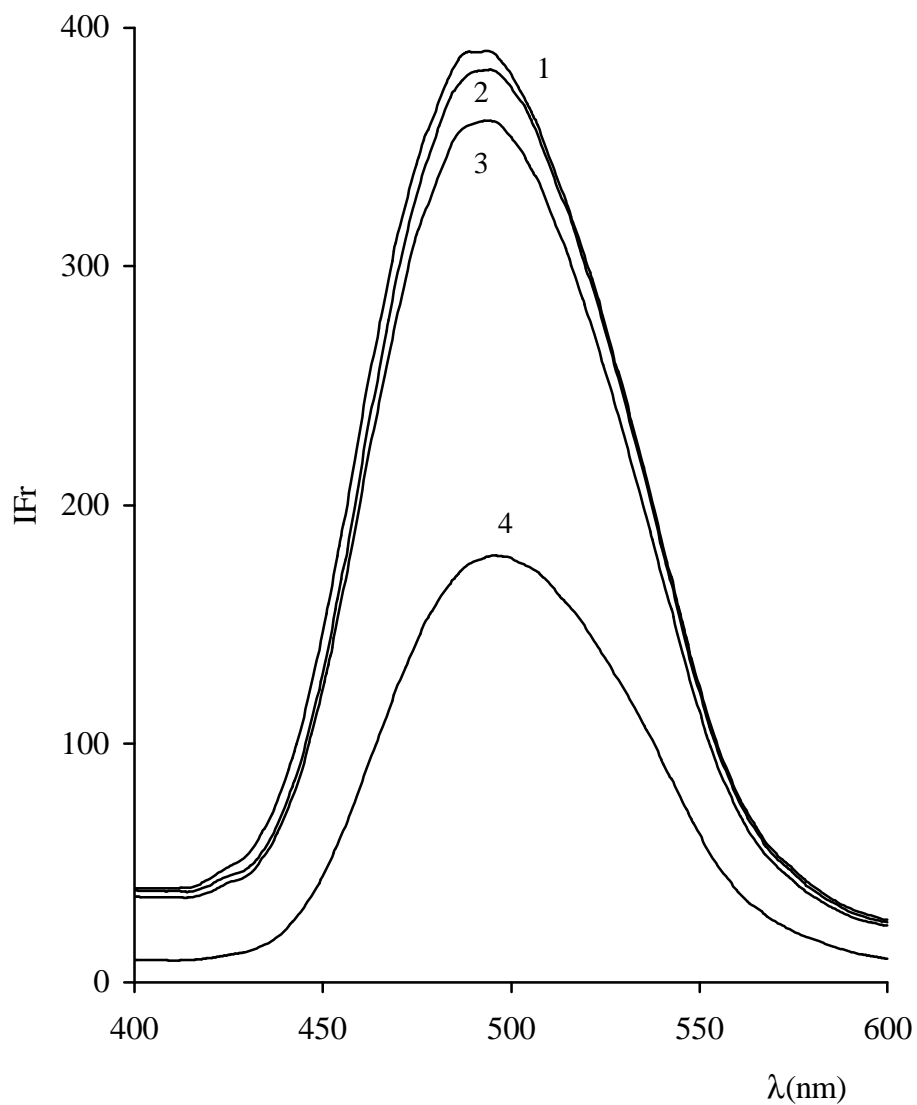


Figura IV.1.- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de papel Whatman-41. (1) Cadaverina, (2) Espermidina, (3) Espermina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μ g
 λ_{exc} = 340 nm Rendijas: (10,5) nm

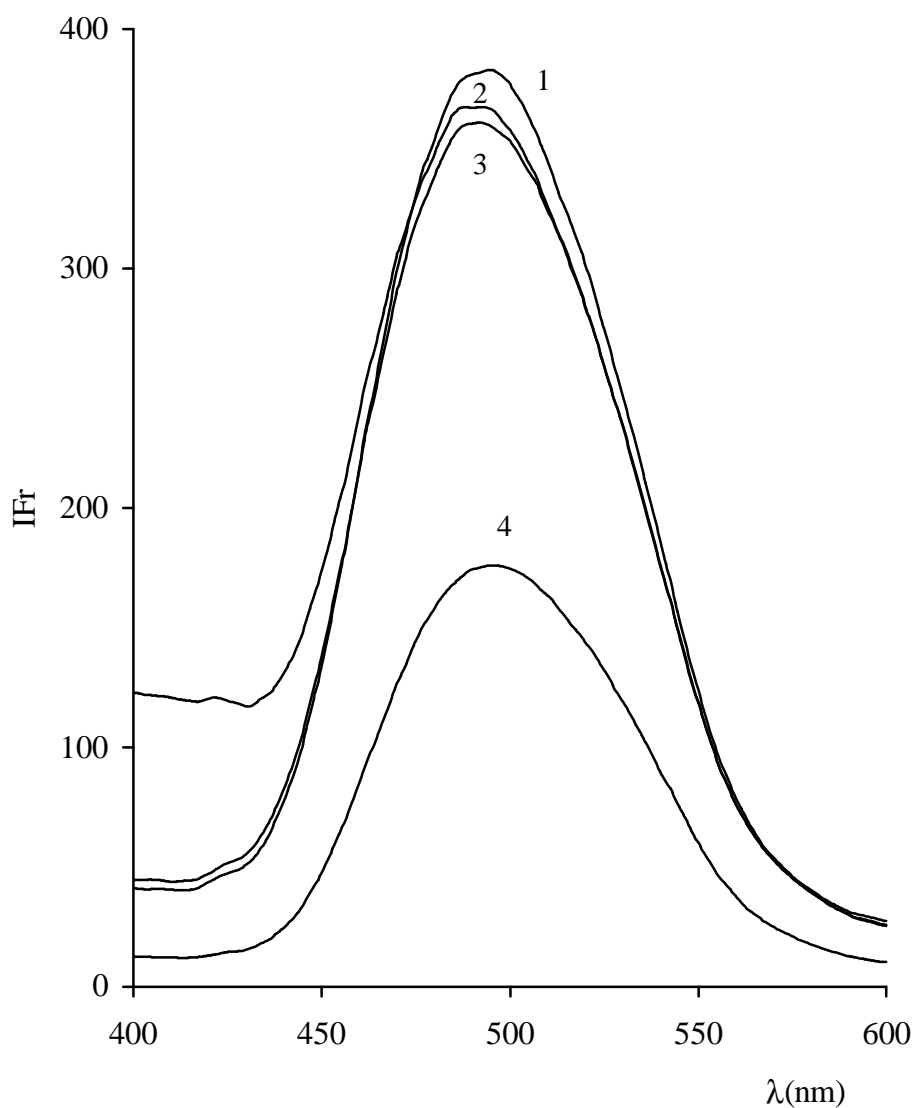


Figura IV.2.- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de Celulosa. (1) Espermidina (2) Espermina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μg . $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ Rendijas: (10,5) nm

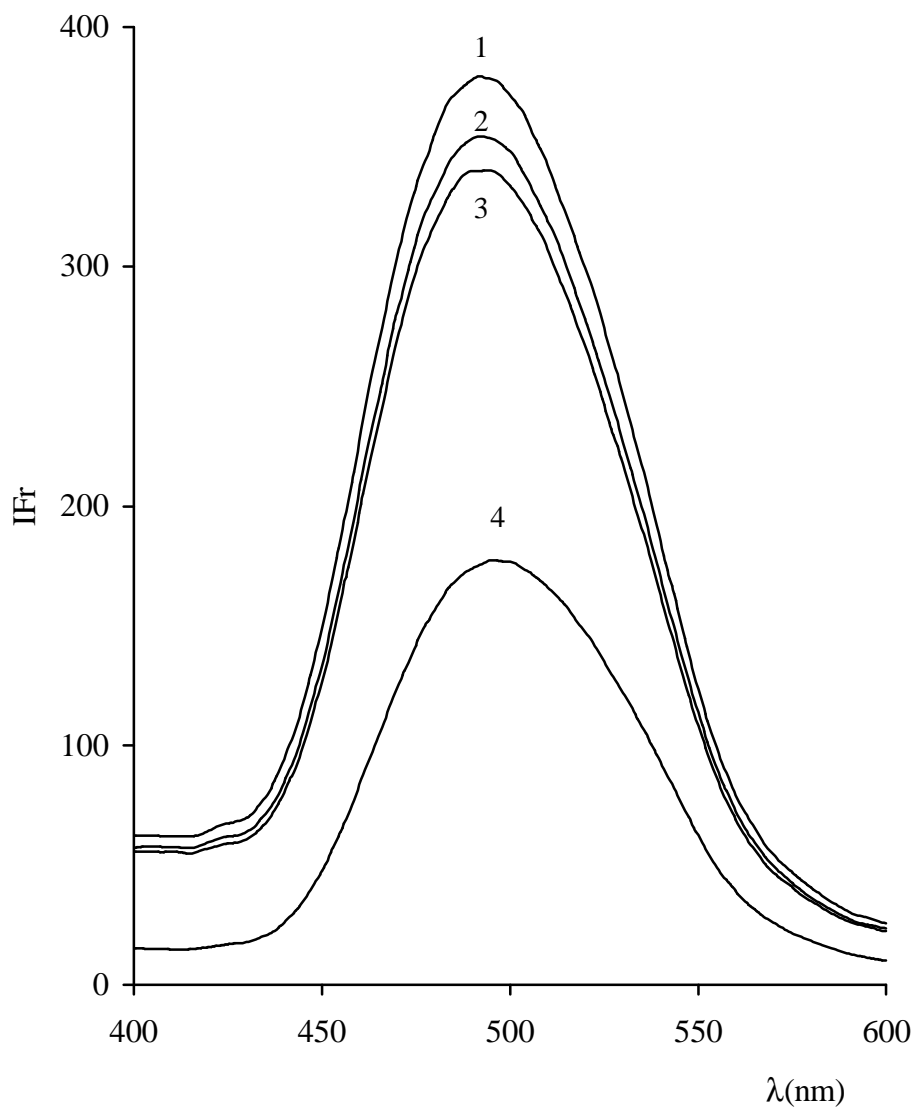


Figura IV.3- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de papel P-81. (1) Cadaverina, (2) Espermidina, (3) Espermina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μ g. λ_{exc} = 340 nm Rendijas: (10,5) nm

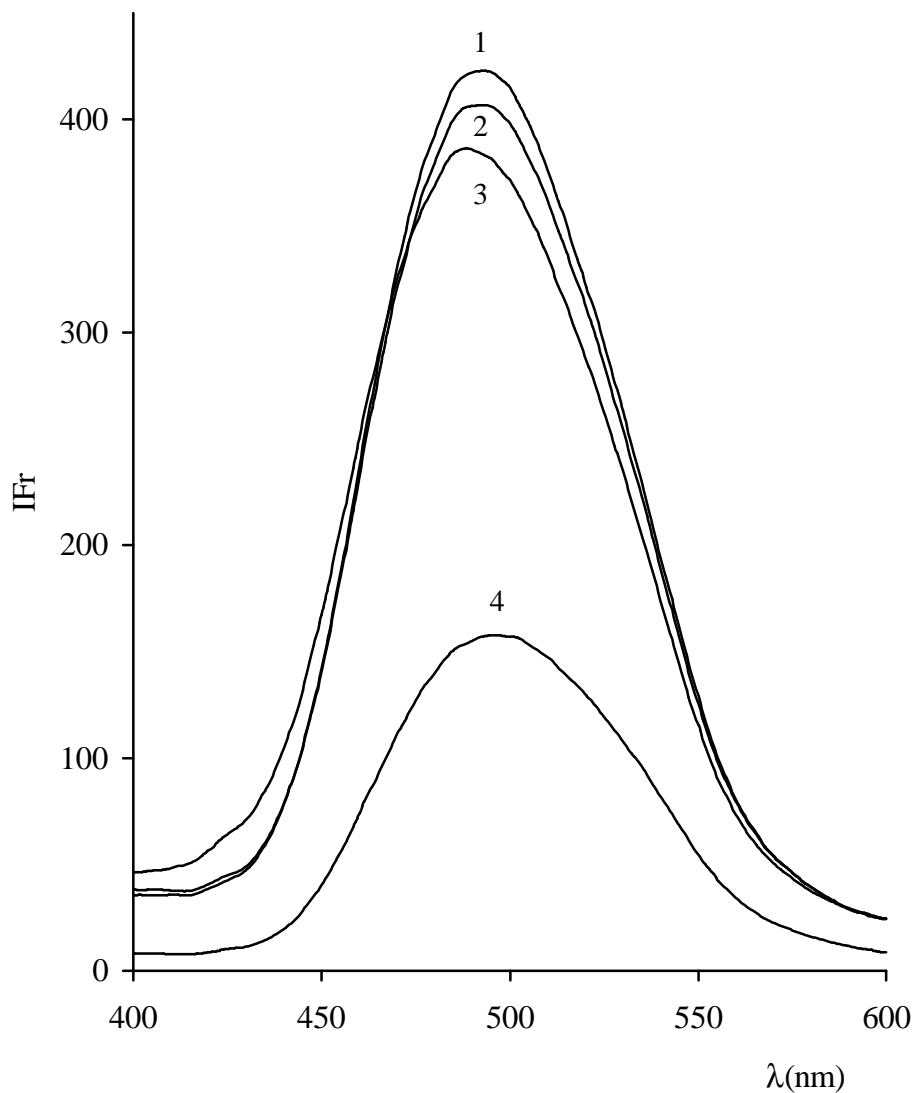


Figura IV.4.- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de papel DE-81. (1) Espermina, (2) Espermidina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μ g. λ_{exc} = 340 nm Rendijas: (10, 5) nm

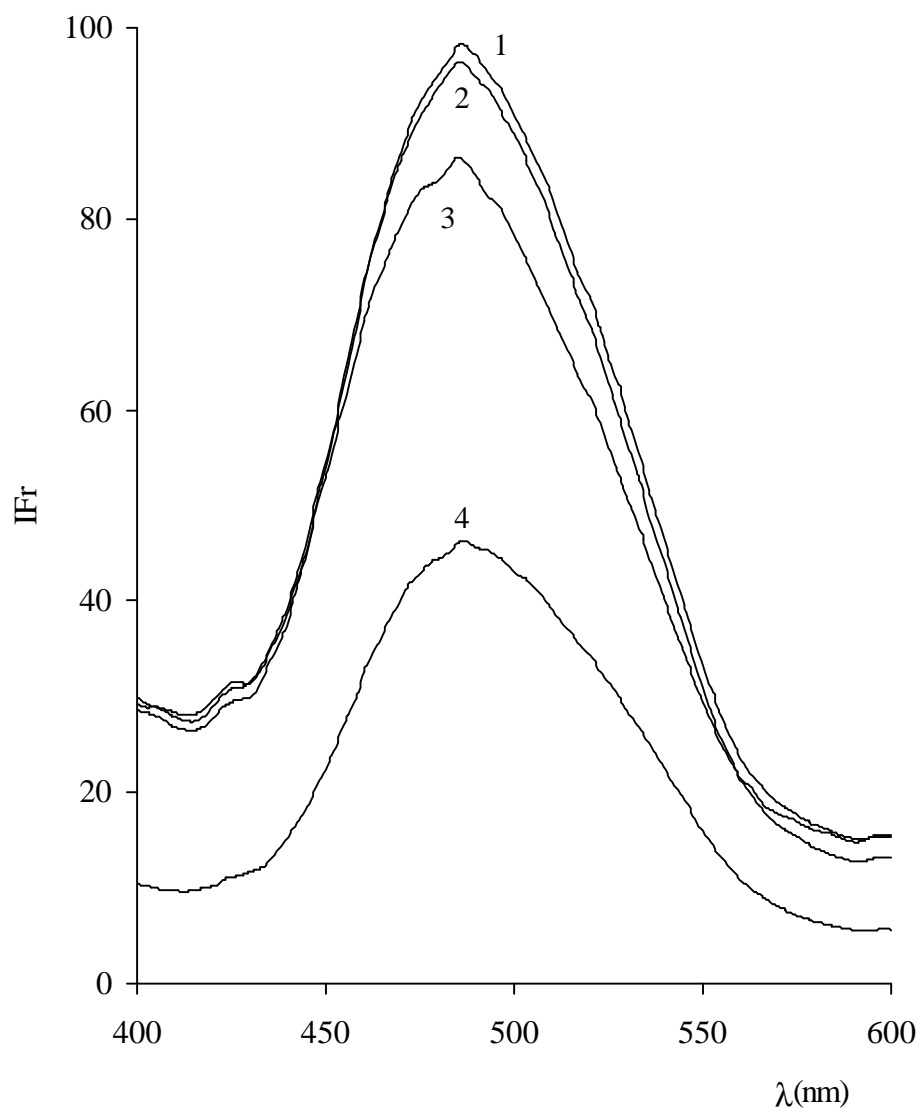


Figura IV.5.- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de sílice modificada C-18. (1) Espermidina, (2) Espermina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μ g
 λ_{exc} = 340 nm Rendijas: (10, 5) nm

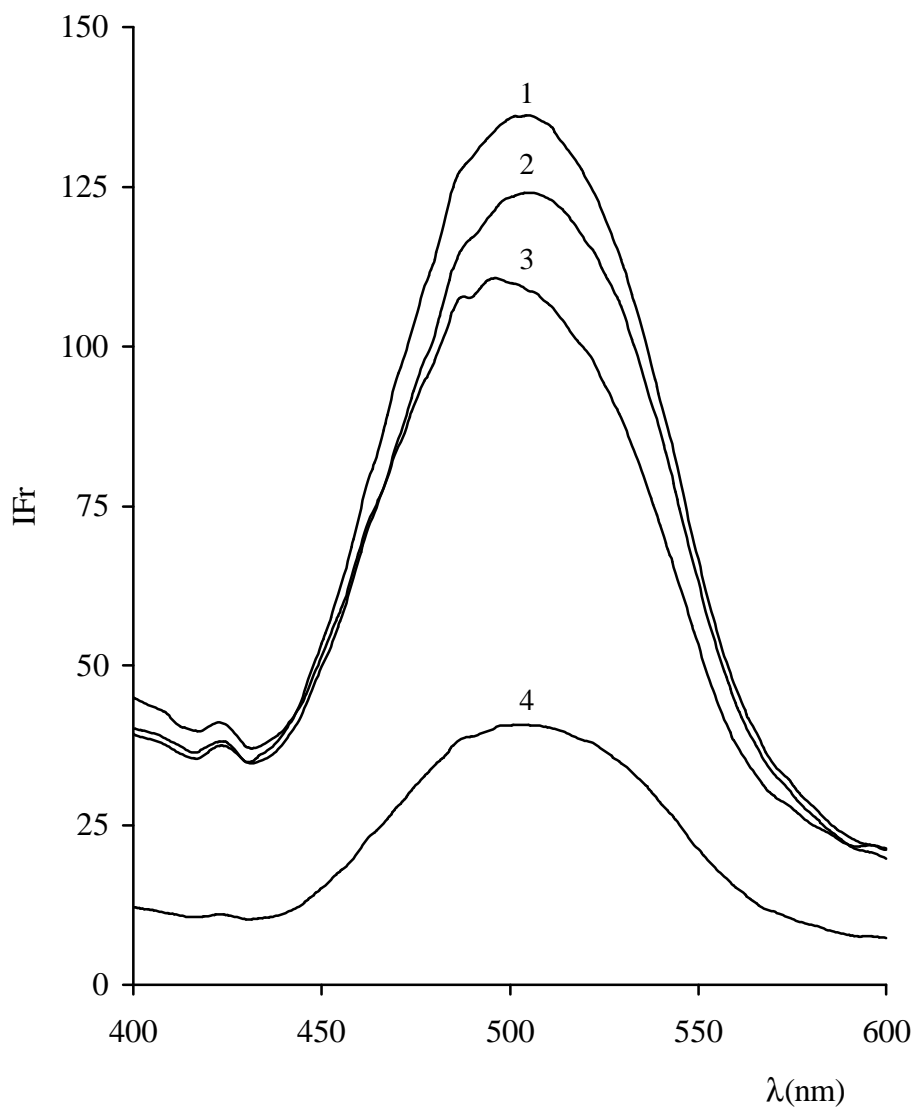


Figura IV.6.- Espectros de emisión de cada una de las poliaminas dansiladas sobre soporte de Gel de Sílice. (1) Espermina, (2) Espermidina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Cantidad de amina: 1 μg . $\lambda_{\text{exc}} = 340 \text{ nm}$ Rendijas: (10, 5) nm

Tabla IV.1.- Características espectrofluorimétricas de los derivados dansilados de poliaminas en diferentes superficies sólidas. $C_{\text{amina}} = 40 \text{ ng}$.
Rendijas 10 nm.

Soporte	Putrescina		Cadaverina		Espermidina		Espermina	
	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$	$I^{*,F}$	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$	$I^{*,F}$	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$	$I^{*,F}$	$\lambda_{\text{exc}}/\lambda_{\text{em}}$	$I^{*,F}$
Papel Whatman-41	340/497	144	340/494	322	340/494	344	340/496	346
Placa de Celulosa	340/497	94	340/491	284	340/494	321	340/493	296
Papel P-81	340/497	162	340/497	319	340/494	315	340/497	291
Papel DE-81	340/497	148	340/488	326	340/494	370	340/493	363
Placa de C-18	340/486	35	340/485	46	340/485	77	340/486,497	76
Placa de Gel de Sílice	340/497	25	340/495	86	340/504	92	340/502	105

$I^{*,F} = I_F$ corregida con el soporte

En cuanto al comportamiento de las poliaminas, los resultados indican que, en general, el derivado dansilado de la Putrescina es el que presenta menor intensidad de fluorescencia en todos los soportes estudiados, mientras que los derivados de las otras poliaminas, muestran un comportamiento similar entre sí, con sensibilidades considerablemente superiores a los de la Putrescina.

En lo que se refiere a las longitudes de onda de excitación y emisión, no se observan diferencias significativas entre los derivados dansilados, en los distintos soportes estudiados. Así, mientras que la longitud de onda de excitación no varía ni con el tipo de soporte ni de analito, la de emisión presenta un desplazamiento nm, únicamente en el caso del soporte de C-18. Asimismo, es en este soporte, en el que, en general, los distintos derivados presentan menor intensidad de fluorescencia.

Para llevar a cabo el estudio del comportamiento de los derivados dansilados en disolución, se efectúa una extracción de los mismos con HClO_4 (70 %) al 1% de Tolueno, medio en el que se encuentran dichos derivados, después de haber llevado a cabo la dansilación, tal como se describe en la Parte Experimental. Una alícuota del extracto acuoso se trata con disolución reguladora Borax-NaOH y se diluye para obtener la concentración de amina dansilada deseada (0.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$).

En medio acuoso, los derivados dansilados presentan un máximo de excitación a 338 nm y la longitud de onda de emisión es también prácticamente invariable para los cuatro derivados estudiados: 490 nm para la Putrescina y Cadaverina, y 492 nm para la Espermidina y Espermina. La Figura IV.7 , muestra los correspondientes espectros de emisión.

Si comparamos el comportamiento de los derivados dansilados de las poliaminas consideradas en medio acuoso y sobre superficies sólidas, podemos observar que no existen diferencias significativas entre los máximos de excitación y emisión. En lo que respecta a la intensidad de fluorescencia emitida, con la excepción de la Espermina, en medio acuoso, es la Putrescina la que presenta menor intensidad de fluorescencia, tanto en medio acuoso como sobre las superficies sólidas estudiadas.

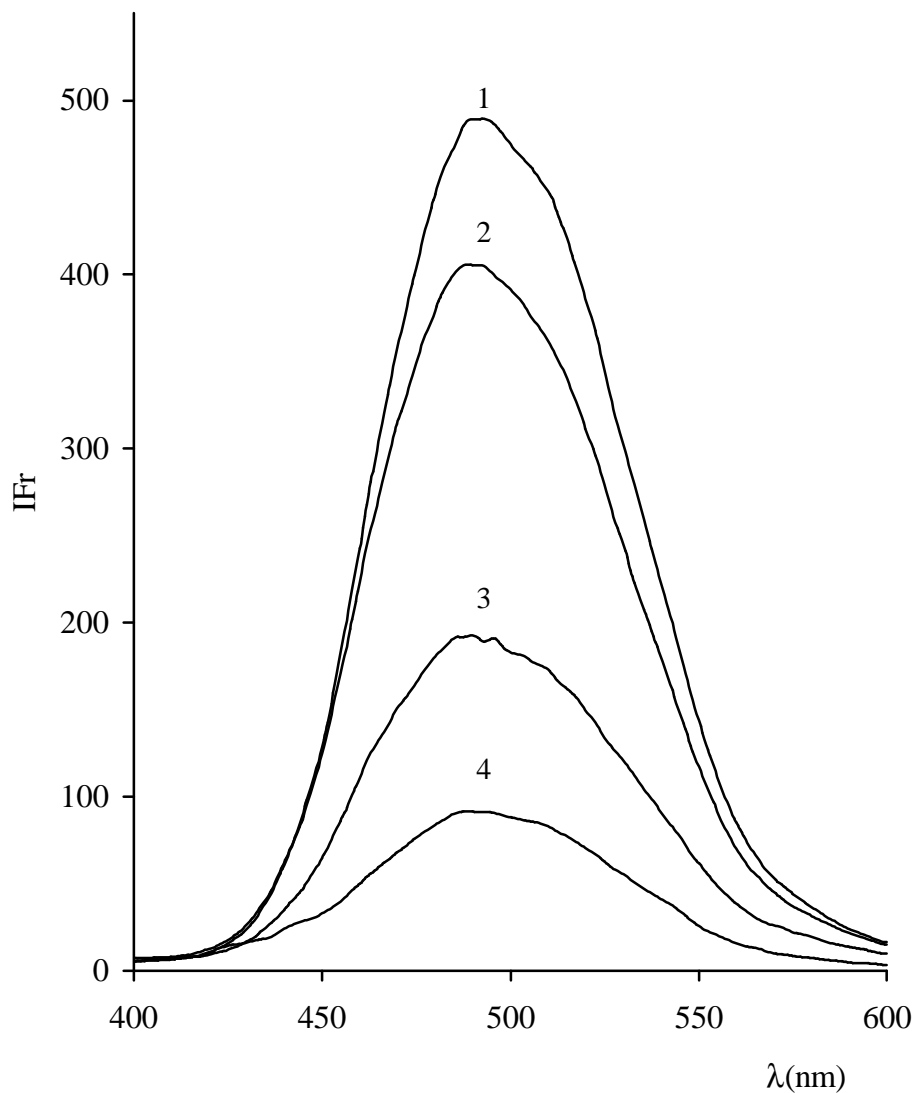


Figura IV.7.- Espectros de emisión en disolución de cada una de las poliaminas dansiladas . (1) Espermidina, (2) Cadaverina, (3) Putrescina y (4) Espermina. Cantidad de amina: 0.4 $\mu\text{g/ml}$. $\lambda_{\text{exc}} = 338 \text{ nm}$ Rendijas: 5 nm

IV.3.- SEPARACIONES CROMATOGRÁFICAS.

Con objeto de llevar a cabo la separación de los derivados dansilados de las poliaminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, se ensayaron diferentes sistemas de elución y distintas fases estacionarias.

Las primeras experiencias realizadas, pusieron de manifiesto la escasa reproducibilidad que suministraban las fases estacionarias constituidas por papel. Por tal motivo, se optó por emplear como soportes: placas de Celulosa, Gel de Sílice y C-18. Con cada uno de ellos se probaron diferentes fases móviles. Teniendo en cuenta los resultados encontrados por otros autores [217, 218], se ensayaron las mezclas: Tolueno:Trietilamina, Cloroformo:Acetato de Butilo, Tolueno:Etanol, Tolueno:Cloroformo y Cloroformo:Trietilamina, optimizando en cada caso la proporción de los disolventes.

Las mejores separaciones, en cuanto a resolución y eficacia, se han obtenido usando Gel de Sílice como fase estacionaria y Cloroformo:Trietilamina (TEA) en la proporción 2:1 (v:v) como fase móvil.

De acuerdo con los resultados obtenidos y tratando de obtener un método analítico aplicable a la cuantificación de varias poliaminas, se ha sacrificado la mayor sensibilidad alcanzada cuando se emplea Celulosa como fase estacionaria, en favor de una mejor separación. Un cromatograma representativo se encuentra en la Figura IV.8.

Una vez seleccionadas las fases móvil y estacionaria más apropiadas, para la separación y cuantificación de las dansilpoliaminas, se llevó a cabo un estudio de las propiedades cromatográficas más representativas de estos compuestos. Así, para determinar la reproducibilidad de los factores de retención, R_f , se llevaron a cabo siete eluciones de cada uno de los solutos en las condiciones experimentales expuestas. En la Tabla IV.2 se muestran los valores medios obtenidos, así como los parámetros estadísticos más representativos.

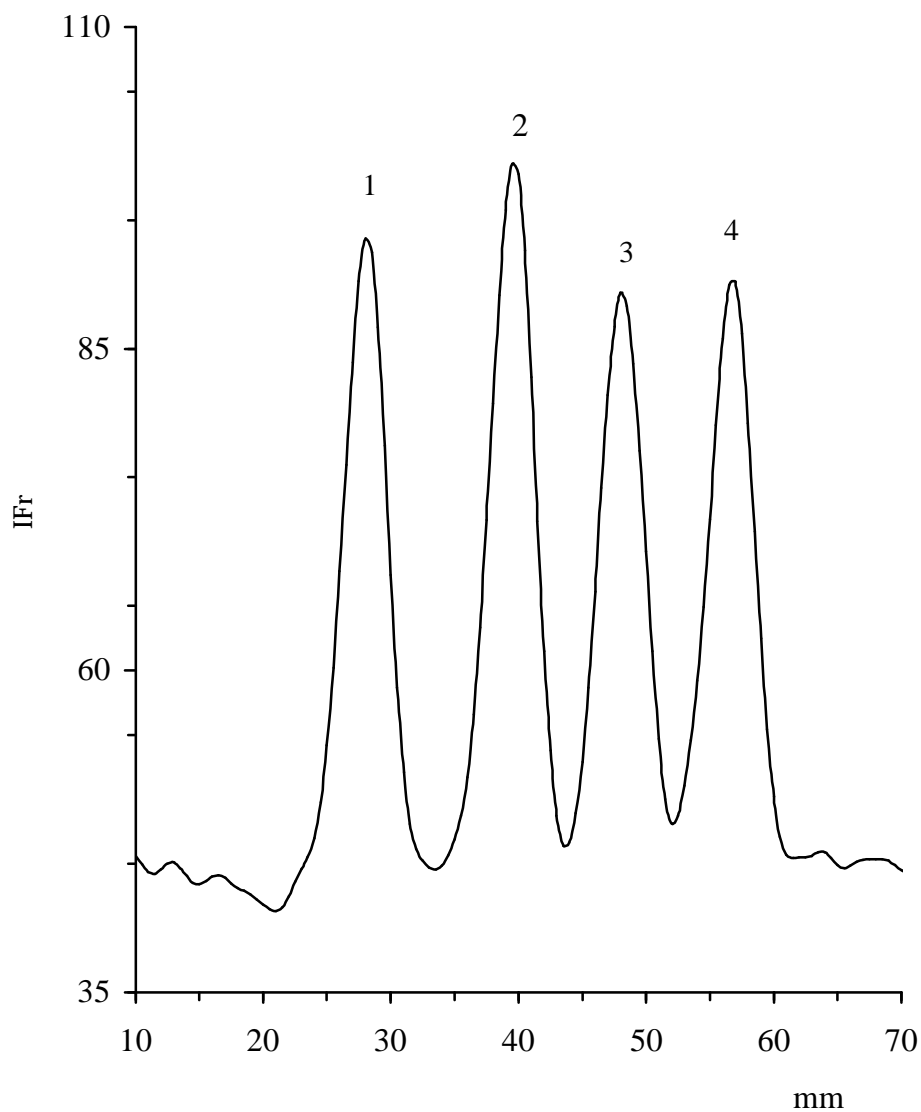


Figura IV.8.- Cromatograma de una mezcla de los derivados dansilados de las poliaminas: (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina. Elución con Cloroformo: TEA(2:1). Fase estacionaria: Gel de Sílice. Contenidos en aminas: 50 ng.

$\delta_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\delta_{em} = 502 \text{ nm}$ Rendijas: 10 mm

Con el sistema cromatográfico indicado, las desviaciones de los valores de R_f oscilan entre 0.017 para la Espermina y 0.030 para la Cadaverina y la Espermidina, para valores de R_f comprendidos entre 0.51 y 0.86.

Considerando una probabilidad de un 95%, la incertidumbre determinada para estos valores oscila entre ± 0.018 y ± 0.028 . Se encontraron Coeficientes de Variación de los R_f (CV) aceptables, dentro del rango comprendido entre 2.32% y 4.84% para la Espermina y la Cadaverina, respectivamente.

Asimismo, se evaluó la separación entre dos analitos consecutivos. Los valores obtenidos para las Resoluciones oscilan entre 2.4 and 3.0, lo que indica una buena separación entre los compuestos investigados.

Tabla IV.2.- Características cromatográficas de las poliaminas, separadas en una fase estacionaria de Gel de Sílice, con fase móvil de Cloroformo:TEA (2:1) (v:). Contenido de amina: 50 ng.

Amina	$R_f \pm I$	CV(%)	R_s
Putrescina	0.51 \pm 0.018	3.92	3
Cadaverina	0.62 \pm 0.028	4.84	3
Espermidina	0.72 \pm 0.028	4.17	2.4
Espermina	0.86 \pm 0.018	2.32	

Una de las ventajas de la utilización de un sistema de detección fluorescente equipado con fibra óptica es el poder obtener imágenes tridimensionales, así como mapas de contorno, de una manera fácil y rutinaria, disminuyendo los errores en la determinación de la posición de la mancha de un determinado analito, sobre la placa.

cromatogramas tridimensionales, se hace uso de un programa de la aplicación "OBEY", del software "Fluorescence Data Manager". Este programa permite la recogida sucesiva del número deseado de cromatogramas a lo largo del eje Y, con incrementos de X de 1 mm, a las longitudes de onda de excitación y emisión seleccionadas. Los datos de estos cromatogramas se usan como una entrada en un programa comercial denominado "SURFER", que representa los cromatogramas tridimensionales y sus correspondientes mapas de contorno.

La Figura IV.9 muestra los cromatogramas tridimensionales y sus respectivos mapas de contorno, de una mezcla de derivados dansilados de las poliaminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, en el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 100 ng, para cada una de las aminas.

Como puede observarse, los distintos derivados muestran anchos de pico muy similares y los perfiles de concentración de las manchas de las sustancias separadas presentan distribuciones aproximadamente gaussianas. En este sentido, la medida de la intensidad de fluorescencia en el máximo, o altura de pico, en el centro de la mancha, es proporcional a la concentración de sustancia.

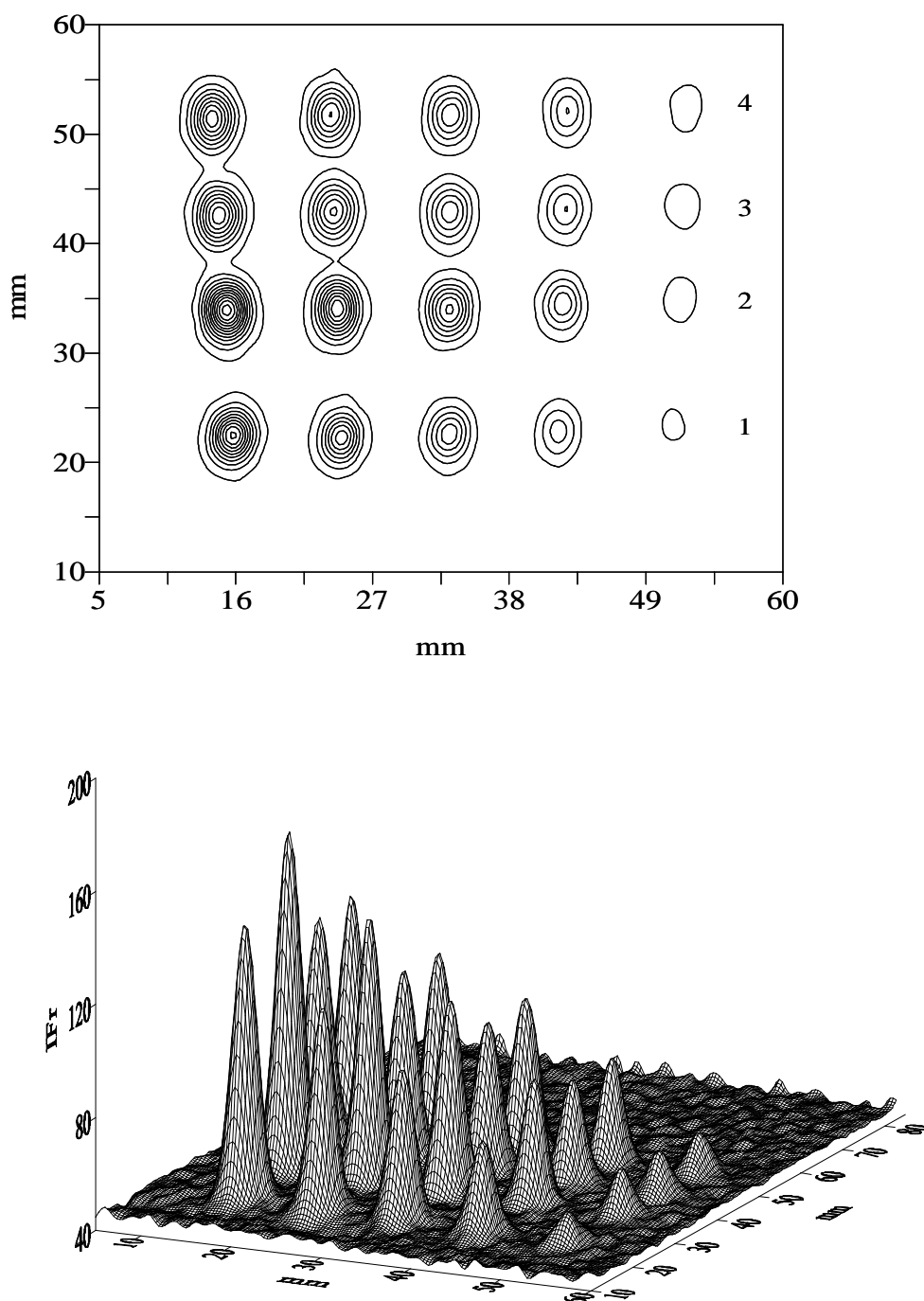


Figura IV.9.- Cromatogramas tridimensionales y sus respectivos mapas de contorno, registrados a $\lambda_{exc}=338\text{ nm}$ $\lambda_{em}=502\text{ nm}$ de una mezcla de derivados dansilados de (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina, después de su elución con Cloroformo:Trietilamina (2:1), en cantidades comprendidas entre 10 y 100 ng. Rendijas: 10 nm.

IV.4.- RELACIÓN SEÑAL/RUIDO

Como hemos comentado anteriormente, las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas están influenciadas en gran medida por el ruido de fondo. Por ello, es importante estudiar cómo afecta el soporte y el sistema de medida a la determinación de poliaminas dansiladas separadas por Cromatografía Líquida en Capa Fina de Alta Eficacia.

La variabilidad en la señal puede ser atribuida a diferentes fuentes, tales como la falta de reproducibilidad en la aplicación de las muestras, las condiciones en el soporte de la muestra inyectada. Por otra parte, la emisión de la fase estacionaria a la longitud de onda seleccionada, hace que la detección se halle limitada por la magnitud de la relación entre la señal y el ruido de fondo.

Para realizar el estudio de la influencia del sistema cromatográfico empleado en la señal emitida por las dansilpoliaminas, se efectuaron medidas de la fluorescencia emitida, registradas como altura de pico, para cada una de las poliaminas, después de realizada la elución. Los datos obtenidos para la intensidad de la fluorescencia emitida por siete muestras de las poliaminas dansiladas, así como por el soporte, se muestran en la Tabla IV.3.

Para el cálculo de la señal atribuible a cada amina, al valor de la intensidad de fluorescencia total medida para el derivado dansilado, se resta la señal emitida por el propio soporte, considerado como blanco.

Para el cálculo de las relaciones Señal/Ruido (S/N), correspondientes a cada una de las medidas, se ha empleado la expresión comentada en el Capítulo II. Para los cálculos a realizar, se ha tomado para E_b y S_b los valores 200, y 2.07, respectivamente, de acuerdo con los datos agrupados en la Tabla IV.3. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV.4. Puede observarse que, para todas las poliaminas estudiadas, se encuentran valores de la relación S/N

Espermina la que presenta la relación más favorable.

Tabla IV.3.- Intensidades de fluorescencia de las poliaminas dansiladas. Fase móvil: Cloroformo:Trietilamina (2:1) (v:v). Fase estacionaria: Gel de Sílice. $C_{\text{amina}} = 30 \text{ ng}$. Rendijas: 10 nm.

Experiencia (n°)	Muestras / Intensidades de Fluorescencia				
	Blanco	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
	202	312	314	318	325
	199	313	312	319	325
	198	312	316	319	326
	197	312	313	317	326
	202	314	312	320	327
	199	312	315	319	327
	203	312	313	318	325
Media	200.00	312.43	313.57	318.57	325.86

Tabla IV.4.- Relaciones S/N para la determinación de 30 ng de cada amina después de su elución con Cloroformo : Trietilamina (2:1) (v:v). Soporte: Gel de Sílice. Rendijas: 10 nm.

Poliaminas	Señales corregidas E_s	Desviaciones estándar S_s	Relaciones S/N
Putrescina	112.43	0.787	39.33
Cadaverina	113.57	1.512	36.21
Espermidina	118.75	1.035	40.44
Espermina	125.86	0.899	43.53

IV.5.-CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS .

Como en otras técnicas cromatográficas, el análisis cuantitativo en HPTLC se basa en la medida del tamaño de pico y la calibración del sistema de detección. En nuestro caso, se ha hecho uso de las medidas de altura de pico y el método del patrón externo.

Las primeras experiencias realizadas para establecer las curvas de calibrado correspondientes a los derivados dansilados de las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, pusieron de manifiesto que la relación entre la intensidad de la fluorescencia medida y la cantidad de analito presente en las placas cromatográficas, no corresponde siempre a una función lineal. Por tal motivo, se tomaron algunas precauciones al planificar las experiencias encaminadas a establecer dicha relación.

En atención a lo expuesto, para obtener las curvas de calibrado correspondientes

a cada una de las cuatro poliaminas, se ha procedido, en primer lugar, a dansilar ocho disoluciones que contenían mezclas de las mismas, con cantidades comprendidas entre 0 y 150 ng. Después de inyectar las respectivas disoluciones sobre el soporte de Gel de elución con la fase móvil Cloroformo :Trietilamina (2:1). El proceso de inyección/elución, se ha repetido tres veces con cada una de las disoluciones.

Las señales obtenidas para cada uno de los compuestos separados fue registrada como altura de pico. Después de corregir la señal correspondiente al soporte, se procedió a representar las intensidades de fluorescencia obtenidas frente a las cantidades de amina inyectadas. La Figura IV.10 constituye un ejemplo representativo. Puede observarse que, en lugar de relaciones lineales, se obtienen representaciones que presentan desviaciones hacia el eje de las X, para concentraciones altas de las poliaminas. De acuerdo con otros autores, entendemos que este hecho debe atribuirse a fenómenos de autoquenching [219].

Los resultados comentados aconsejaron profundizar en el estudio de las curvas de calibrado obtenidas y, en concreto, en el tipo de ajuste que mejor representa la relación entre la señal fluorescente emitida y la cantidad de analito presente, al trabajar sobre soportes sólidos. Dicho estudio constituye el Capítulo VII de la presente Memoria. En el caso que nos ocupa, referido a la determinación de poliaminas, en forma de derivados dansilados, sobre placas de Gel de Sílice como fase estacionaria, usando Cloroformo: Trietilamina (2:1) (v:v) como eluyente, es una función polinómica de segundo grado la que mejor se ajusta a los datos experimentales.

Las ecuaciones de regresión para las poliaminas estudiadas se muestran en la Tabla IV.5. En todos los casos se obtienen coeficientes de correlación superiores a 0.998. Por otra parte, el análisis de varianza nos permite afirmar que para cada uno de los derivados dansilados, más del 99.7% de los datos pueden ser explicados por el ajuste propuesto, con un intervalo de confianza del 95%.

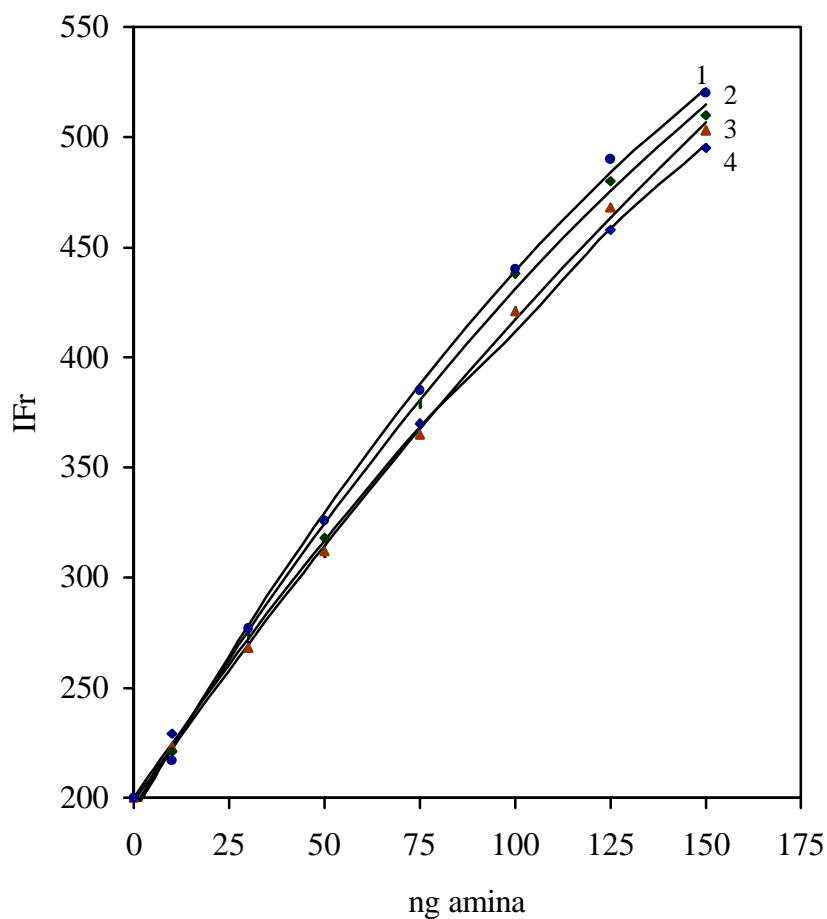


Figura IV.10.- Curvas de calibrado de los derivados dansilados de (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina, después de su elución con Cloroformo:TEA (2:1) (v:v), en una fase estacionaria de Gel de Sílice.

$\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 502 \text{ nm}$ Rendijas:10 nm

Tabla IV.5.- Datos de regresión para la calibración. Determinación de poliaminas por HPTLC. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Fase móvil: Cloroformo: Trietilamina (2:1) (v:v)

Amina	Curva de Calibración	r^2	$S_{y/x}$
Putrescina	$Y=(200.03\pm 3.24)+(2.512\pm 0.111)X-$ $(0.0036\pm 0.0007)X^2$	0.999	4.364
Cadaverina	$Y=(198.18\pm 2.666)+(2.460\pm 0.092)X-$ $(0.0027\pm 0.0006)X^2$	0.999	3.595
Espermidina	$Y=(195.35\pm 4.21)+(2.813\pm 0.144)X-$ $(0.004\pm 0.0009)X^2$	0.998	5.677
Espermina	$Y=(192.87\pm 6.07)+(3.001\pm 0.208)X-$ $(0.0054\pm 0.0014)X^2$	0.997	8.181

Con objeto de establecer la validez del método establecido, para la determinación de las cuatro poliaminas, se eluyeron siete mezclas iguales, que contenían 30 ng de cada amina. Como resultado de la cuantificación se obtuvieron errores relativos de 0.69, 1.29, 0.80 y 0.72% para la Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, respectivamente, con un nivel de confianza del 95%.

En la Tabla IV.6 se muestran los parámetros de calidad más representativos del método analítico establecido.

Los coeficientes de variación, relativamente pequeños, oscilan entre 0.75 y 1.39, para la Putrescina y la Cadaverina respectivamente. Los límites de detección, obtenidos como la concentración cuya señal corresponde al valor medio del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco, son comparables a los obtenidos por otras técnicas cromatográficas [218, 220-221] y están comprendidos 1.80 y 2.99 ng.

Tabla IV.6.- Determinación de poliaminas por HPTLC. Parámetros de calidad del método analítico. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Fase móvil: Cloroformo: Trietilamina (2:1) (v:v)

Amina	LD(ng)	S _M	CV(%)
Putrescina	1.80	0.20	0.75
Cadaverina	2.38	0.40	1.39
Espermidina	2.63	0.23	0.86
Espermina	2.99	0.21	0.78

IV.6.- DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS EN TEJIDOS VEGETALES.

Se ha aplicado el método propuesto, a la determinación de poliaminas en tejidos de fruto de plátano cultivados “in vitro” en un medio de Murashige y Skoog’s [214]. Las muestras, sometidas a diferentes tratamientos, que incluyen la adición de inhibidores de la biosíntesis de poliaminas, según se ha descrito en la Parte Experimental, fueron dansiladas y posteriormente eluidas y cuantificadas de acuerdo con el método propuesto.

Con objeto de validar los resultados obtenidos, se llevó a cabo la separación y cuantificación de los derivados dansilados de las poliaminas por HPLC, usando como fase móvil una mezcla Acetonitrilo-Agua, en régimen de gradiente y detección UV, según el

método descrito en el Capítulo III.

En la Tabla IV.7 se muestran los resultados obtenidos, por ambas técnicas, para la Putrescina y Espermidina, encontrándose gran concordancia entre ambos resultados. No se ha encontrado Cadaverina en ninguna de las cuatro muestras estudiadas. Por otra parte, resulta difícil la cuantificación de Espermina en este tipo de muestras, debido a la interferencia de otras sustancias presentes en las mismas, que presentan un comportamiento cromatográfico similar al de las poliaminas en estudio. Los resultados obtenidos representan el valor medio de, al menos, tres determinaciones.

La Figura IV.11 presenta un cromatograma de separación de una muestra vegetal en las condiciones experimentales mencionadas.

Tabla IV.7.- Determinación de poliaminas en tejidos de plantas. Resultados obtenidos por HPTLC y HPLC. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Fase móvil: Cloroformo: Trietilamina (2:1) (v:v)

Muestra	Putrescina (g/g)		Espermidina (g/g)	
	HPTLC	HPLC	HPTLC	HPLC
1	309.72	286.52	22.63	24.17
2	307.98	251.14	24.74	23.83
3	414.70	461.10	32.55	36.31
4	504.02	506.34	37.51	40.41

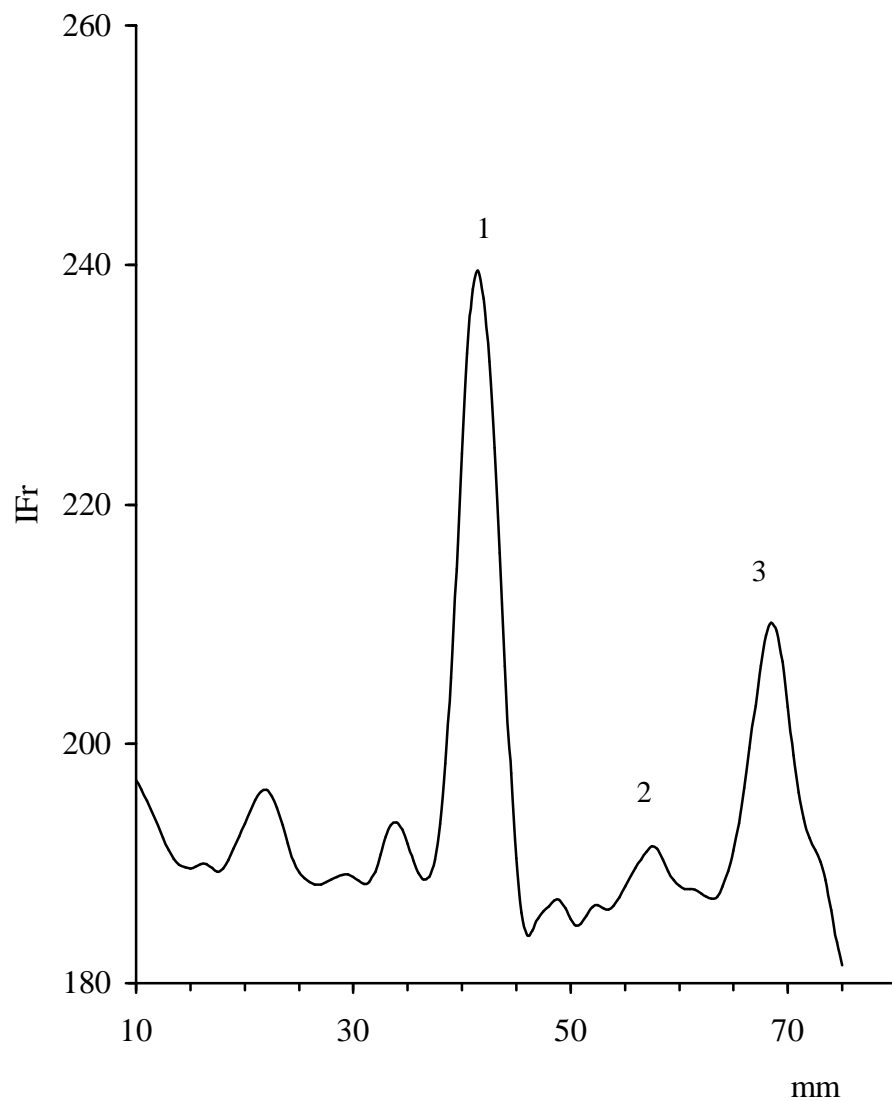


Figura IV.11.- Cromatograma de una muestra vegetal (2) enriquecida con 50 ng de cada uno de los derivados dansilados de: (1) Putrescina, (2) Cadaverina y (3) Espermidina. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Elución con Cloroformo:TEA (2:1). $\lambda_{exc}= 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 502 \text{ nm}$ Rendijas:10 nm

Capítulo 5
DETERMINACIÓN DE AMINAS
BIOGÉNICAS POR CROMATOGRAFÍA EN
CAPA FINA DE ALTA RESOLUCIÓN.
EFEECTO DE LA PRESENCIA DE
SURFACTANTES NOIÓNICOS COMO
ADITIVOS EN LA FASE MÓVIL

V.1.- INTRODUCCIÓN.

En las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas, la señal que llega al detector consiste en una señal de fondo superpuesta a la fluorescencia emitida por los componentes de la muestra. De aquí, que la habilidad del sistema para detectar y medir la emisión de la muestra, es limitada por la magnitud de la señal de fondo y el ruido. La señal de fondo es generalmente elevada, por la gran cantidad de radiación dispersada.

Cambios ambientales en los compuestos fluorescentes adsorbidos en superficies sólidas pueden afectar la eficacia cuántica. La presencia de medios organizados, como los conseguidos por adición de surfactantes o ciclodextrinas, puede traer consigo cambios en el entorno molecular de los compuestos adsorbidos sobre superficies sólidas, incrementando la fluorescencia de los compuestos cromatografiados y, de esta forma, es posible aumentar la relación señal/ruido.

Recientemente, ha comenzado a despertar interés la utilización de medios micelares y ciclodextrinas en conexión con separaciones y/o cuantificaciones por TLC.

En tal sentido, los surfactantes han sido empleados como fases móviles [170, 222-223], o bien se incorporan surfactantes a la fase estacionaria después de completarse la separación de analitos, con objeto de aumentar la intensidad de la fluorescencia emitida [224-225].

Las fases móviles constituidas por disoluciones micelares o de ciclodextrinas, presentan varias ventajas sobre las fases móviles tradicionales, formadas por disolventes orgánicos puros o mezclas de ellos [226-227]. Por ejemplo:

- Algunas separaciones son mejores, por la mayor selectividad de las micelas o ciclodextrinas para muchos compuestos.
-

- Los surfactantes y ciclodextrinas son relativamente inócuos.
- Compuestos hidrofílicos e hidrófobos pueden cromatografiarse simultáneamente.
- Puede mejorarse la detección luminiscente, puesto que muchos compuestos presentan un aumento de la fluorescencia y, en ciertos casos, de fosforescencia.

Por otra parte, algunos surfactantes como el Triton X-100 han sido usado para aumentar la fluorescencia de compuestos separados por TLC, mediante un tratamiento post-cromatográfico, por inmersión de la placa en Triton X-100:Cloroformo (1:4) (v:v) [169, 170]. Así se han llegado a conseguir aumentos de fluorescencia con un factor de 90.

Poco se conoce acerca de las bases físico-químicas de este incremento de fluorescencia. Se asume [171], que cuando la placa se sumerge en un disolvente no volátil, el compuesto adsorbido pasa a la fase líquida, produciéndose una organización molecular que incrementa la fluorescencia.

En este Capítulo se estudia el efecto de la adición de surfactantes no iónicos a las fases móviles, en la separación de derivados dansilados de poliaminas por HPTLC, en la retención de los derivados y en sus características fluorimétricas, utilizando como fase estacionaria gel de sílice y como fase móvil Cloroformo:Trietilamina (2:1) (v:v), tal como hemos descrito en el capítulo anterior.

La incorporación de surfactantes a la fase móvil, debe aportar ventajas sustanciales a la metodología discontinua descrita anteriormente, basada en la inmersión de la placa en un medio micelar, no solo por suponer una disminución importante del tiempo de análisis, sino por evitar los problemas relacionados con la homogeneidad del sustrato que suelen presentarse en el tratamiento post-cromatográfico.

V.2.- SENSIBILIZACIÓN DE LA FLUORESCENCIA EMITIDA POR LOS DERIVADOS DANSILADOS DE POLIAMINAS.

En el Capítulo anterior se ha descrito la separación de las poliaminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina por HPTLC, utilizando Cloroformo:Trietilamina (2:1) (v:v) como fase móvil y Gel de Sílice como fase estacionaria. La cuantificación de los analitos se lleva a cabo con detección fluorescente, haciendo uso de un espectrofluorímetro equipado con fibra óptica.

Sin embargo, según se puso de manifiesto, la habilidad del sistema para detectar y medir la emisión de la muestra, se encuentra limitada por la magnitud de la señal de fondo y el ruido.

Con objeto de incrementar la fluorescencia de los compuestos cromatografiados y, de esta forma, aumentar la relación señal/ruido, se han utilizado surfactantes no iónicos como aditivos a la fase móvil. De los tres surfactantes utilizados: Triton X-100, POLE y Brij 78, los mejores resultados se han obtenido con los dos últimos.

La intensidad de la fluorescencia emitida por los derivados dansilados de las poliaminas adsorbidos en Gel de Sílice, aumenta cuando lo hace la concentración de surfactante en la fase móvil, alcanzando un valor máximo para una concentración de surfactante del 5% (m:v), por encima de la cual no se producen incrementos significativos de la fluorescencia. La Figura V.1 muestra los resultados obtenidos con los derivados dansilados de las poliaminas estudiadas y los surfactantes seleccionados.

Desde un punto de vista analítico, es de interés cuantificar, mediante parámetros representativos, la influencia de variables experimentales, como el contenido en surfactantes, sobre la fluorescencia de los compuestos estudiados. En la Tabla V.1 se comparan las longitudes de onda máximas de los derivados dansilados sobre sustrato de Gel de Sílice, después de ser eluidos con una fase móvil que no contiene surfactante, con los obtenidos después de efectuar el desarrollo con la misma fase móvil a la que se han añadido concentraciones variables de POLE o Brij 78. En presencia de surfactante, los

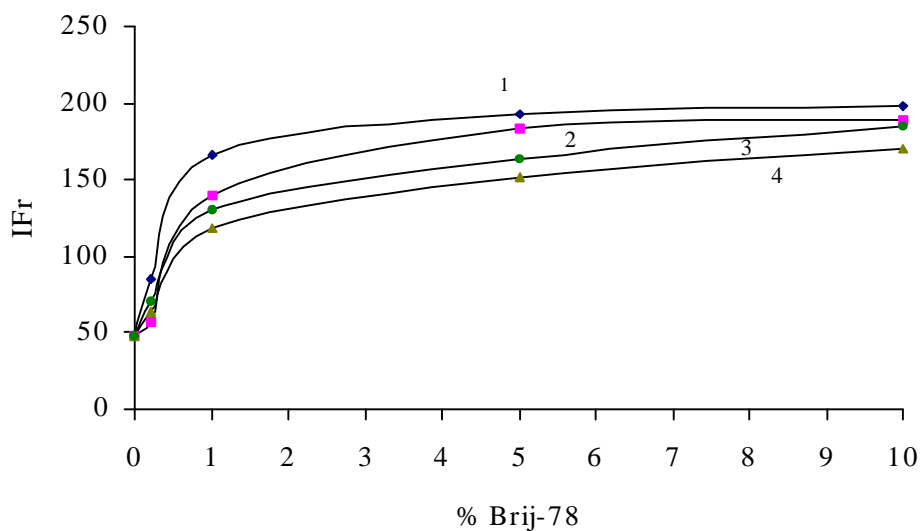
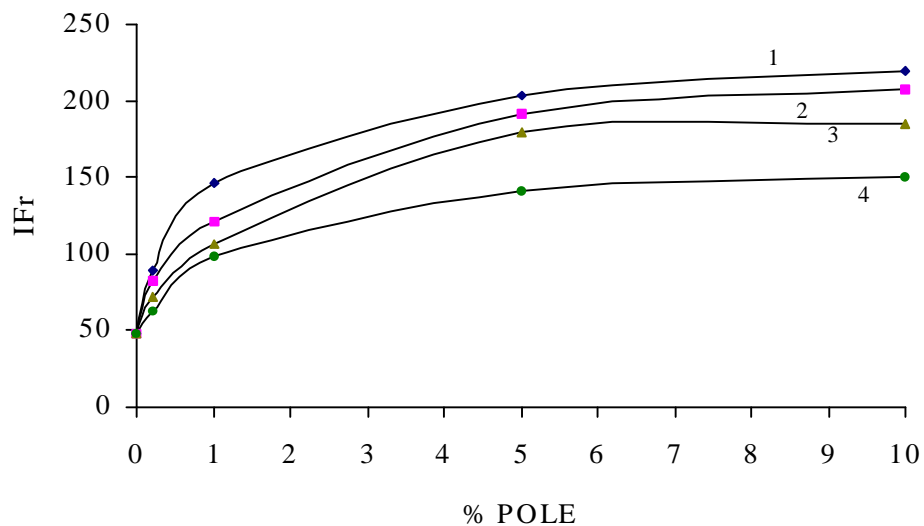


Figura V.1.- Efecto del contenido de surfactantes en la fase móvil, sobre la intensidad de la fluorescencia emitida por los derivados dansilados de: (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina.

Tabla V.1. Variación de las longitudes de onda de emisión máxima de los derivados dansilados de las poliaminas eluidos con Cloroformo: Trietilamina, con y sin adición de surfactante. Fase estacionaria: Gel de Sílice. $\lambda_{exc} = 338$ y 340 nm, en presencia y ausencia de surfactante, respectivamente. $C_{amina} = 30$ ng.

$C_{Surfactante}$ (% m:v)	Putrescina		Cadaverina		Espermidina		Espermina	
	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78
0	497		495		504		502	
0.2	497	501	501	502	497	500	501	500
1.0	498	500	505	507	500	500	503	501
5.0	505	507	504	507	507	505	506	507
10	509	509	507	506	507	505	509	509

valores de δ_{em} son similares para los diferentes derivados dansilados y ligeramente mayores que los obtenidos en ausencia de surfactante.

Un incremento en la concentración de POLE o Brij 78 en la fase móvil, trae consigo pequeños desplazamientos hipsocrómicos para la δ_{exc} y batocrómicos para la δ_{em} . Los resultados obtenidos muestran que los desplazamientos para la δ_{em} son del orden de 1 nm, para un aumento del 1% en la concentración de surfactante.

En las Figuras V.2 y V.3 se representan los espectros de emisión sobre Gel de Sílice, para cada uno de los derivados dansilados, después de ser eluidos con una fase móvil conteniendo un 5% de POLE o Brij 78, respectivamente.

Con objeto de cuantificar los aumentos de fluorescencia que los derivados dansilados experimentan en presencia de surfactante, hemos introducido el factor de sensibilización, FS, definido como:

$$FS(\%) = (b_s / b_a) \cdot 100$$

donde b_s y b_a son las pendientes de los tramos lineales de las gráficas de calibración, obtenidas en presencia y ausencia de surfactante, respectivamente.

Los valores de FS encontrados para cada uno de los derivados dansilados se encuentran en la Tabla V.2. Con ambos surfactantes, el valor máximo de FS corresponde a la Putrescina. Entre los surfactantes usados, los mayores incrementos de fluorescencia son obtenidos, en la mayor parte de casos, con el POLE.

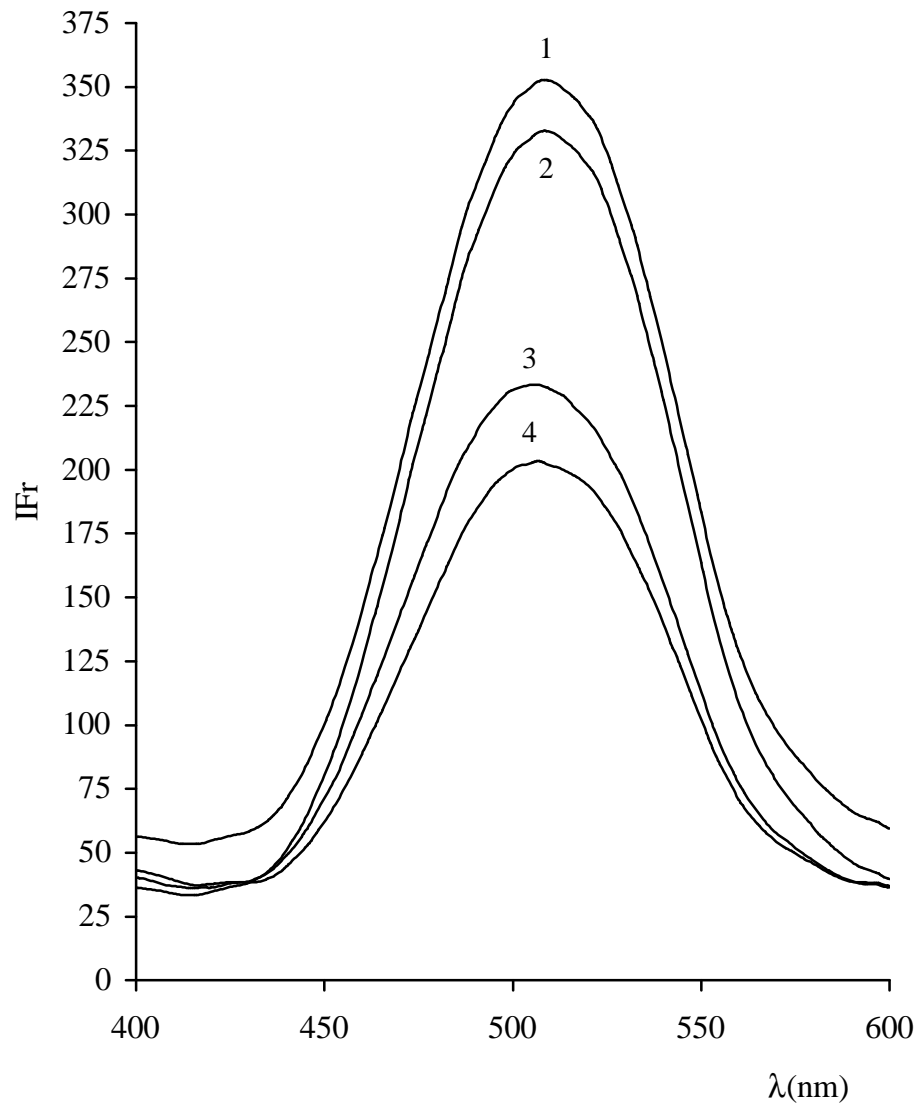


Figura V.2.- Espectros de emisión de las poliaminas, sobre soporte de Gel de Sílice, después de su elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%) (v:v:m). (1) Espermina, (2) Espermidina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Contenido en las aminas: 30 μ g
 $\lambda_{exc}= 340$ nm Rendijas:(10, 5) nm

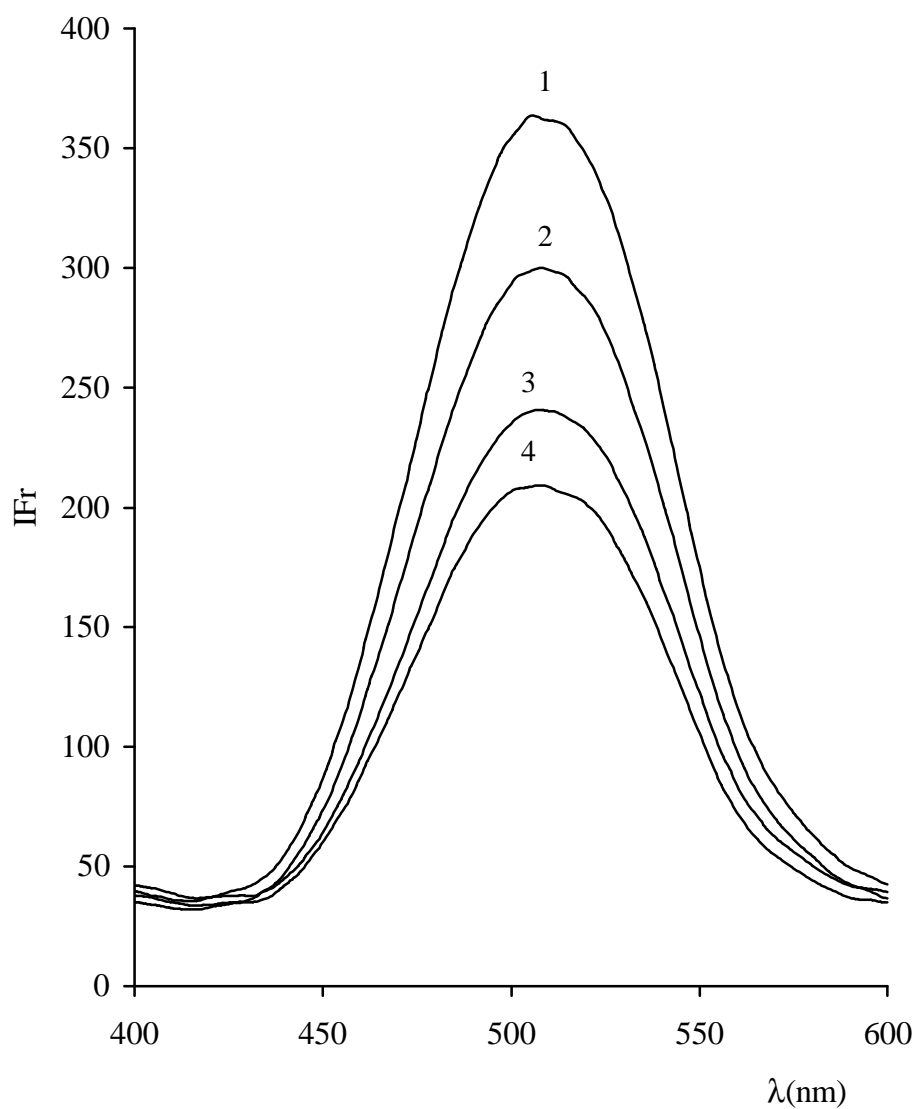


Figura V.3.- Espectros de emisión de las poliaminas, sobre soporte de Gel de Sílice, después de su elución con Cloroformo:Trietilamina:Brij-78 (8:4:5%) (v:v:m). (1) Espermina, (2) Espermidina, (3) Cadaverina y (4) Putrescina. Contenido en aminas: 30 μ g
 λ_{exc} = 340 nm Rendijas:(10, 5) nm

Tabla V.2. Variación de los valores de FS, expresados en %, con la concentración de surfactante añadido a la fase móvil, de Cloroformo:TEA (2:1).

$C_{\text{surfactante}}$ (%) (m:v)	Putrescina		Cadaverina		Espermidina		Espermina	
	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78
0.2	314	295	278	202	290	232	189	246
1.0	402	578	374	282	372	270	312	258
5.0	712	671	645	622	473	437	407	328
10.0	775	688	685	643	510	448	450	370

V.3.- EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SURFACTANTE EN LOS PROCESOS DE RETENCIÓN.

De igual forma que la presencia de surfactantes ejerce una influencia importante en los procesos de emisión de fluorescencia, también pueden afectar a las separaciones cromatográficas, como consecuencia de las interacciones soluto-surfactante que se producen, así como las que ocurren entre el surfactante y la fase estacionaria.

En efecto, las experiencias realizadas ponen de manifiesto que, en general, un incremento en la concentración de surfactante en la fase móvil, supone un aumento de los valores de R_f , aunque las diferencias que se producen no son grandes. Excepto en el caso de la Putrescina, los valores de R_f de los restantes derivados dansilados de las poliaminas muestran modificaciones que pueden ser equiparables a las originadas por errores experimentales. La Tabla V.3 recoge los valores de R_f , para cada una de las poliaminas estudiadas, para diferentes concentraciones de surfactante en la fase móvil.

De acuerdo con los resultados obtenidos, puede admitirse que el comportamiento de los dos surfactantes es similar. No obstante, al tener en cuenta que los mayores incrementos de fluorescencia se obtienen al emplear POLE, los siguientes estudios se han llevado a cabo utilizando como aditivo de la fase móvil dicho surfactante, a una concentración del 5% (m:v).

Para la evaluación estadística de los valores de R_f , se llevaron a cabo siete eluciones de cada uno de los solutos sobre Gel de Sílice, utilizando la fase móvil seleccionada. Los resultados encontrados para cada una de las poliaminas, agrupados en la Tabla V.4, muestran que la incertidumbre en los valores de R_f no supera en ningún caso las dos centésimas. Las desviaciones estándar relativas muestran que la dispersión de los resultados se encuentran entre 1.61 y 3.82%, menores que las obtenidas en ausencia de surfactante, que como hemos visto oscilaban entre 2.32 y 4.84%.

Por otra parte, se calculó el poder de resolución del sistema cromatográfico empleado. Los valores obtenidos, recogidos en la Tabla V.5, se encuentran comprendidos

Tabla V.3 .- Variación de los valores de R_f con la concentración de surfactante en la fase móvil.

C_{POLE} (% m/v)	Putrescina		Cadaverina		Espermidina		Espermina	
	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78	POLE	Brij 78
0	0.51	0.51	0.62	0.62	0.72	0.72	0.86	0.86
0.2	0.52	0.55	0.61	0.58	0.74	0.67	0.83	0.87
1	0.55	0.53	0.60	0.64	0.74	0.66	0.82	0.82
5	0.57	0.60	0.69	0.63	0.74	0.79	0.86	0.85
10	0.57	0.68	0.65	0.67	0.8	0.71	0.89	0.87

en el rango de 2.4 a 3, idéntico al obtenido en ausencia de surfactante.

A partir de los resultados comentados, se puede concluir que la incorporación de POLE a la fase móvil causa ligeras modificaciones en la retención de los derivados dansilados. Aunque la presencia de surfactante produce un decrecimiento en la anchura de pico, no se traduce en variaciones importantes de la resolución.

La Figura V.4 muestra los cromatogramas tridimensionales, y sus respectivos mapas de contorno, de una mezcla de derivados dansilados de las poliaminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, en el rango de concentraciones comprendido entre 10 y 100 ng, para cada una de las aminas. Los anchos de pico obtenidos para los diferentes compuestos son similares y se pueden apreciar distribuciones aproximadamente gaussianas de los perfiles de concentración de las manchas, para los analitos separados.

Si se compara la Figura V.4, con su homóloga, Figura IV.9, correspondiente a la determinación de poliaminas sin surfactante, se observa una disminución del ancho de pico, para los diferentes sustancias y concentraciones, que está de acuerdo con los resultados anteriormente comentados. Por otra parte, puede verse un aumento importante de la relación señal/ruido, tal y como se discute en el siguiente apartado de este Capítulo.

Tabla V.4.- Valores de R_f para cada una de las poliaminas estudiadas. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Fase móvil: Cloroformo: TEA: POLE (8:4:5%) (v:v:m). $C_{\text{amina}} = 30 \text{ ng}$

Experiencia (n°)	Putrescina	Cadaverina	Espermidina a	Espermina
1	0.58	0.71	0.75	0.86
2	0.54	0.65	0.72	0.85
3	0.58	0.57	0.73	0.86
4	0.55	0.70	0.74	0.88
5	0.56	0.67	0.73	0.87
6	0.54	0.69	0.75	0.89
7	0.55	0.65	0.75	0.88
O	0.56	0.68	0.74	0.87
S	0.02	0.03	0.01	0.01

Tabla V.5.- Parámetros cromatográficos significativos para las separaciones de las poliaminas dansiladas. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Fase móvil: Cloroformo:Trietilamina: POLE (8:4:5%) (v:v:m).

Poliaminas	$R_f \pm I$	CV(%)	R_s
Putrescina	0.56 ± 0.015	3.04	3
Cadaverina	0.68 ± 0.023	3.82	3
Espermidina	0.74 ± 0.010	1.62	2.4
Espermina	0.87 ± 0.012	1.61	

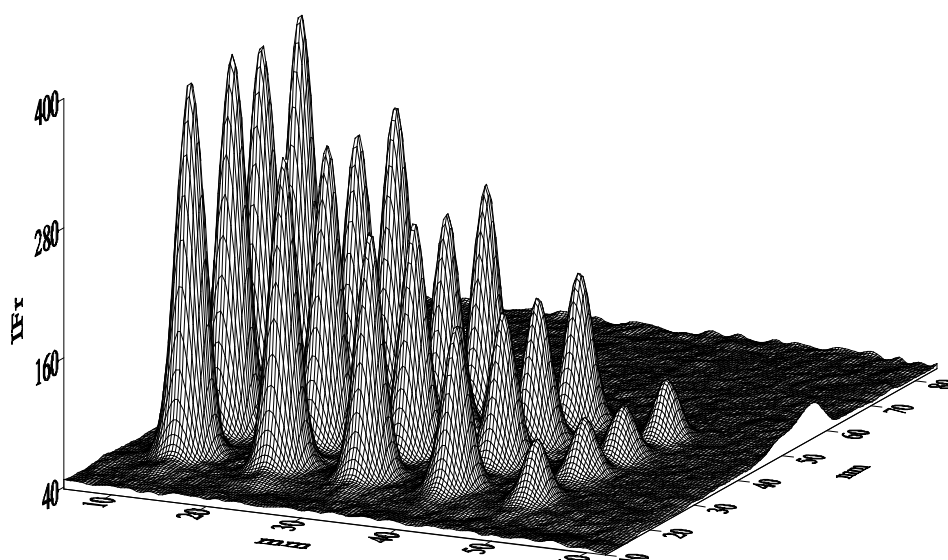
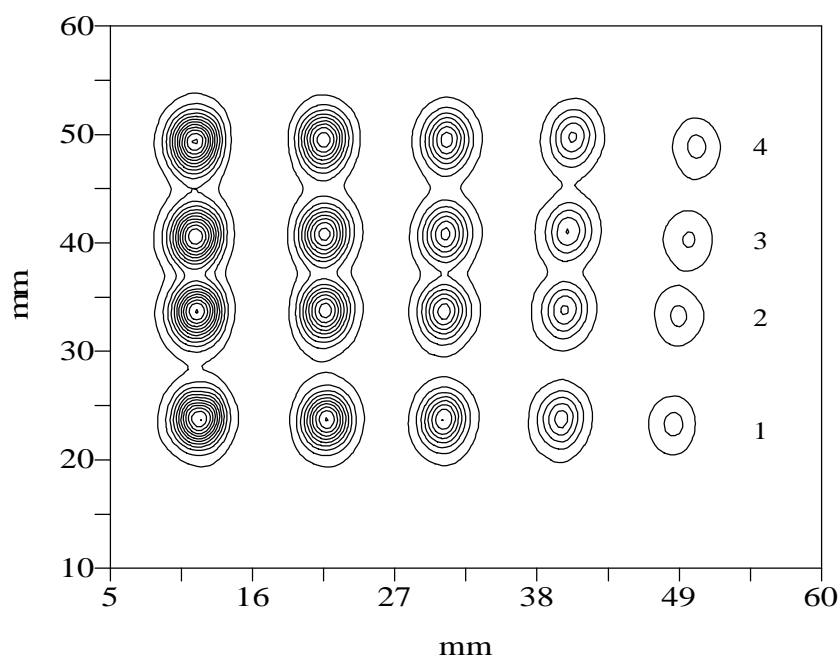


Figura V.4.- Cromatogramas tridimensionales y sus respectivos mapas de contorno, registrados a $\lambda_{exc}=338$ nm $\lambda_{em}=502$ nm, de una mezcla de derivados dansilados de (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina, después de su elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%), en cantidades comprendidas entre 10-100 ng. Rendijas: 5 nm.

V.4.- EFECTO DE LA ADICIÓN DE SURFACTANTE A LA FASE MÓVIL EN LA RELACIÓN SEÑAL/RUIDO.

Para la determinación de la relación señal/ruido en la medida de la fluorescencia sobre los soportes de Gel de Sílice, después de eluidas las poliaminas dansiladas, con la fase móvil conteniendo POLE como aditivo, se ha hecho uso de la expresión comentada en el Capítulo II [173]. Se han realizado un mínimo de siete determinaciones para la obtención de cada uno de los parámetros incluidos en la citada expresión. La Tabla V.6 recoge los datos correspondientes a la señal del blanco, y a la señal analítica, para cada una de las poliaminas dansiladas estudiadas, después de ser eluidas con la fase móvil Cloroformo: Trietilamina: POLE.

Con fines comparativos, también se han determinado los valores correspondientes de la relación señal/ruido, sin adición de surfactante a la fase móvil, manteniendo iguales las restantes condiciones experimentales.

Los valores de la relación señal/ruido determinados, para fases móviles con y sin adición de surfactante, se recogen en la Tabla V.7. Como puede observarse, la incorporación de POLE en la fase móvil aumenta la relación señal/ruido entre 4.5 y 9 veces.

después de eluidas con la fase móvil Cloroformo: TEA:
POLE (8:4:5%). $C_{\text{amina}} = 30 \text{ ng}$.

Experiencia (n°)	Blanco	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
1	44	248	244	199	183
2	44.9	247	246	196	182
3	44.2	244	245	198	183
4	44.8	245	243	199	184
5	44.6	246	244	197	181
6	43.1	250	245	198	183
7	43.3	247	244	199	182
O	44.12	246.71	244.43	198.00	182.57
S	0.711	1.976	0.976	1.155	0.976

Tabla V.7.- Efecto de la presencia de surfactante en la relación señal/ruido. $C_{\text{amina}} = 30 \text{ ng}$.

Poliaminas	Relación S/N	
	Sin Surfactante	Con Surfactante
Putrescina	22.12	96.46
Cadaverina	18.29	165.88
Espermidina	18.70	113.47
Espermina	17.25	114.65

V.5.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Al intentar establecer las curvas de calibrado, se ha encontrado que la intensidad de fluorescencia relativa, dada como altura de pico, no es una función lineal de la concentración de los derivados dansilados de las poliaminas, sino que se encuentran desviaciones hacia el eje de abscisas, a altas concentraciones de amina. Estas desviaciones son mayores que las obtenidas en ausencia de surfactante. Posiblemente los fenómenos de auto-quenching son en este caso más intensos como consecuencia de obtenerse manchas con menores diámetros.

Las funciones de calibración, relación entre altura de pico y cantidad de amina aplicada, fue determinada como una regresión polinómica de segundo grado en el rango de concentraciones estudiadas, de 0 a 85 ng para cada amina. Como se observa en la Tabla V.8, los cuadrados de los coeficientes de correlación varían entre 0.998 y 0.999. Las curvas de regresión se han representado en la Figura V.5.

Tabla V.8. - Datos obtenidos en la regresión correspondiente a las poliaminas .

Poliamina	Curvas de Calibración	r^2	$S_{y/x}$
Putrescina	$Y=(42.98\pm 5.30)+(4.43\pm 0.18)X-(1.1\pm 0.1)\cdot 10^{-2}X^2$	0.998	7.149
Cadaverina	$Y=(42.50\pm 4.46)+(4.45\pm 0.15)X-(1.1\pm 0.1)\cdot 10^{-2}X^2$	0.999	3.595
Espermidina	$Y=(37.23\pm 3.09)+(3.66\pm 0.11)X-(9.5\pm 0.7)\cdot 10^{-3}X^2$	0.999	5.677
Espermina	$Y=(37.12\pm 2.96)+(3.29\pm 0.10)X-(9.1\pm 0.7)\cdot 10^{-3}X^2$	0.999	8.181

Cuando el método fue aplicado a una serie de siete muestras conteniendo 30 ng de cada amina, los errores relativos hallados, para un nivel de confianza del 95%, se

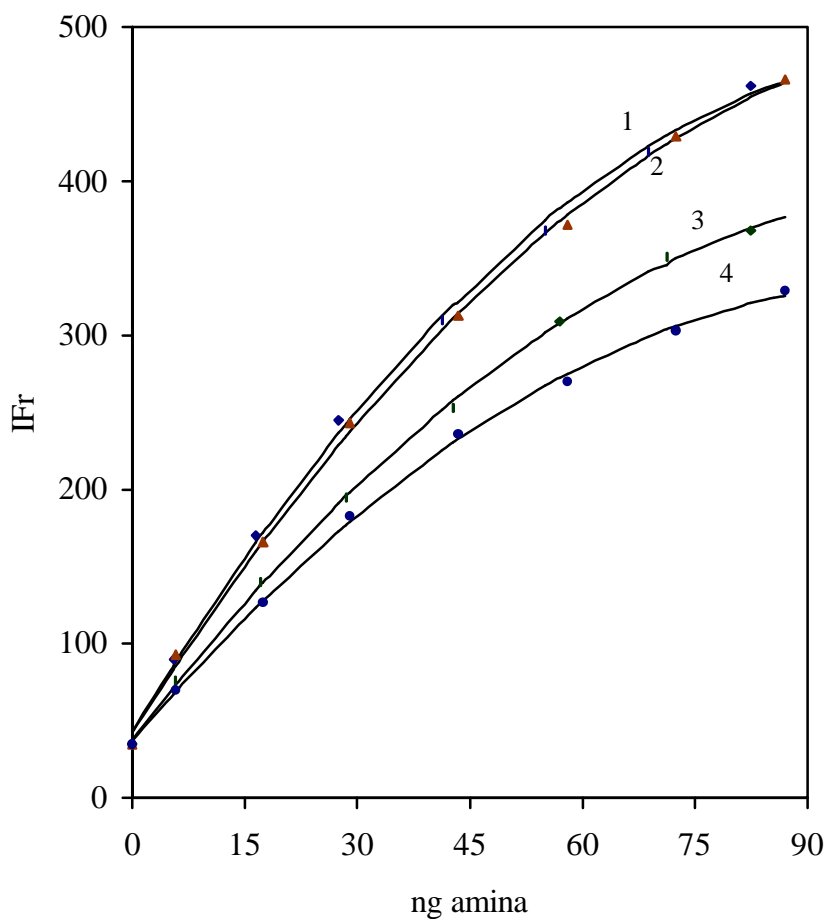


Figura V.5.- Curvas de calibrado de los derivados dansilados de: (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina, separados por HPTLC con Cloroformo:TEA:POLE (8:4:5%) (v:v:m), como fase móvil y Gel de Sílice como fase estacionaria.

encuentran entre 0.40 y 1.07% .

En la Tabla V.9 se recogen los parámetros estadísticos más representativos del método analítico establecido, así como los límites de detección calculados.

Tabla V.9.- Parámetros estadísticos representativos del método analítico propuesto para la determinación de poliaminas por HPTLC.

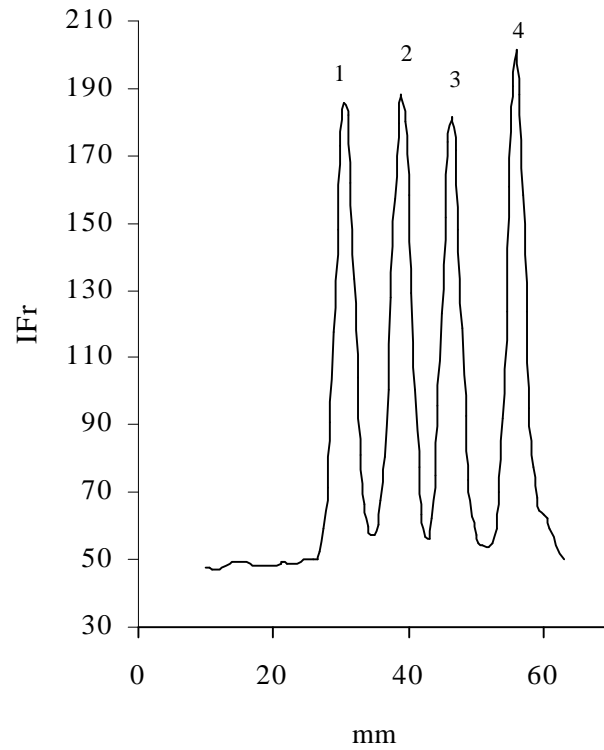
Amina	LD(ng)	S _M	CV(%)	E(%)
Putrescina	0.28	0.34	1.16	1.07
Cadaverina	0.29	0.13	0.44	0.44
Espermidina	0.35	0.24	0.84	0.78
Espermina	0.39	0.24	0.80	0.74

Las desviaciones estándar relativas se pueden considerar pequeñas. La mayor dispersión de resultados es de un 1.16% y corresponde a la Putrescina.

Los límites de detección, expresados como la cantidad de amina cuya señal corresponde al valor medio del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco, se encuentran entre 0.28 y 0.39 ng, valores 10 veces menores que los obtenidos en ausencia de surfactante y comparables a los obtenidos con otras técnicas cromatográficas.

Con fines comparativos, en la Figura V.6 se muestran cromatogramas de HPTLC para mezclas de 30 ng de cada una de las poliaminas en estudio, con la misma fase estacionaria, utilizando fases móviles con y sin adición de POLE. La observación pone de manifiesto las ventajas que representa el empleo de fases móviles con adición de

A



B

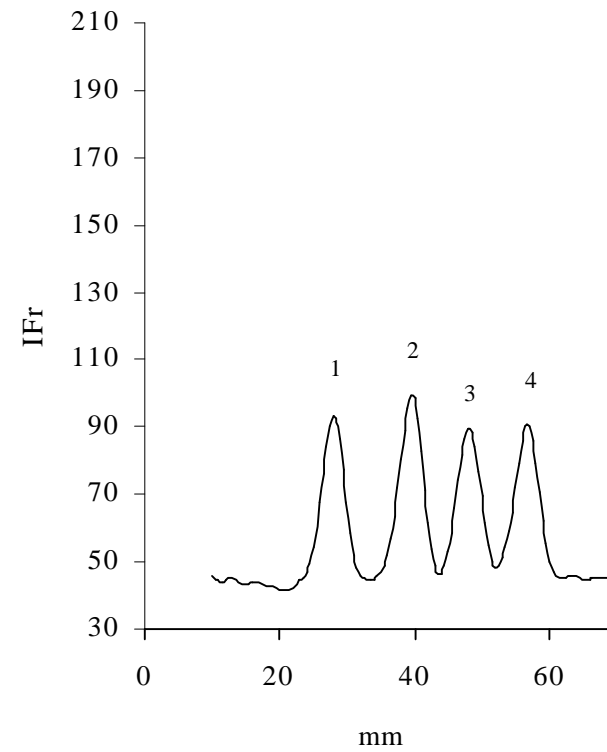


Figura V.6.- Cromatogramas de una mezcla de 30 ng de cada uno de los dansil derivados de (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina después de su elución con (A) y sin (B) la adición de un 5% m:v de POLE a la fase móvil. λ_{exc} = 338 nm, λ_{em} = 505 nm Rendijas: 5 nm.

surfactante.

V.6.- APLICACIONES ANALÍTICAS.

V.6.1.- Determinación de poliaminas en tejidos vegetales.

El método establecido fue aplicado, en primer lugar, a la determinación del contenido en poliaminas en tejidos del fruto del plátano, sometido a diferentes tratamientos, con o sin adición de reguladores del crecimiento o en presencia de inhibidores de la síntesis de poliaminas.

Para comparar los resultados obtenidos por el método propuesto, la separación y cuantificación de derivados dansilados en este tejido, también se llevó a cabo por HPLC. Los valores obtenidos por ambas técnicas no difieren en más del 10%.

La identificación de cada amina se confirmó, por adición a la muestra de cada uno de los analitos. La Tabla V.10 muestra los resultados obtenidos.

La Figura V.7 muestra un cromatograma representativo de la separación de poliaminas en una muestra vegetal, en las condiciones experimentales expuestas.

Tabla V.10.- Contenido de poliaminas en tejido de fruto de plátano. Los valores son dados como $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ de peso fresco.

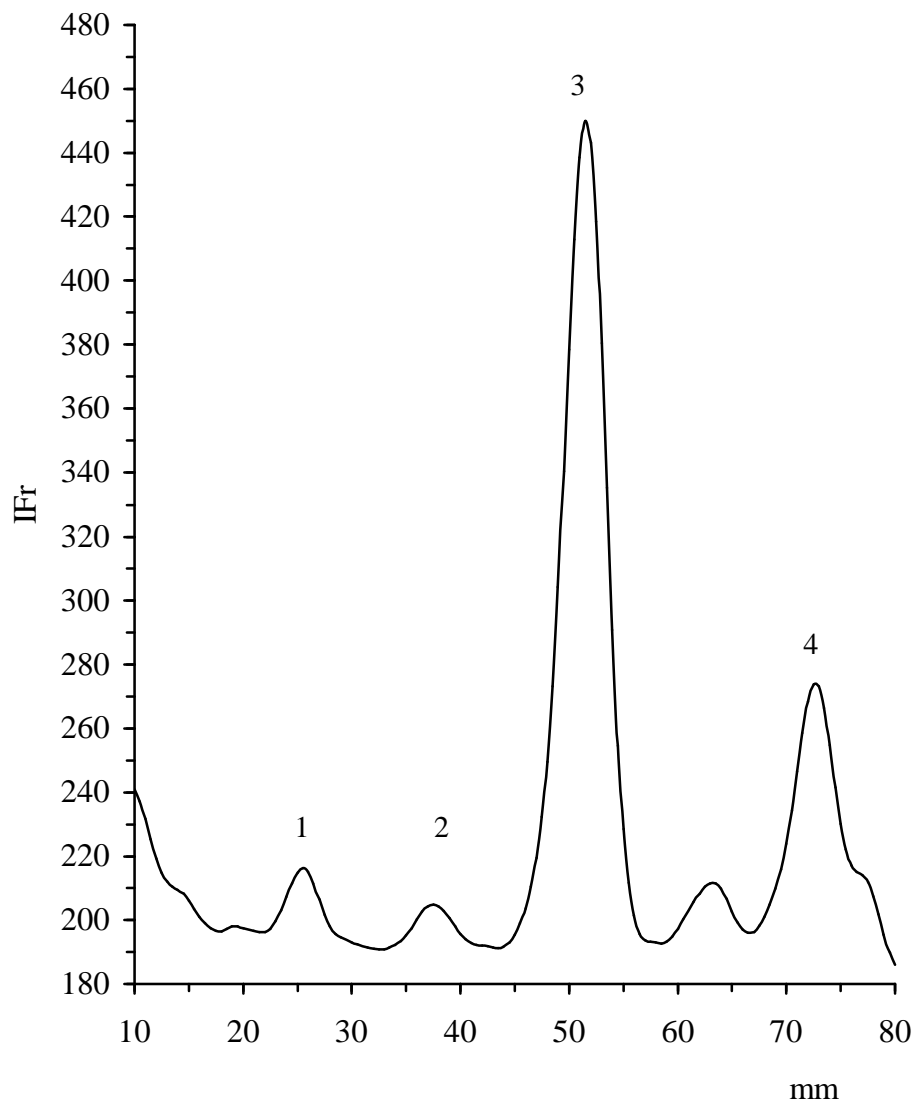


Figura V.7.- Cromatograma de una muestra vegetal que contiene derivados dansilados de: (1) Putrescina, (2) Cadaverina, (3) Espermidina y (4) Espermina. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%) (v:v:m). $\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 502 \text{ nm}$ Rendijas:10 nm

Muestra	Putrescina	Espermidina	Espermina
1	294.2±10.2	24.2±0.9	29.6±0.9
2	284.9±10.0	22.7±0.8	24.9±0.9
3	401.5±12.3	28.2±1.0	24.9±0.9

Media y desviación estándar (n=3)

V.6.2.- Determinación de poliaminas en muestras de cerveza.

También el método propuesto se ha aplicado a la determinación de las poliaminas presentes en muestras de cerveza. Como se indica en la Parte Experimental, el único tratamiento a que se someten las muestras, antes de la dansilación, es la desgasificación.

La Tabla V.11 recoge las concentraciones de poliaminas encontradas en tres muestras de cerveza comercial. Los valores son similares a los encontrados por otros autores. Las recuperaciones encontradas cuando una cantidad conocida se añadió a las muestras de cerveza se incluyen en la Tabla V.12 .

A modo de conclusión, puede indicarse que el método propuesto para la separación por HPTLC de poliaminas y detección por medidas “in situ” de la fluorescencia emitida, presenta límites de detección comparables a los obtenidos con otras técnicas cromatográficas y no implica procesos de clean-up o preconcentración. Además, como con otros métodos de HPTLC, varias muestras pueden ser analizadas simultáneamente, con el consiguiente ahorro en el tiempo de análisis.

Tabla V.11.- Contenidos de poliaminas en tres muestras de cerveza comercial.

Poliamina	Concentraciones encontradas ($\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$) / Muestras comerciales		
	1	2	3
Putrescina	7.15±0.15	4.68±0.15	3.46±0.18
Cadaverina	1.07±0.02	0.38±0.01	0.35±0.02
Espermidina	1.34±0.03	0.26±0.01	2.62±0.11
Espermina	1.19±0.05	0.49±0.02	0.63±0.01

Media y desviación estándar (n=3)

Table V.12.- Recuperaciones de poliaminas en muestras de cerveza comercial después de añadir 30 ng de cada amina.

Poliamina	Recuperaciones (%)		
	1	2	3
Putrescina	97.4	98.9	100.8
Cadaverina	100.2	99.9	100.1
Espermidina	102.3	101.1	101.3
Espermina	102.9	102.0	101.9

El método propuesto puede ser usado para el estudio de procesos de interés bioquímico o fisiológico, en los cuales participen las poliaminas, o en la determinación de poliaminas en muestras de diferente naturaleza.

En la Figura V.8 se muestra la separación de poliaminas en una muestra de cerveza en las condiciones experimentales establecidas.

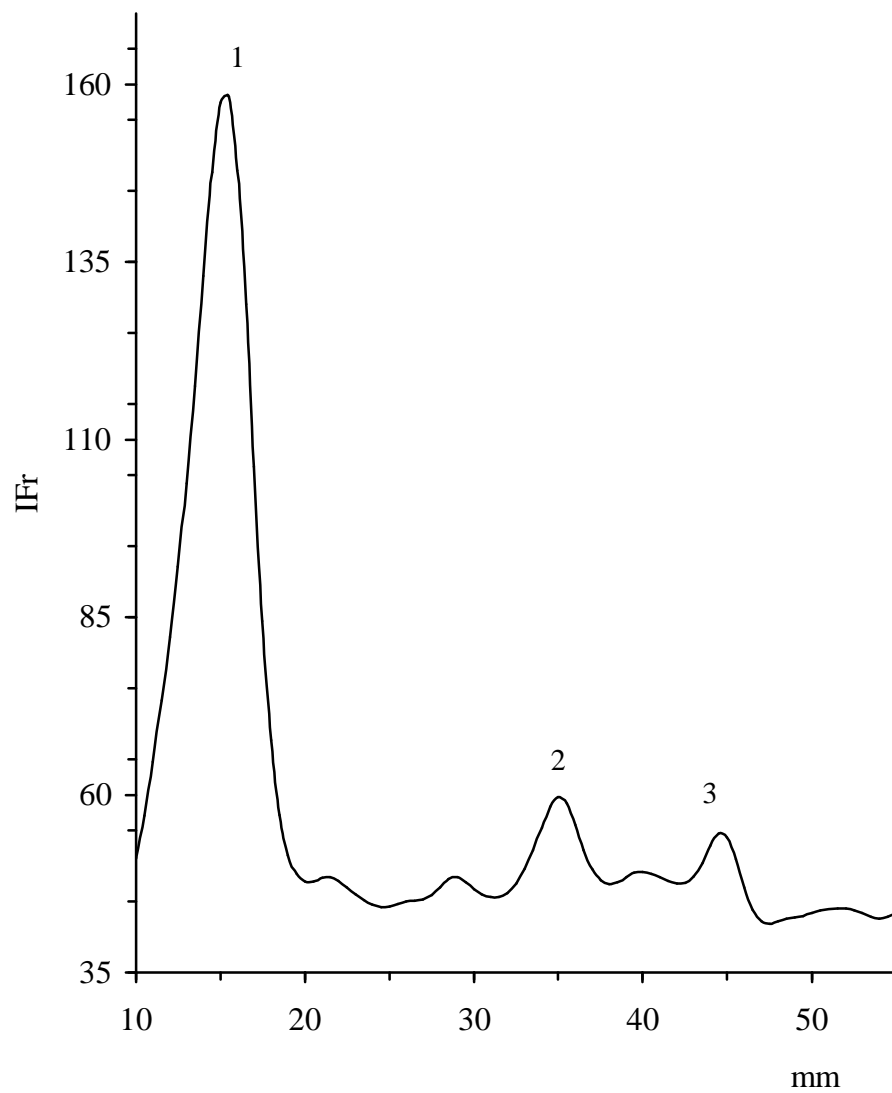


Figura V.8.- Cromatograma de una cerveza, que contiene derivados dansilados de: (1) Putrescina, (2) Espermidina y (3) Espermina. Fase estacionaria: Gel de Sílice. Elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%) (v:v:m).

$\lambda_{exc} = 338 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 502 \text{ nm}$ Rendijas:10 nm

Capítulo 6
DETERMINACIÓN DE POLIAMINAS EN
CERVEZAS

VI.1.- INTRODUCCIÓN.

Las aminas biogénicas pueden encontrarse en una gran variedad de alimentos y bebidas. [224-226]. Normalmente, su existencia se ha asociado a productos en cuya elaboración han tenido lugar procesos de maduración o de fermentación.

Altos contenidos de estas sustancias, y especialmente de Histamina, han sido relacionados con algunos efectos fisiológicos en el hombre. Además, el etanol y algunas aminas biogénicas, tales como Putrescina, Cadaverina, Tiramina, Triptamina y β -Feniletilamina, pueden actuar como potenciadores de la toxicidad de la Histamina [21].

Entre los alimentos en que se ha descrito la presencia de diversas aminas biogénicas, la cerveza puede considerarse representativa. La presencia de Histamina y Tiramina en cervezas, ha sido demostrada por numerosos investigadores. Sin embargo, los datos existentes sobre las cantidades de éstas y otras aminas, en esta bebida, son realmente escasos [227-234].

Por otra parte, algunas poliaminas han sido propuestas como indicadores potenciales de la posible baja calidad de las materias primas empleadas para la elaboración, o de falta de higiene en las condiciones de preparación de ciertos productos [98, 235-237].

Para estudiar las implicaciones, tanto tecnológicas como toxicológicas, de las poliaminas en cervezas, sería necesario disponer de métodos analíticos apropiados. En tal sentido, se han descrito diferentes métodos cromatográficos para la determinación de aminas biogénicas en alimentos, con la utilización de distintas técnicas de separación, como el intercambio iónico, o la utilización de fases estacionarias C-18; la formación de

derivados pre- o post-columna con o-Ftaldehído, Fluorescamina o Cloruro de Dansilo y el uso de detectores UV o de fluorescencia [72, 98, 121, 238].

En este Capítulo, se aportan datos acerca del contenido en las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, en diferentes muestras de cervezas comerciales. Con tal finalidad se utiliza el método de determinación por HPTLC y detección fluorescente descrito anteriormente. Como se ha comentado, dicho método, que presenta límites de detección inferiores al ng, no implica procesos de clean-up o preconcentración. Además, como sucede con otros métodos de HPTLC, pueden ser analizadas varias muestras simultáneamente, con el consiguiente ahorro de tiempo de análisis.

En otro orden de cosas, el análisis químico, en combinación con la interpretación multivariante de datos, puede proporcionar una herramienta interesante para el control de calidad en la industria alimentaria, mediante la relación de objetos y/o variables similares. Las técnicas de clasificación y correlación han sido usadas para tipificar diferentes tipos de alimentos como: destilados [239-242], almendras [243], vinos [244-246], zumos de frutas [247-248], té [249], café [250-251], etc.

El primer paso del análisis multivariante es el análisis de exploración, que permite la visualización y el conocimiento de los datos, así como la selección de las variables útiles.

En el segundo paso se trata de reducir la dimensionalidad del problema original, de tal forma que en el proceso se pierda la menor cantidad posible de información en el proceso [252]. Los métodos más empleados son el Análisis de Componentes Principales y el Análisis de Factores. Ambos permiten representar los datos m-dimensionales en una matriz con un número reducido de dimensiones, llamadas componentes principales o factores, respectivamente, que son combinaciones lineales de las variables originales. El procedimiento más usual para realizar dichos análisis es la preparación de la matriz de correlación, la extracción de los factores iniciales y la posibilidad de reducción de datos,

y la rotación de la matriz en búsqueda de factores más fácilmente interpretables [253].

El tercer paso consiste en un análisis de clasificación, que pretende reunir los objetos en una categoría determinada, mediante el análisis de clusters o por imposiciones dadas por las exigencias prácticas. Los puntos son agrupados basándose en la cercanía o similitud entre clusters, que es reflejo de la semejanza entre sus propiedades [254].

En este Capítulo se intenta, asimismo, establecer relaciones entre los distintos tipos de cerveza, en función de las cantidades de las poliaminas estudiadas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina.

VI.2.- CONTENIDO DE POLIAMINAS EN CERVEZAS.

Con objeto de determinar el contenido en Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina en cervezas comerciales, se ha utilizado un conjunto de diecisiete muestras, adquiridas en diferentes establecimientos de la isla de Tenerife, escogidas al azar, sin tener en cuenta su origen, lugar de envasado, materias primas utilizadas o procesos industriales empleados. Los datos de identificación y las características disponibles de las mismas se encuentran en la Tabla VI.1.

En cuanto al método de análisis, se ha utilizado el establecido en el Capítulo anterior y descrito en la Parte Experimental. La muestra de cerveza, previamente desgasificada por agitación, es sometida a dansilación asistida por microondas. El extracto dansilado se analiza por HPTLC, con detección fluorescente, usando Gel de Sílice como fase estacionaria y cloroformo:TEA:POLE (8:4:5%) (v:v:m) como fase móvil. Las distintas poliaminas se han identificado en base a los tiempos de retención obtenidos con disoluciones patrón.

Con objeto de comprobar la aplicabilidad del método de análisis propuesto, al conjunto de muestras de cerveza, se han realizado estudios de recuperación. En tal sentido, alícuotas de las distintas muestras fueron enriquecidas con una mezcla de las

cuatro poliaminas consideradas, de forma que el contenido final de cada una de ellas, en las respectivas muestras, era de 30 ng. Los resultados obtenidos en las distintas determinaciones, expresados como valores medios de porcentajes de recuperación, se han agrupado en la Tabla VI.2.

Después de calcular la recuperación media de cada amina, se ha verificado, mediante el test de la *t* de Student, que no existen diferencias significativas entre la recuperación media encontrada para cada amina y el valor teórico del 100%. No obstante, al considerar el conjunto de los valores obtenidos para cada una de las poliaminas y para cada una de las muestras, se observan valores que, en general, pueden considerarse bastante uniformes. Los valores medios de las recuperaciones halladas, para cada una de las poliaminas, oscilan entre 89.85 y 98.04%, con intervalos de variación mayores para la Putrescina y Espermina. Por otra parte, si se consideran los porcentajes de recuperación obtenidos para el conjunto de las cuatro poliaminas, en cada una de las muestras de cerveza analizadas, se observa que la mayoría de los resultados son próximos al 100%. No obstante, se alejan considerablemente de este comportamiento, las muestras de cerveza Mahou y las de cerveza Dorada.

En la determinación de los contenidos en cada una de las cuatro poliaminas consideradas, en las diecisiete muestras de cerveza, se han obtenido los resultados que se presentan en la Tabla VI.3.

Aunque no se encuentran valores muy dispares entre sí, se observan diferencias considerables en las concentraciones halladas para las distintas poliaminas. En general, los mayores contenidos corresponden a la Putrescina, seguidos de los que presentan la Espermina y la Espermidina, siendo la Cadaverina la que suele mostrar los menores valores. La Tabla VI.4 presenta los valores máximos y mínimos, así como las medias correspondientes a las concentraciones halladas para las cuatro poliaminas.

En términos relativos, las concentraciones de Putrescina encontradas en las muestras analizadas, son ligeramente superiores a los hallados por otros autores para

cervezas manufacturadas en Italia [228] , América del Norte y Europa [227]. Destacan las diferencias que se observan entre algunas muestras. Así, mientras que solo dos muestras presentan concentraciones próximas al valor medio (7.22 mg/ml) del conjunto, un grupo presenta contenidos que oscilan entre 12.21 y 19.63 mg/ml, mientras que en las restantes muestras los valores se encuentran comprendidos entre 2.33 y 4.67 mg/ml.

Las concentraciones obtenidas para las otras tres poliaminas son similares a las halladas por otros autores [121, 255, 228]. En el caso de la Cadaverina, Espermina y Espermidina, los contenidos hallados son considerablemente uniformes. Excepto algún valor puntual, los valores establecidos, para aquellas muestras que presentan concentraciones cuantificables, oscilan, como máximo, alrededor de 0.5 unidades respecto al valor medio establecido para cada amina.

En otro orden de cosas, debe señalarse que los cromatogramas obtenidos al analizar las muestras de cerveza, previamente sometidas a dansilación, presentan picos diferentes a los correspondientes a la Putrescina, Cadaverina, Espermina y Espermidina,.

Con objeto de establecer la presencia de otras aminas en las muestras de cerveza, no consideradas inicialmente, se han intentado identificar dichos picos con el empleo de diferentes aminas patrón. Como resultado de las experiencias realizadas, puede afirmarse que no se ha detectado Histamina en ninguna de las muestras analizadas. Sin embargo, en todas las muestras estudiadas se encontró la presencia de Hordenina y Tiramina, aunque no fueron cuantificadas. Se ha constatado, además, la existencia en las muestras de otros dos compuestos que no hemos podido identificar. Las Figuras VI.1 y VI.2 muestran cromatogramas representativos.

Tabla VI.1.- Características de las muestras de cerveza estudiadas

Muestra	Cerveza	Identificación	Origen	Envasado	% Grado Alc.
1	Skol	Export Quality	España	España	4.3
2	Tuborg	Gold Label	Dinamarca	Dinamarca	5.5
3	Stella Artois	Premium Lager	Bélgica	Bélgica	5.2
4	Feier	Premium	Alemania	España	5.1
5	König	Pilsen	Alemania	Alemania	4.9
6	Moretti	Pilsen	Italia	Italia	4.5
7	Holbrand	Lager	Holanda	España	5.0
8	Carlsberg	Normal	Holanda	España	5.0
9	Budweiser	Genuine	Reino Unido	España	5.0
10	Sterling	Blonde de Luxe	Holanda	Holanda	5.0
11	Dortmunder	Premium	Alemania	España	5.0
12	Bavaria	Normal	Holanda	España	5.0
13	Heineken	Premium	Holanda	España	5.0
14	Cruz Campo	Pilsen	España	España	5.0
15	Mahou	Clásica	España	España	4.8
16	Dorada	Pilsen	España	España	4.5
17	Dorada	Especial	España	España	5.5

Tabla VI.2.- Valores medios para recuperaciones de poliaminas en cervezas.

Muestra	Recuperación (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
Skol	103.8	100.5	99.7	109.2
Tuborg	100.5	91.3	92.9	111.6
Stella Artois	85.7	99.6	84.5	106.7
Feier	85.2	99.8	116.5	90.1
König	113.3	113.0	103.8	117.4
Moretti	88.3	102.5	110.3	114.2
Holbrand	75.2	105.7	124.8	139.5
Carlsberg	97.2	101.9	111.5	113.1
Budweiser	95.1	99.3	105.2	109.5
Sterling	73.8	100.4	91.8	106.7
Dortmunder	114.4	118.5	103.7	122.6
Bavaria	89.1	110.4	92.8	101.2
Heineken	102.5	92.0	106.0	92.4
Cruz Campo	95.3	81.7	97.4	95.1
Mahou	68.3	78.8	77.7	80.7
Dorada	77.7	87.9	71.0	71.7
Dorada Especial	62.1	83.3	71.0	68.8

Tabla VI.3.- Concentraciones de poliaminas encontradas en cervezas

Muestra	C _{amina} (µg/ml)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
Skol	2.31	0.20	0.71	0.64
Tuborg	4.29	0.26	0.57	0.67
Stella Artois	12.21	0.58	0.57	0.87
Feier	13.14	0.87	1.14	1.07
König	12.24	0.70	1.45	0.99
Moretti	19.63	0.70	1.34	1.19
Holbrand	7.84	0.43	0.54	0.43
Carlsberg	4.15	0.46	1.28	1.10
Budweiser	4.67	0.38	0.26	0.49
Sterling	8.85	0.52	0.60	1.01
Dortmunder	3.38	0.52	2.65	1.62
Bavaria	12.95	0.35	0.48	0.70
Heineken	4.65	-	-	1.57
Cruz Campo	3.22	-	-	1.57
Mahou	2.23	-	-	1.48
Dorada	3.08	-	-	-
Dorada	3.91	-	-	-

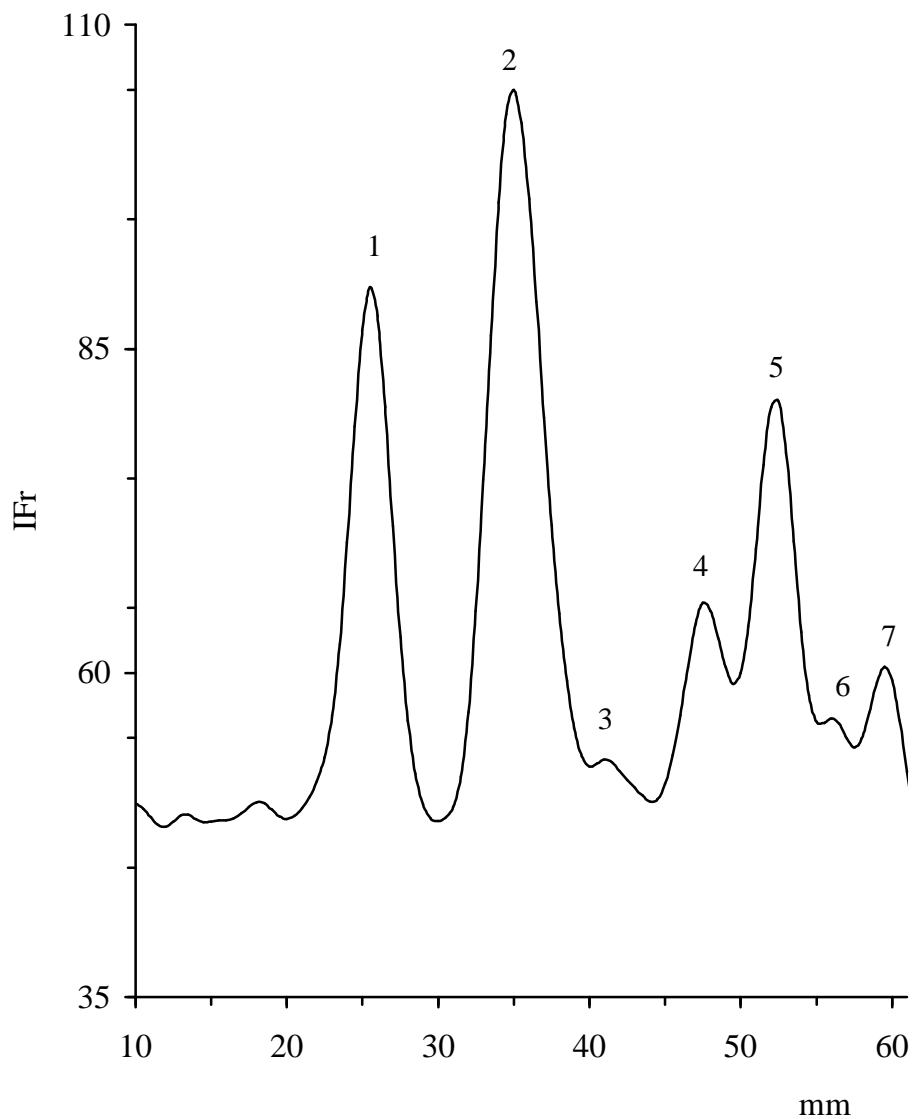


Figura VI.1.- Cromatograma de una muestra de cerveza dansilada. (1) No identificado, (2) Putrescina, (3), Cadaverina, (4) Espermidina, (5) Tiramina, (6) Espermina y (7) Hordenina. Fase estacionaria: Gel de Silice. Elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%) (v:v:m). λ_{exc} =338 nm, λ_{em} =502 nm. Rendijas: 5 nm

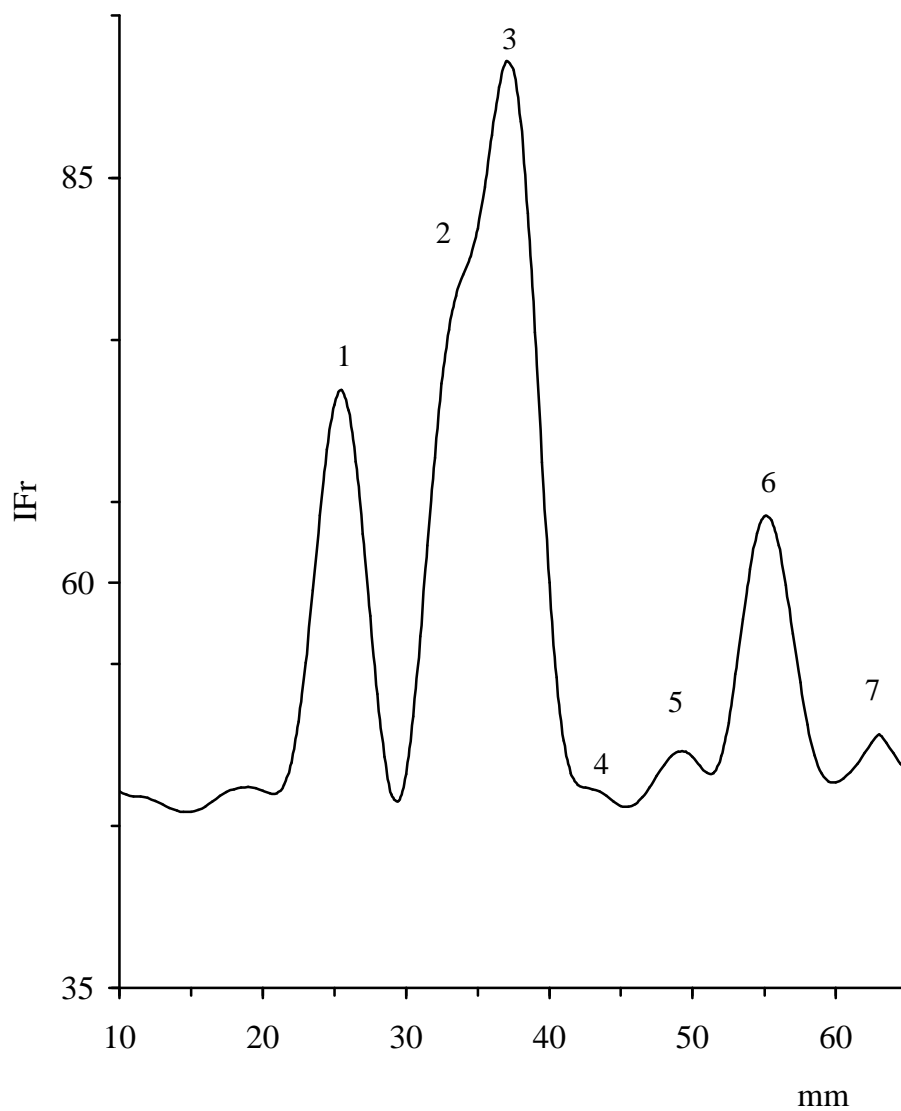


Figura VI.2.- Cromatograma de una muestra de cerveza dansilada. (1) No identificado, (2) Putrescina, (3) No identificado, (4), Cadaverina, (5) Espermidina, (6) Tiramina y (7) Hordenina. Fase estacionaria: Gel de Silice. Elución con Cloroformo:Trietilamina:POLE (8:4:5%) (v:v:m). $\lambda_{exc}=338$ nm, $\lambda_{em}=502$ nm. Rendijas: 5 nm.

Tabla VI.4.- Valores mínimos, máximos y medias de las concentraciones de poliaminas en muestras de cerveza.

Poliaminas	Concentraciones (mg/ml)		
	Valores mínimos	Valores máximos	Valores medios *
Putrescina	2.23	19.63	7.22
Cadaverina	-	0.87	0.50
Espermidina	-	2.65	0.97
Espermina	-	1.62	1.03

* Contenidos al considerar únicamente las muestras en que han podido cuantificarse las poliaminas

VI.3.- TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados comentados en el apartado anterior, muestran una cierta variabilidad en el número de componentes cuya presencia se pone de manifiesto en HPTLC, así como en la intensidad de fluorescencia emitida por los mismos, en las diecisiete muestras de cerveza analizadas. Este número de muestras no es suficientemente grande como para realizar un estudio estadístico riguroso. Sin embargo, hemos querido comprobar, al menos a nivel de tendencias, si sería posible agrupar o diferenciar, distintos tipos de cervezas, en función del contenido en poliaminas biogénicas. También podría ser de interés conocer si la existencia de determinadas poliaminas en un tipo de cerveza, lleva asociada la presencia de otras. Para conseguir la información primaria, se aprovecha que la determinación de varias poliaminas en distintas muestras de cerveza, según el procedimiento descrito en esta Memoria, es relativamente simple y rápida.

Con la finalidad expuesta, se han realizado estudios de correlaciones, de análisis

de factores y de Clusters. Para la construcción de la matriz de correlaciones, primer paso a realizar para los distintos estudios estadísticos, se han utilizado como datos químicos las concentraciones halladas para cada poliamina, recogidas en la Tabla VI.3.

Análisis de correlaciones

La matriz de correlaciones se ha obtenido a partir de la matriz de datos originales, preprocesados por la técnica del autoescalado, que consiste en la transformación de cada valor puntual de las distintas variables, mediante la sustracción del valor medio correspondiente y división por la varianza.

En la Tabla VI.5 se representa la matriz de correlaciones obtenida, indicándose en negrilla aquellas correlaciones que presentan valores superiores a 0.7. Asimismo, entre paréntesis y en cursiva, se han incluido los correspondientes niveles de significación.

Tabla VI.5.- Matriz de correlaciones para las variables consideradas.

	Variables			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
Putrescina	1.0000 <i>(0.0000)</i>	0.7464 <i>(0.0006)</i>	0.3052 <i>(0.2335)</i>	0.0650 <i>(0.8043)</i>
Cadaverina	0.7464 <i>(0.0006)</i>	1.0000 <i>(0.0000)</i>	0.7054 <i>(0.0016)</i>	0.1503 <i>(0.5648)</i>
Espermidina	0.3052 <i>(0.2335)</i>	0.7054 <i>(0.0016)</i>	1.0000 <i>(0.0000)</i>	0.3630 <i>(0.1522)</i>
Espermina	0.0650 <i>(0.8043)</i>	0.1503 <i>(0.5648)</i>	0.3630 <i>(0.1522)</i>	1.0000 <i>(0.0000)</i>

Se observa que, entre las variables Putrescina y Cadaverina, así como entre

Cadaverina y Espermidina existen correlaciones elevadas

Sin embargo, el resto de los valores de correlación son de poca significación. En este sentido destacan aquellas en las que interviene la Espermina.

Análisis de factores

El análisis de factores es una técnica que consiste en resumir la información contenida en una matriz de datos, basándose en las relaciones que exhiben las variables entre sí y mediante la construcción de un conjunto nuevo reducido de variables, como resultado de transformaciones matemáticas de los datos originales. El método de análisis de factores construye un espacio multidimensional reducido en que las nuevas variables son combinaciones lineales de las variables originales.

A partir de la matriz de correlaciones, el análisis de factores extrae otra matriz, denominada Matriz Factorial, en que cada columna es un Factor y el número de filas coincide con el de variables. Los coeficientes que aparecen en la misma, se conocen con el nombre de pesos, *weights* o *loadings*.

Al realizar el análisis de factores sobre las variables correspondientes a las diecisiete muestras analizadas, se obtienen los autovalores (*eigenvalues*), comunalidades y varianzas, expuestas en la Tabla VI.6.

La comunalidad debe entenderse como la varianza total de una variable explicada por la combinación de todos los factores comunes. La Tabla VI.6 muestra que, todas las variables, excepto la Espermina, presentan comunalidades superiores a 0.6, por lo que debe entenderse que están bien representadas por estos factores.

Tabla VI.6.- Análisis factorial de la matriz de datos.

Variable	Comunalidad	Factor	Autovalor	Varianza (%)	Varianza acumulada
Putrescina	0.65971	1	2.27550	56.9	56.9
Cadaverina	0.81579	2	1.04835	26.2	83.1
Espermidina	0.66409	3	0.56972	14.2	97.3
Espermina	0.16658	4	0.10643	2.70	100.0

Para escoger el número de factores que explican el sistema, es necesario examinar la proporción de varianza explicado por cada factor por separado, y por el conjunto de factores más significativos. Según el criterio de Kaiser [256], se eligen aquellos factores que presentan un autovalor mayor que uno. En la Tabla VI.6, se observa que los dos primeros factores tienen autovalores mayores que la unidad y que, por otra parte, estos explican el 83.1% de la varianza total del sistema. Por lo tanto, se han escogido dos factores para explicar el sistema.

La matriz de factores de la Tabla VI.7, muestra el peso que tiene cada variable en cada uno de los factores. Cuanto más alto sea el coeficiente de ponderación para una variable en un determinado factor, mayor influencia posee dicha variable sobre el factor. Dentro de un mismo factor, presentan correlaciones aquellas variables que muestran coeficientes de ponderación altos. Si las cargas altas se presentan en dos factores distintos, las variables no estarían correlacionadas.

En el primer factor, que explica el porcentaje mayor de varianza (56.9%), las variables con mayor influencia son Putrescina, Cadaverina y Espermidina, que están altamente correlacionadas, y de forma positiva. Este comportamiento coincide con lo observado en la matriz de correlaciones.

En el segundo factor, con el 26.2%, sólo muestra un peso importante la variable Espermina, que no parece mostrar correlación importante con las demás.

En ocasiones, la realización de una rotación factorial Varimax permite obtener soluciones con una mayor significación química. Para ello, se maximiza la varianza de cada factor, de manera que el número de variables con coeficientes de ponderación intermedios disminuye y, sin embargo, aumenta el número de variables con cargas muy altas o muy bajas. La rotación Varimax acentúa las cargas altas y minimiza las pequeñas. En nuestro caso, la aplicación de la rotación Varimax acentúa los pesos de las variables Putrescina y Cadaverina en el Factor 1, mientras que la Espermina sigue siendo la variable de mayor importancia en el Factor 2. El resultado de la rotación de la matriz factorial se expone en la Tabla VI.8.

En la Figura VI.3, se representan las variables en el espacio bidimensional de los dos factores, después de efectuada la rotación Varimax de la matriz.

Atendiendo a los resultados del análisis de factores, cabría pensar que el estudio de una de las variables que posea un peso estadístico elevado en el Factor 1, frente a una variable que sature el Factor 2, permitiría clasificar los distintos tipos de cerveza. Con este objetivo se llevó a cabo un análisis de Clusters.

Tabla VI.7.- Matriz Factorial

Variable	Factor 1	Factor 2
Putrescina	0.76466	-0.45316
Cadaverina	0.94143	-0.21923
Espermidina	0.81203	0.28445
Espermina	0.38097	0.84500

Tabla VI.8.- Matriz factorial tras una rotación Varimax

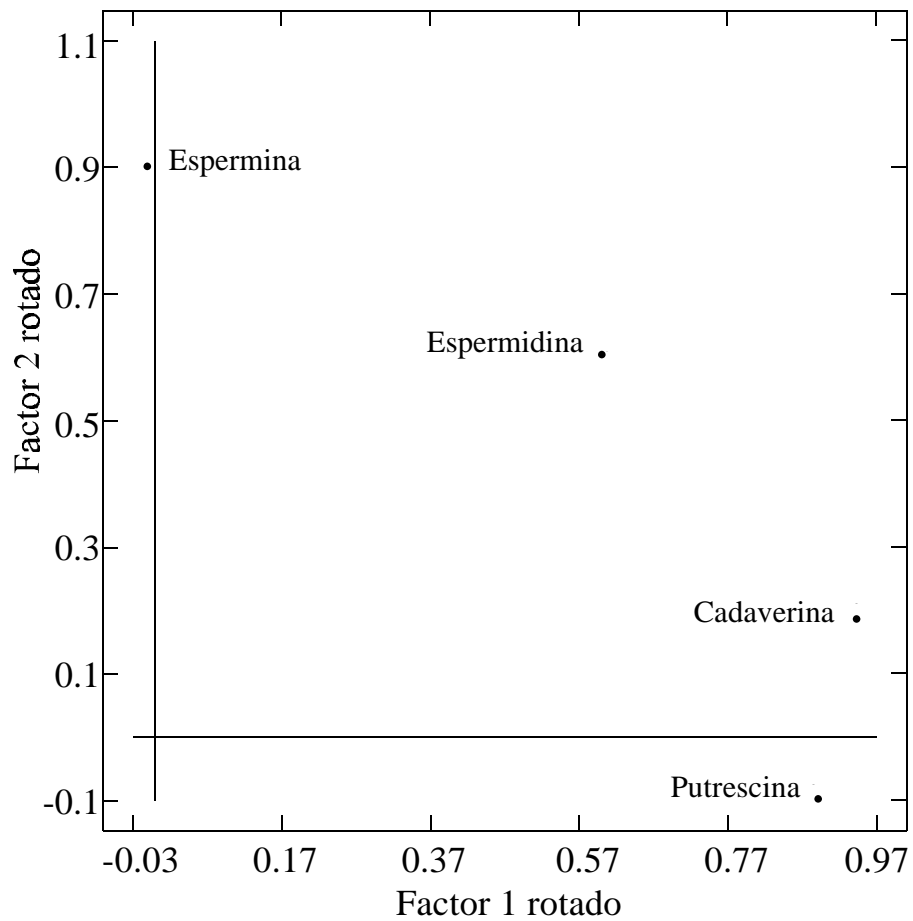


Figura VI.3.- Gráfico de distribución de variables en el espacio generado por los dos factores.

Variable	Factor 1	Factor 2
Putrescina	0.88559	-0.07602
Cadaverina	0.94320	0.21147
Espermidina	0.60786	0.60894
Espermina	-0.02390	0.92660

Análisis de clusters

El primer paso del análisis de clusters consiste en seleccionar las variables de mayor importancia para la identificación de los grupos. Esta selección de variables se realizó en base a la distribución que se obtuvo como resultado del análisis de factores. Como consecuencia, se seleccionaron las variables Cadaverina y Espermina, ambas con un peso importante sobre los factores 1 y 2, respectivamente.

A continuación, se llevó a cabo un análisis jerárquico de clusters, usando el método de las distancias mínimas (*single linkage*), también conocido como del "vecino más próximo" (K-Nearest Neighbour), que considera la distancia entre dos objetos como la menor existente entre los mismos.

Se ha empleado el método divisivo para obtener el dendograma, que considera todos los objetos formando parte inicialmente de un único grupo y luego los va dividiendo en otros más pequeños, hasta obtener tantos grupos como objetos.

La Figura VI.4 muestra la agrupación adoptada por las diferentes muestras de cerveza estudiadas, cuando se representan las variables seleccionadas.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que la mayoría de las muestras analizadas quedan distribuidas en dos grupos principales, mientras que las restantes quedan excluidas. Entre estas últimas, las muestras 16 y 17, correspondientes a la marca Dorada, se caracterizan porque en ellas sólo se cuantifica la Putrescina, mientras que las

muestras 13, 14 y 15, corresponden a aquellas en las que se no ha detectado Cadaverina ni Espermidina. La cerveza Dortmunder, muestra 11, es la única entre las que presentan concentraciones detectables de las cuatro aminas que no ha resultado agrupada en el análisis de clusters.

Entre las muestras que han quedado formando parte de las agrupaciones definidas, pueden encontrarse algunas tendencias. Así, todas las muestras con contenidos en Putrescina superiores a 8 ppm se encuentran en un cluster, excepto la muestra 12. En otro se encuentran las cervezas con menores contenidos en Cadaverina, inferiores a 0.50 ppm, con la excepción de la muestra 9 que, por otra parte, tiene contenidos en Espermina próximos a 1 ppm, al igual que el resto de las muestras de este grupo. Una situación similar encontraríamos para concentraciones iguales o inferiores a 0.70.

Por otra parte, puede observarse que el conjunto de muestras del primer clúster, con contenidos de Cadaverina más pequeños, presenta también las menores concentraciones de Espermina. El otro grupo principal de muestras tiene contenidos más altos de las dos poliaminas. Cabe destacar el comportamiento de la muestra 11, cuyos niveles de Espermina y Espermidina son los más elevados en el conjunto total de muestras estudiadas. Se agrupan por otro lado un conjunto de cervezas en las que solo han sido identificadas la Putrescina (16 y 17) o la Putrescina y la Espermina (13, 14 y 15).

Se podrían exponer otras relaciones, pero seguramente estamos ante una situación cuya explicación necesitaría de la aportación de datos complementarios.

No obstante, podemos aventurar que, en ocasiones, distintos tipos de cervezas pueden clasificarse en grupos diferentes, teniendo en cuenta sus contenidos en poliaminas. Seguramente, el tipo de materia prima, su calidad y cantidad, así como características del proceso de fabricación guardan relación con la tendencia a formar grupos descrita.

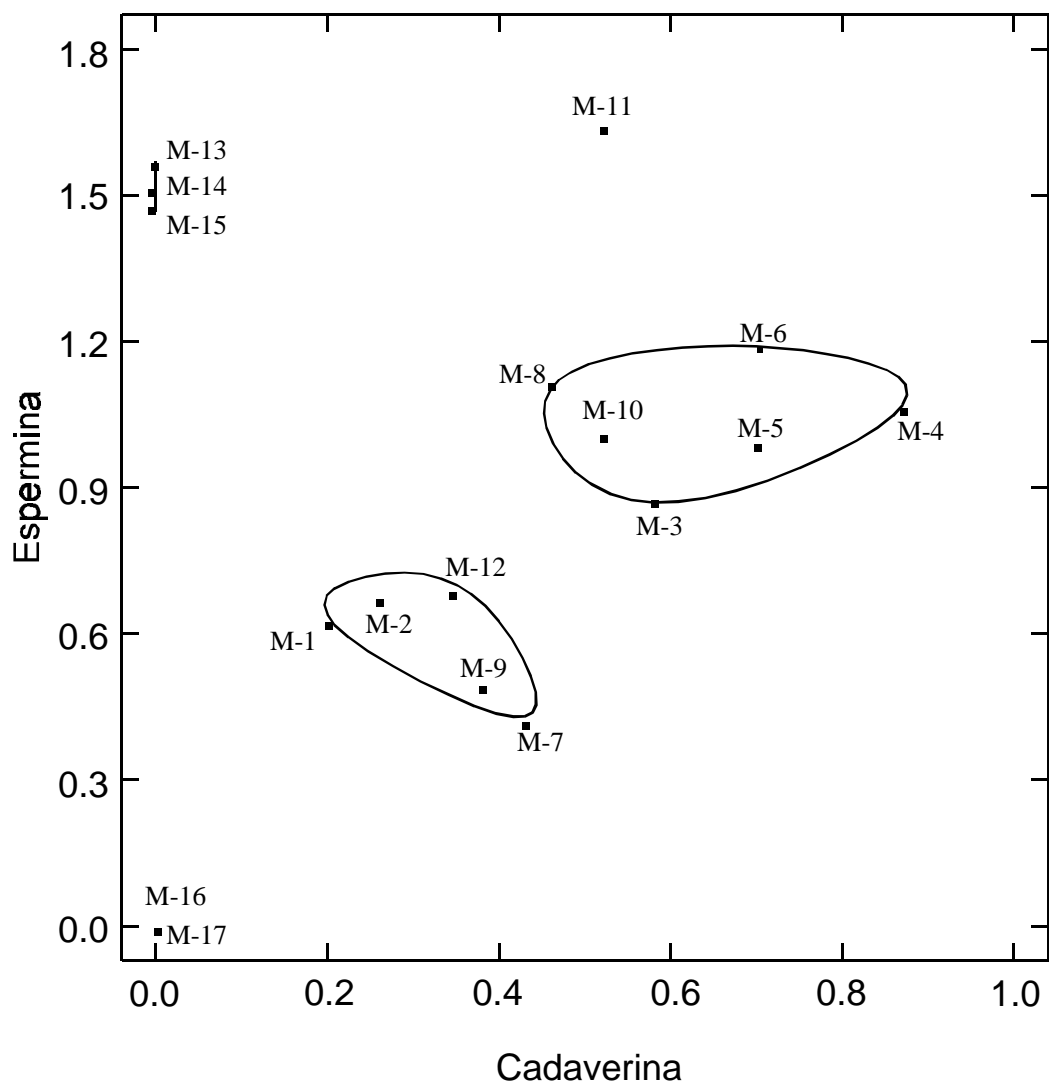


Figura VI.4.-Análisis de clusters

Capítulo 7
LINEALIDAD Y CARACTERÍSTICAS
ANALÍTICAS ASOCIADAS A LA
CALIBRACIÓN, EN HPTLC CON
DETECCIÓN FLUORESCENTE

VII.1.- INTRODUCCIÓN.

En las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas, la muestra penetra en la matriz sólida, siendo excitada tanto en la superficie como dentro de la matriz del sólido. Por su parte, la radiación fluorescente puede ser reflejada o transmitida desde el material sólido.

Casi todos los materiales empleados, cuando se realizan medidas sobre superficies sólidas, son medios altamente dispersantes, por lo que tanto la radiación excitante como la radiación fluorescente se verán sometidas a procesos de dispersión. Además, es posible que la propia superficie sólida absorba radiación excitante.

Pocos trabajos han sido desarrollados acerca de los aspectos teóricos de la fluorescencia reflejada o transmitida desde una superficie sólida. Pollak y Boulton [257] usan la teoría de Kubelka-Munk [258] sobre radiación transmitida en un medio dispersante, para desarrollar una teoría de fluorescencia sobre superficies sólidas. Pollak [259] discute esta teoría y su posible aplicación en cromatografía en capa fina. Asimismo, Goldman [260] utiliza la teoría de Kubelka-Munk para desarrollar otra de fluorescencia sobre soportes sólidos.

La teoría de Goldman, la más directamente relacionada con la teoría de Kubelka-Munk, toma en consideración las radiaciones de excitación y de fluorescencia en medios dispersantes, para obtener dos pares de ecuaciones diferenciales. Un par corresponde a la absorción de radiación de excitación, en las direcciones transmitida y reflejada, y el otro par corresponde a la radiación fluorescente en las mismas direcciones. Con tratamientos matemáticos adecuados, a partir de los dos pares de ecuaciones diferenciales, Goldman obtiene dos ecuaciones generales, que son muy complejas y, por

tanto, de poca utilidad analítica. Sin embargo, para bajos niveles de fluorescencia y valores relativamente altos de los coeficientes de dispersión, tanto de la radiación excitante como de la radiación fluorescente, puede admitirse que:

$$\frac{J^+}{I_0''} = \frac{2}{3}kx \left(1 + \frac{4}{30}sx \cdot kx\right) \quad (1)$$

donde:

J^+ es la intensidad de fluorescencia reflejada,

I_0 es la intensidad inicial de la radiación excitante,

$''$ es la porción de radiación absorbida convertida en fluorescencia,

k representa el coeficiente de absorción de la radiación excitante,

s es el coeficiente de dispersión de la radiación excitante,

x representa el grosor del medio dispersante.

El término kx es proporcional a la cantidad de compuesto absorbente en la banda de excitación [261].

La ecuación (1) no es utilizable en nuestro caso, porque cuando Goldman deriva sus ecuaciones fundamentales asume que la superficie sólida no absorbe la radiación excitante. Sin embargo, adsorbentes comunes utilizados en TLC, tales como Gel de Sílice y Alumina, absorben radiación en el rango espectral aproximado de 225-340 nm [262].

Cuando el sustrato es capaz de absorber radiación, y cuando la concentración de sustancia fluorescente es C_x , las expresiones para la fluorescencia reflejada y transmitida, se obtienen haciendo:

$$'' = \frac{\$C_x}{C_x \% Lx} \quad \text{y} \quad kx = C_x \% Lx$$

siendo L , el coeficiente de absorción del soporte y $\$$, la eficiencia de fluorescencia. Se obtendría así la expresión [260]:

$$J^c = I_0 \left[\frac{Cx}{Cx + Lx} \left(\frac{J^0}{I_0} \right) \right] \quad (2)$$

Solamente cuando Cx es pequeño, comparado con Lx, estas ecuaciones se hacen lineales en Cx.

Por tanto, cabe esperar que las curvas de calibración basadas en las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas, se ajusten normalmente a funciones polinómicas.

Por otra parte, la teoría de Goldman asume que el tamaño de partículas del medio dispersante es uniforme. Sin embargo, las placas comerciales empleadas, presentan partículas con un rango de tamaño determinado. Kortum [258] ha estudiado la dependencia del coeficiente de dispersión con el tamaño de partícula, estableciendo que aquel es inversamente proporcional a dicho tamaño.

La ecuación (1) indica que el término $(4sx \cdot kx/30)$ es importante para determinar los tramos lineales de las curvas de calibración, así como las respuestas relativas en los tramos no lineales. Según algunos autores [263], el tamaño de partícula puede ser el principal factor entre los que contribuyen al valor de dichos términos.

Por otra parte, se suele asumir que la especie fluorescente se distribuye uniformemente a través del medio dispersante. Aunque es muy difícil predecir matemáticamente el cambio de la fluorescencia, con la variación del perfil de concentración, a profundidades distintas del medio dispersante, Pollak [264] afirma que, mientras las determinaciones de fluorescencia en el modo de transmisión, son casi independientes de la distribución del material analizado en las distintas capas del soporte, las medidas de fluorescencia en el modo de reflexión, usualmente utilizado en las medidas de fluorescencia sobre superficies sólidas, son extremadamente dependientes de la distribución de la concentración.

De acuerdo con todo lo expuesto, parece necesario atribuir naturaleza individual a las curvas de calibración, según las condiciones experimentales en las que éstas se

realicen. Aunque las placas actuales para Cromatografía en Capa Fina de Alta Resolución, presentan características de tamaño de partícula, distribución de tamaños y grosor de capas, mucho mejores que las correspondientes a las placas de TLC convencionales, en cada método de análisis que se establezca es recomendable comprobar el tipo de relación existente entre la señal fluorescente medida y las concentraciones de fluoróforo.

En atención a lo expuesto, en este Capítulo se estudia la falta de linealidad de las curvas de calibrado de los derivados dansilados de la Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, utilizando placas de Gel de Sílice de HPTLC, después de eluidas con Cloroformo:TEA:POLE (8:4:5%)(v:v:m), con objeto de conocer la extensión de dicha falta de linealidad y establecer criterios que permitan asegurar la fiabilidad de los resultados. Además, se calculan los principales parámetros utilizados para caracterizar los métodos de análisis por HPTLC con detección fluorescente: sensibilidad, límite de detección, precisión y exactitud.

VII.2.- CALIBRACIÓN EN HPTLC.

La determinación cuantitativa de solutos separados mediante HPTLC, midiendo la radiación emitida por compuestos fluorescentes cuando son excitados a longitudes de onda apropiadas, se basa en la medida del tamaño del pico, área o altura. En nuestro caso, hemos basado el estudio en la medida de altura de pico.

Para establecer la relación existente entre la respuesta del detector y la concentración de analito sobre la placa cromatográfica, se han inyectado 7 muestras con cantidades distintas de la mezcla de derivados dansilados. Cada una de las inyecciones se han llevado a cabo por triplicado. Después de eluidas las placas con Cloroformo:TEA:POLE (8:4:5%), se leyeron las intensidades de fluorescencia máximas para cada uno de los analitos separados.

Ajuste Lineal

Asumiendo que la relación entre la señal suministrada por el detector y la cantidad (C_x) del derivado dansilado, es del tipo:

$$\text{Señal} = a + b \cdot C_x$$

se han establecido las características quimiométricas de la regresión lineal. Los resultados se han agrupado en la Tabla VII.1, mientras que en la Figura VII.1 se han representado las rectas correspondientes a cada una de las aminos estudiadas.

El valor de R^2 suele considerarse una buena indicación de la linealidad de las curvas de calibrado. En nuestro caso, la regresión lineal presenta valores máximos de 0.978, que no pueden considerarse elevados para el tipo de ajuste considerado. Por su parte, las desviaciones estándar del ajuste ($S_{y/x}$) son superiores, en todos los casos, a 20.

La linealidad de las curvas de calibrado también puede expresarse por el término $(1-DSR) \cdot 100$, siendo DSR la desviación estándar relativa de la pendiente de la recta de calibrado [281]. Los valores así obtenidos, para cada una de las aminos estudiadas, se encuentran en la Tabla VII.1 Como puede observarse, la linealidad calculada de esta manera presenta valores que oscilan entre el 92.7% y 93.9% para la Espermina y Cadaverina, repectivamente.

Los valores de los residuales, agrupados en las Tabla VII.2, no presentan una distribución simétrica alrededor de 0, tomando valores que llegan a alcanzar el 70%, a concentraciones bajas de analito. Si tenemos en cuenta las tendencias observadas, también con cantidades de aminos superiores a 150 ng, se obtendrían valores de los residuales alejados de cero. La distribución obtenida para los residuales, sugiere un ajuste curvilíneo en la relación señal analítica-cantidad de poliamina.

Tabla VII.1.- Características quimiométricas de la regresión lineal entre la señal analítica y la cantidad de poliamina.

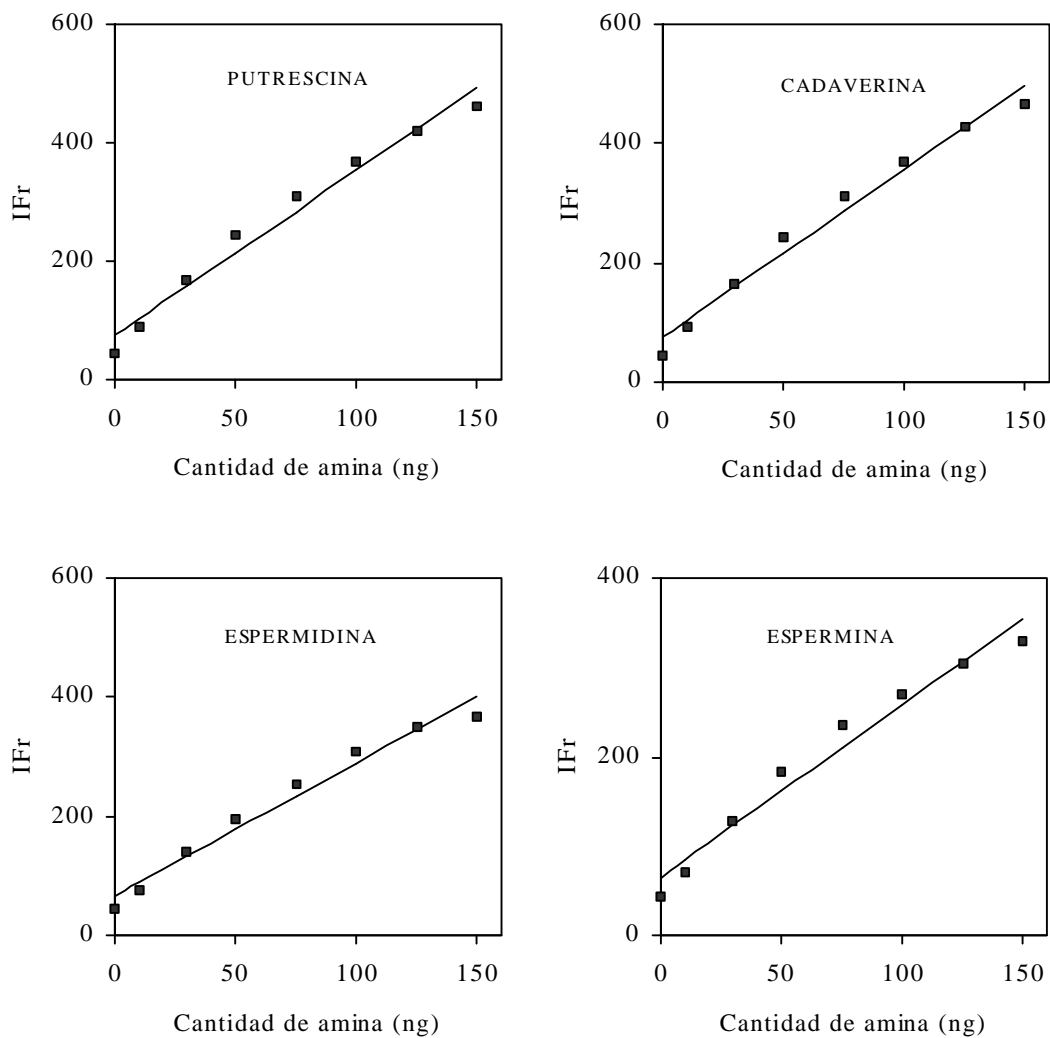


Figura VII.1.- Ajuste lineal de las curvas de calibración para los derivados dansilados de las poliaminas.

Parámetros	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
a	76.30±15.24	75.08±14.74	66.16±12.84	64.96±12.25
b	2.77±0.18	2.82±0.17	2.23±0.15	1.93±0.14
R ²	0.975	0.978	0.973	0.967
S _{y/x}	25.99	25.12	21.89	20.89
F	236.82	262.97	216.76	177.59
(1-DSR)·100	93.5	93.9	93.3	92.7

Tabla VII.2.- Residuales, expresados en porcentaje, determinados al realizar un ajuste lineal de la relación señal-cantidad de poliamina

Cantidades (ng) de poliaminas	Residuales (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
0	-73.41	-70.63	-50.37	-47.63
10	-15.59	-11.10	-16.46	-20.37
30	6.18	3.71	4.86	3.25
50	12.26	10.98	8.77	11.76
75	8.29	8.33	7.60	11.13
100	3.90	3.88	6.27	4.45
125	-0.95	0.19	1.57	-1.07
150	-6.56	-7.04	-9.06	-7.75

Una indicación de la linealidad o no linealidad de las curvas de calibrado, también puede obtenerse a partir de gráficos que representen la variación del tamaño del pico normalizado (señal normalizada), frente al logaritmo de la concentración o cantidad del

analito considerado. La señal normalizada es la diferencia relativa entre la señal registrada (S) y la obtenida a partir de la ecuación de la regresión lineal. Su valor puede calcularse mediante la expresión $(S-a)/b \cdot C_x$, siendo a y b la ordenada en el origen y la pendiente, respectivamente, de la recta obtenida por ajuste lineal y C_x la cantidad de analito. Si los valores experimentales se ajustasen en su totalidad a una línea recta, el logaritmo de la señal normalizada tendría un valor cero, o próximo a cero, en todos los casos. En la Figura VII.2 se muestran los gráficos resultantes de representar dicho término frente al logaritmo de la cantidad de amina dansilada.

Pueden observarse importantes desviaciones de la linealidad, especialmente en el caso representado, que corresponde a la determinación de poliaminas por HPTLC, utilizando la fase móvil que incorpora el surfactante POLE. En este caso, y usando alturas como medida del tamaño de pico, las desviaciones de la linealidad corresponden, preferentemente, a las cantidades bajas de las poliaminas.

Con objeto de comprobar la influencia de la falta de linealidad comentada, en la exactitud analítica, se han calculado los errores que se cometerían en las determinaciones de cada analito, usando los respectivos ajustes lineales, para diferentes cantidades de las poliaminas, dentro del rango estudiado. Los valores de dichos errores se encuentran agrupados en la Tabla VII.3.

Los resultados expuestos, así como los obtenidos para los otros métodos propuestos, ponen de manifiesto que, en general, para el análisis de aminas por cromatografía en capa fina, usando la fluorescencia como sistema de detección, la calibración lineal puede resultar inadecuada, ya que conduce a errores importantes cuando se trabaja con concentraciones bajas. Sin embargo, los errores resultan aceptables, especialmente para cantidades intermedias de los analitos.

Tabla VII.3.- Errores asociados a la determinación de aminas a partir del ajuste lineal de las curvas

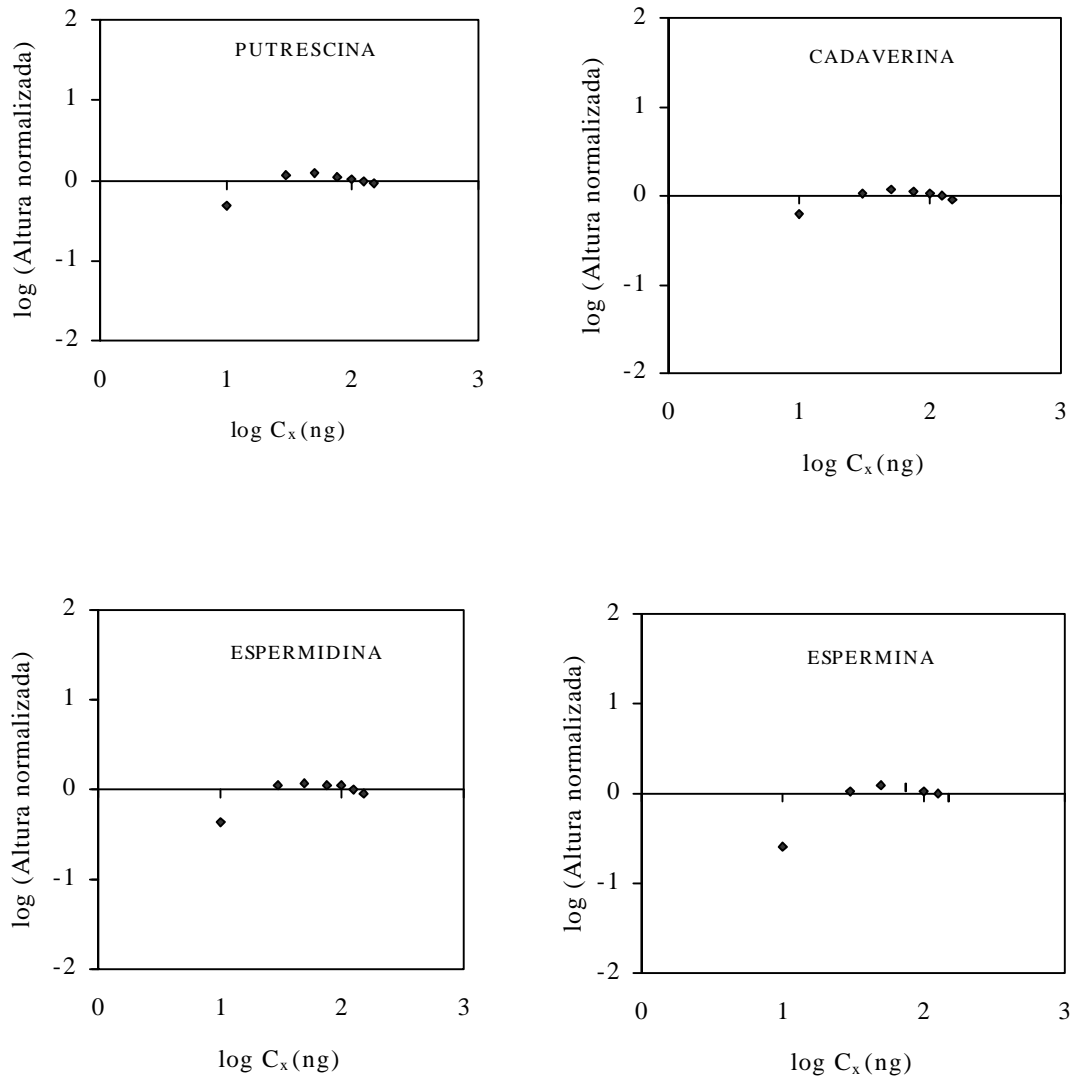


Figura VII.2.- Representación logarítmica de la señal normalizada frente a la cantidad de amina, para un ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot C_x$$

de calibrado.

Cantidad (ng) de amina puesta	Errores relativos (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
30	12.6	7.3	10.1	7.1
75	12.4	12.4	11.5	18.1
125	1.1	0.2	2.0	1.3

Sin embargo, de acuerdo con lo expuesto anteriormente, para cantidades bajas de amina, debe existir una relación lineal entre la señal cuantificada por el detector y la cantidad de analito. Efectivamente para concentraciones de amina dansilada inferior a los 50 ng, es posible obtener relaciones lineales entre la fluorescencia medida y la cantidad de amina inyectada, con valores de $R^2 > 0.99$. En la Tabla VII.4, se muestran los resultados para la calibración lineal en dicho rango.

Tabla VII.4.- Características quimiométricas de la regresión lineal señal-concentración para cantidades de amina inferiores a 50 ng.

Parámetros	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
a	47.29 ± 3.02	48.41 ± 3.87	45.52 ± 2.39	43.15 ± 0.76
b	3.99 ± 0.10	3.92 ± 0.13	3.03 ± 0.08	2.79 ± 0.026
R^2	0.999	0.998	0.998	0.999
$S_{y/x}$	3.92	5.02	3.10	0.98
F	1533	897	1411	11911
(1-DSR)-100	97.5	96.9	97.4	99.1

Ahora bien, si las muestras cubren un rango amplio de cantidades, es conveniente establecer algún procedimiento para minimizar los errores. En este sentido, hemos

considerado que un ajuste no lineal de las curvas permitiría evitar los errores asociados a las determinaciones analíticas.

Ajustes no lineales.

Los datos experimentales utilizados al comentar la linealidad de las curvas de calibrado de las aminas Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, han sido tratados para su ajuste a ecuaciones cuadráticas, cúbicas y potenciales del tipo:

$$\text{Señal} = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2 \quad \text{Ecuación 3}$$

$$\text{Señal} = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2 + d \cdot C_x^3 \quad \text{Ecuación 4}$$

$$\text{Señal} = a + b \cdot C_x^c \quad \text{Ecuación 5}$$

siendo C_x la cantidad de analito. Los valores obtenidos para los coeficientes a, b, c y d, así como las restantes características quimiométricas, para cada uno de los compuestos estudiados, se han agrupado en las Tablas VII.5 a VII.7. Las Figuras VII.3 a VII.5 muestran los resultados obtenidos al aplicar cada uno de los ajustes realizados.

Si consideramos los valores de R^2 como una medida de la validez de un ajuste, puede observarse que, en todos los casos, las ecuaciones explican, en más de un 99,9 %, la relación entre la señal analítica y la cantidad de amina. Este valor llega a ser superior al 99,5 en el caso de los ajustes cuadráticos y cúbicos. También para estos ajustes se obtienen los menores valores de las desviaciones estándar de los ajustes.

Tabla VII.5.- Características quimiométricas correspondientes a la regresión cuadrática ($y = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2$)

Parámetros	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
a	47.93 ± 4.03	47.45 ± 3.02	42.18 ± 3.03	42.08 ± 2.93
b	4.30 ± 0.14	4.32 ± 0.10	3.53 ± 0.10	3.17 ± 0.10
c	-0.01 ± 0.0009	-0.01 ± 0.0007	-0.009 ± 0.0007	-0.008 ± 0.0007
R ²	0.999	0.999	0.999	0.999
S _{y/x}	5.44	4.07	4.08	3.95
F	2762	5131.2	3196.5	2.566.6

Tabla VII.6.- Características quimiométricas correspondientes a la regresión curvilínea ($y = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2 + d \cdot C_x^3$)

Parámetros	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
a	43.45 ± 2.17	45.61 ± 3.33	44.82 ± 2.71	40.79 ± 3.49
b	4.89 ± 0.15	4.56 ± 0.23	3.19 ± 0.19	3.33 ± 0.24
c	-0.02 ± 0.002	-0.01 ± 0.004	0.003 ± 0.003	-0.01 ± 0.004
d	4.71E-05 ± 1.09E-5	1.93E-05 ± 1.68E-05	-2.77E-5 ± 1.36E-05	1.34E-05 ± 1.76E-05
R ²	0.999	0.999	0.999	0.999
S _{y/x}	2.56	3.94	3.20	4.12
F	8321.5	3642.5	3460.4	1568.3

Tabla VII.7.- Características quimiométricas correspondientes a la

regresión potencial ($y = a + b \cdot C_x^c$)

Parámetros	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
a	37.23± 8.69	37.95± 9.18	36.83± 11.26	36.43± 10.28
b	12.82± 2.60	12.07 ± 2.61	9.51± 3.19	9.39 ± 3.18
c	0.70± 0.04	0.72± 0.04	0.72± 0.06	0.69± 0.06
R ²	0.997	0.997	0.993	0.992
S _{y/x}	9.30	9.87	12.11	10.97
F	945	868	361	330.3

Por su parte, los valores de F llegan a ser más de diez veces superiores en los ajustes cúbicos y cuadráticos, frente a los lineales y potenciales.

Los valores de los residuales para cada uno de los ajustes propuestos, se agrupan en las tablas VII.8 a VII.10. En todos los casos presentan una distribución aleatoria. Los valores máximos obtenidos, alcanzan el 17% para el ajuste potencial, en el caso de la Espermina. Sin embargo, para todas las aminas, y al utilizar los ajustes cuadráticos y cúbicos no llegan a alcanzar el 10%.

Tabla VII.8.- Residuales, expresados en porcentajes, correspondientes al

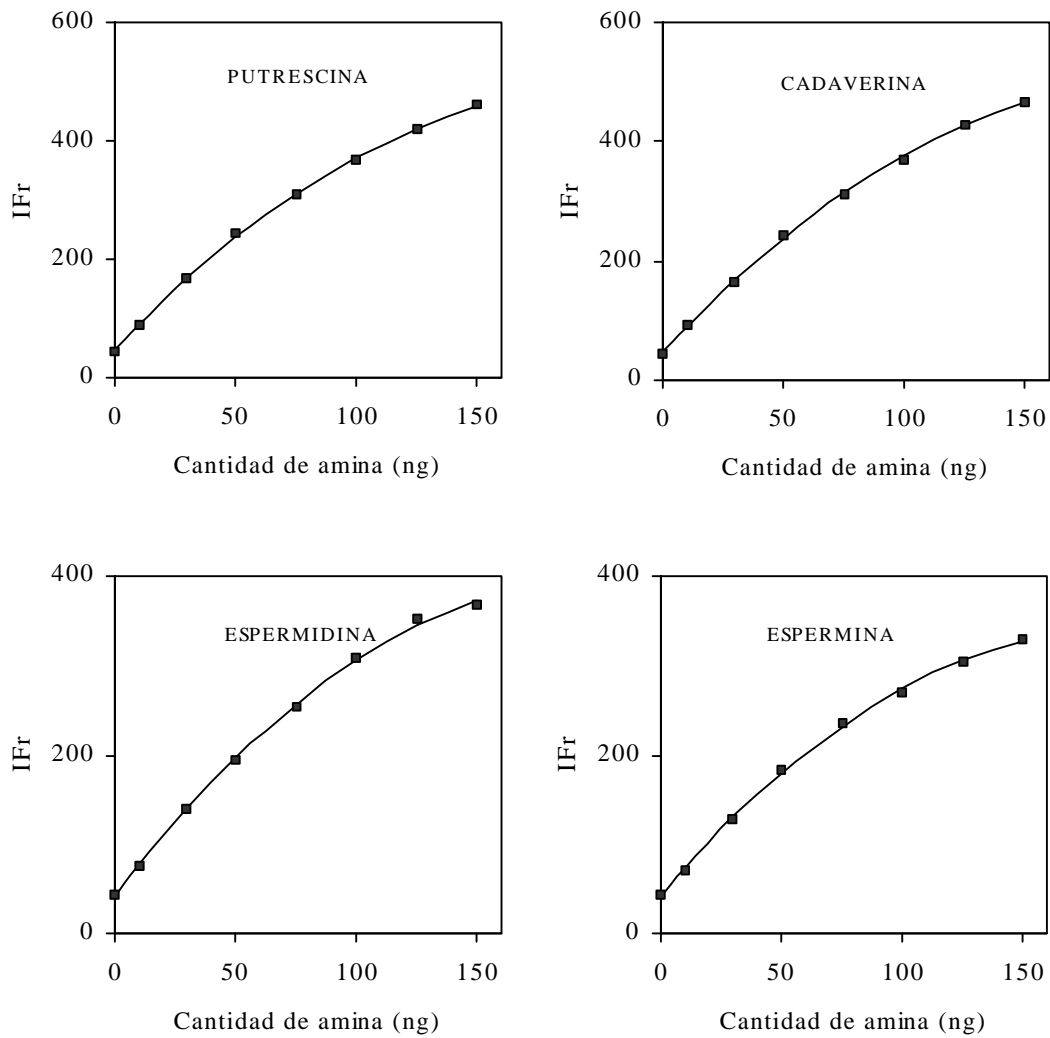


Figura VII.3.- Curvas de calibración cuadráticas para los derivados dansilados de aminas biogénicas

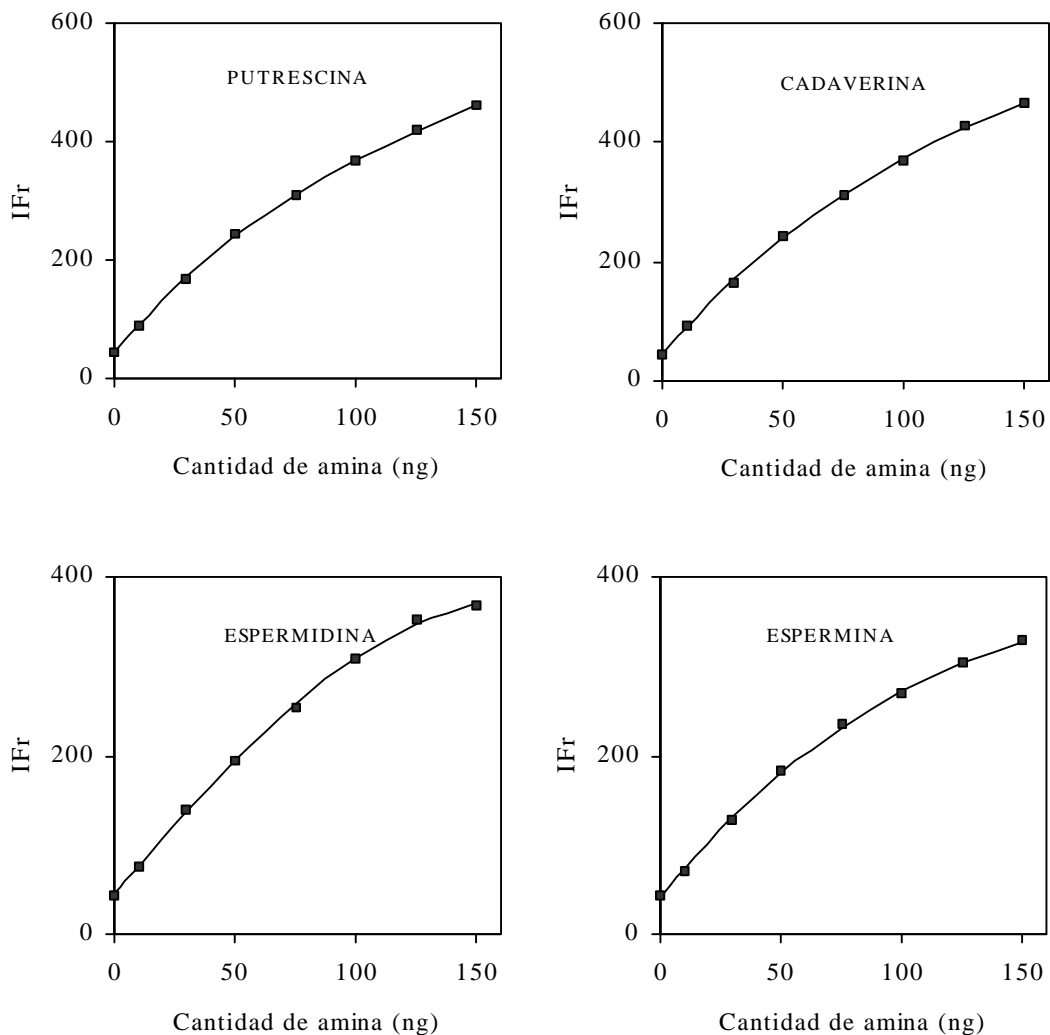


Figura VII.4.- Curvas de calibración cúbicas para los derivados dansilados de poliaminas dansiladas.

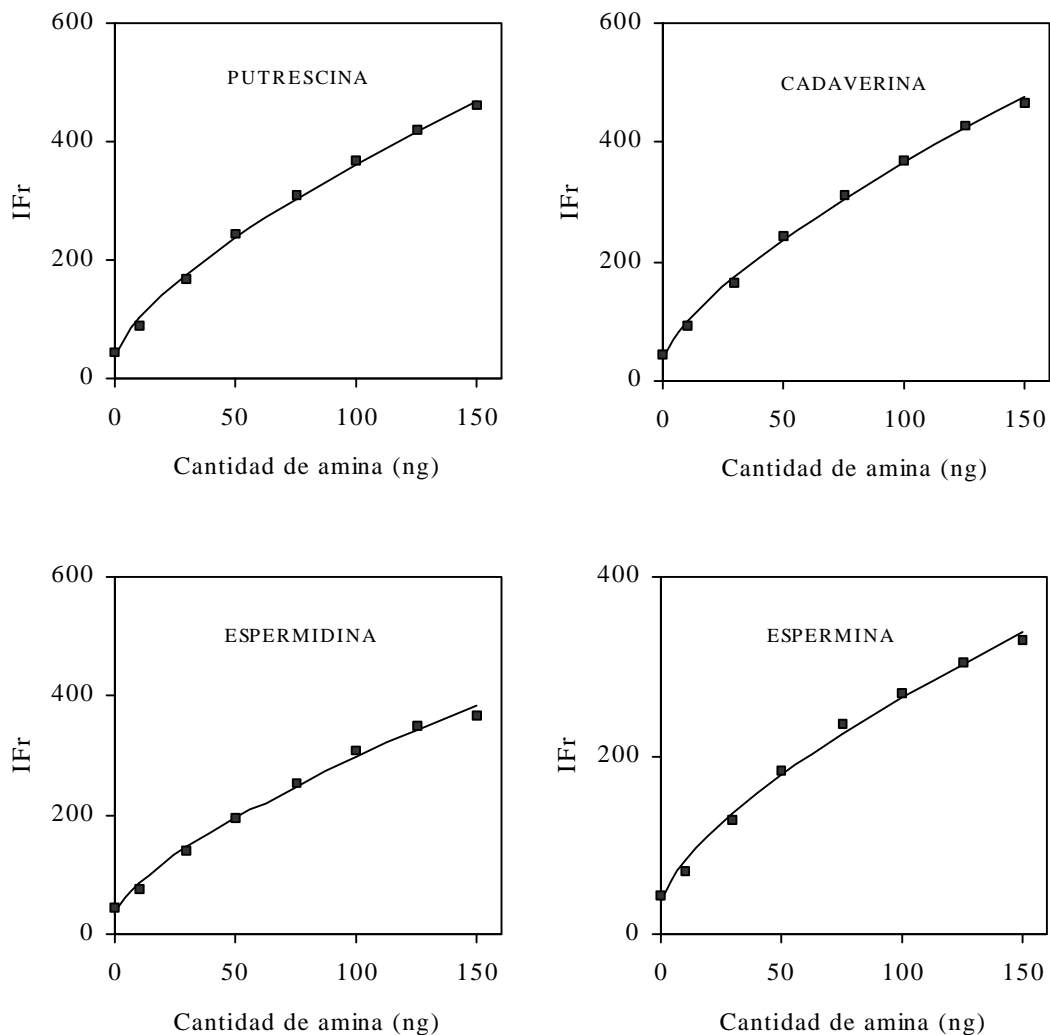


Figura VII.5.- Curvas de calibración potenciales para los derivados dansilados de poliaminas.

ajuste cuadrático.

Cantidades (ng) de poliaminas	Residuales (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
0	-8.94	-7.84	4.14	4.37
10	0.06	3.66	-0.78	-4.13
30	1.38	-1.06	-0.07	-1.92
50	3.27	2.15	-0.78	2.06
75	-0.59	-0.24	-1.60	1.72
100	-1.52	-1.34	0.80	-1.52
125	0.77	0.36	1.74	-0.88
150	0.91	0.18	-1.13	0.71

Tabla VII.9.- Residuales, expresados en porcentaje, correspondientes al ajuste cúbico.

Cantidades (ng) de poliaminas	Residuales (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
0	1.24	-3.66	-1.86	7.27
10	-0.30	3.51	-0.52	-4.26
30	-1.42	-2.24	1.93	-2.99
50	1.57	1.45	0.48	1.41
75	-0.51	-0.21	-1.66	1.75
100	-0.27	-0.84	-0.07	-1.03
125	0.29	0.78	0.99	-0.46
150	-0.07	-0.22	-0.40	0.32

Tabla VII.10.- Residuales, expresados en porcentajes, correspondiente al ajuste potencial.

Cantidades (ng) de poliaminas	Residuales (%)			
	Putrescina	Cadaverina	Espermidin a	Espermina
0	15.37	13.74	16.29	17.19
10	-13.16	-8.53	-13.88	-18.19
30	-4.13	-6.31	-4.49	-6.74
50	3.12	2.14	0.09	2.93
75	2.16	2.47	1.89	5.32
100	1.39	1.47	3.97	1.97
125	0.20	1.26	2.58	0.06
150	-1.78	-2.46	-4.52	-2.95

Las representaciones de las variaciones del logaritmo del tamaño de pico normalizado frente al logaritmo de la concentración, para cada una de las aminas y para las tres ecuaciones consideradas, se presentan en las Figuras VII.6 a VII.8. Se puede observar, que para los ajustes de segundo y tercer grado, la señal normalizada es próxima a 1 en todos los casos.

Al comparar las concentraciones puestas y las halladas mediante las ecuaciones anteriores, se han obtenido los errores que se indican en la Tabla VII.11. Se observa que los errores cometidos mediante la utilización de ajustes no lineales son sensiblemente inferiores a los obtenidos con ecuaciones lineales, principalmente para los ajustes cuadrático y cúbico. Esto pone de manifiesto la conveniencia de realizar ajustes no lineales en las curvas de calibrado.

Teniendo en cuenta los resultados expuestos, en lo sucesivo adoptaremos el ajuste cuadrático como el que mejor explica la relación entre la intensidad de fluorescencia medida y las cantidades de analito.

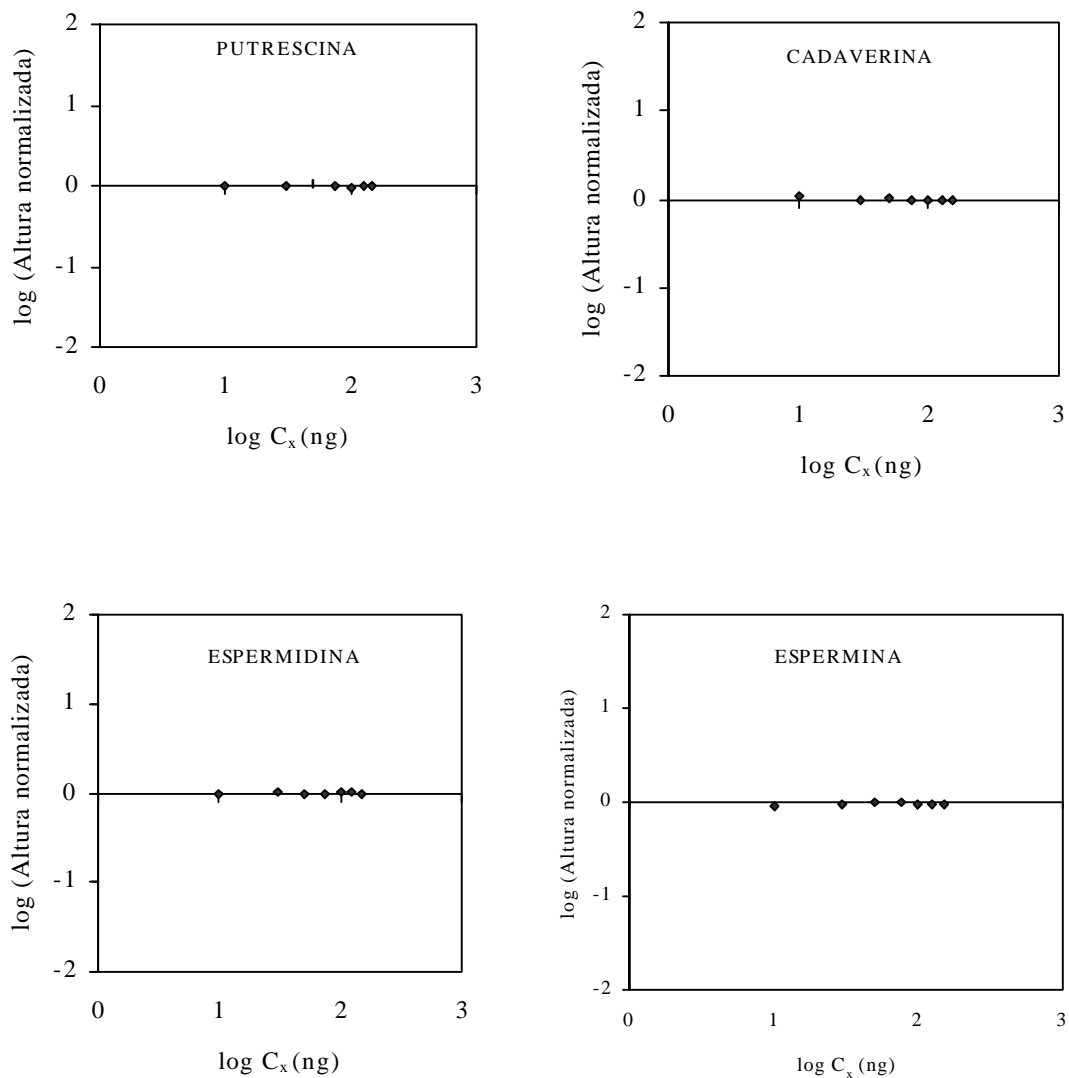


Figura VII.6.- Representación logarítmica de la señal normalizada frente a la cantidad de amina, para un ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2$$

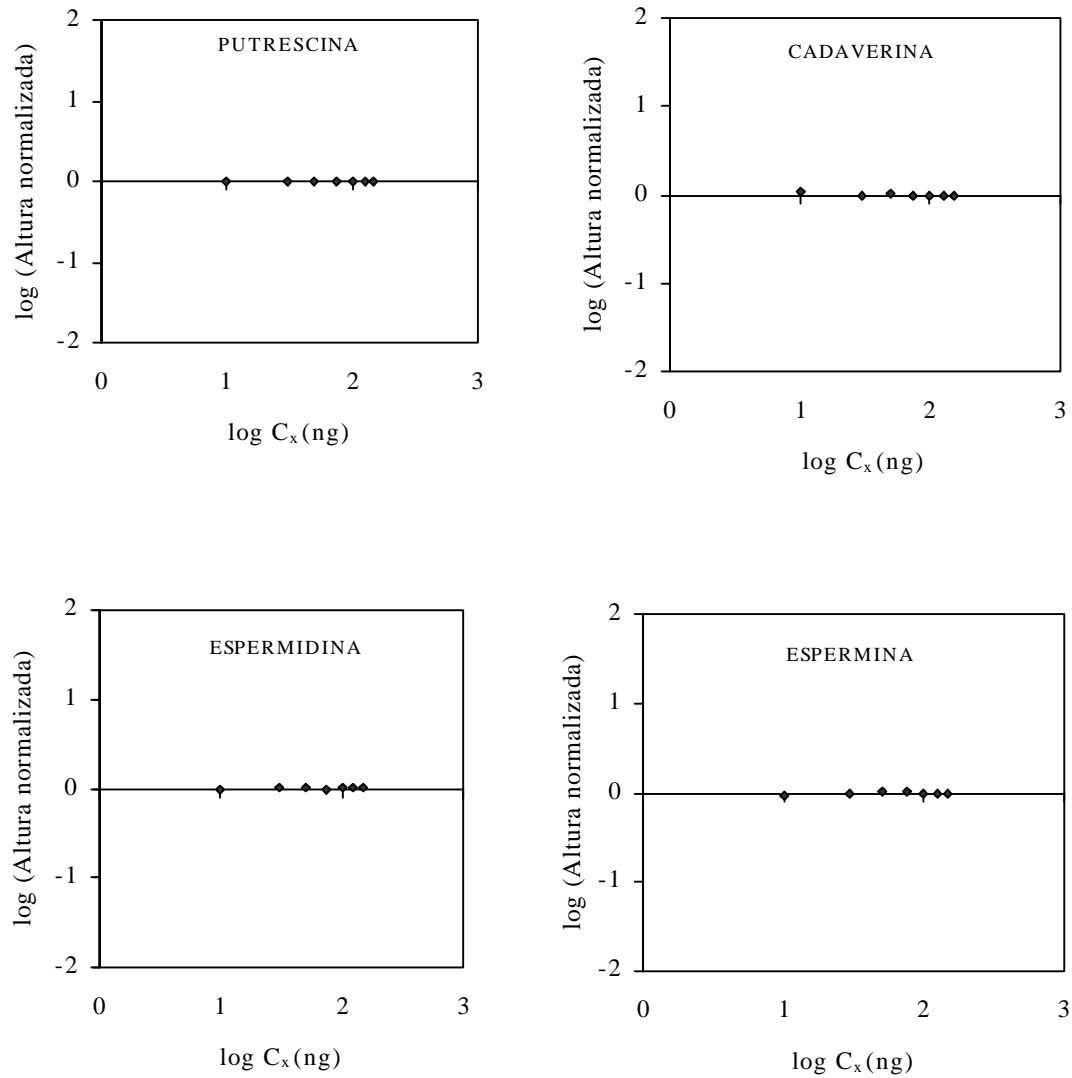


Figura VII.7.- Representación logarítmica de la señal normalizada frente a la cantidad de amina, para un ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot C_x + c \cdot C_x^2 + d \cdot C_x^3$$

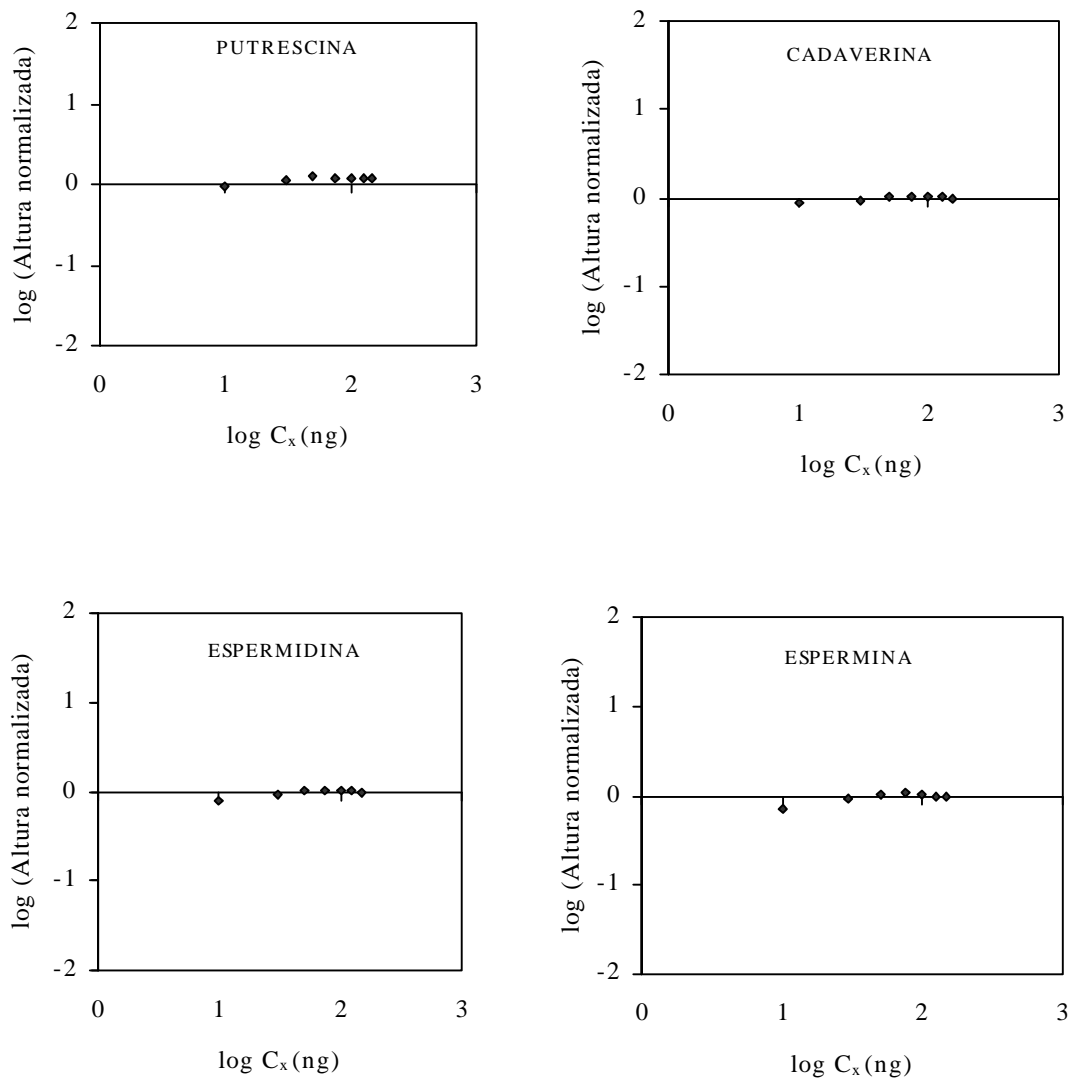


Figura VII.8.- Representación logarítmica de la señal normalizada frente a la cantidad de amina, para un ajuste del tipo:

$$y = a + b \cdot C_x^c$$

Tabla VII.11.- Errores obtenidos en las determinaciones de las poliaminas consideradas, al utilizar diferentes tipos de ajustes cuurvilineos.

Poliaminas	Cantidad (ng) de poliamina	Errores relativos (%)		
		Aj. Cuadrático	Aj. Cúbico	Aj. Potencial
Putrescina	30	2.1	2.1	7.1
	75	0.9	0.8	3.6
	125	1.5	0.5	0.3
Cadaverina	30	1.6	3.3	10.4
	75	0.4	0.3	4.1
	125	0.7	1.5	2.0
Espermidina	30	0.1	3.1	7.9
	75	2.4	2.4	3.2
	125	3.9	2.4	4.2
Espermina	30	3.1	4.7	5.3
	75	2.9	3.0	9.8
	125	2.0	1.0	0.1

VII.3.- CARACTERÍSTICAS ANALÍTICAS.

Con independencia de los problemas de linealidad estudiados en el apartado anterior, la calibración permite obtener información básica acerca de características de interés analítico referidas a la determinación de las aminos.

Sensibilidad

Según la IUPAC [180], la sensibilidad de un método analítico representa la variación en la respuesta del detector, originada por unidad de concentración del analito, es decir, la sensibilidad se corresponde con el cociente entre la señal instrumental y la concentración de la especie analizada. Esta relación coincide con la pendiente de la recta de calibrado y depende, por tanto, de las condiciones instrumentales utilizadas y se le conoce como *sensibilidad de calibración (SC)*.

Diversos autores [278, 279] han sugerido introducir el término *sensibilidad analítica (SA)*. Este parámetro suministra una información más completa al tener en cuenta la precisión, además de la pendiente de la curva analítica. Se basa en el hecho de que el valor numérico de la sensibilidad, debería expresar la variación mínima de concentración de analito que es capaz de discernir un método analítico. La sensibilidad analítica se calcula mediante la expresión b/s_s , donde b es la pendiente de calibración y s_s indica la desviación estándar de las medidas de la señal analítica a una concentración dada. La desventaja de la sensibilidad analítica es que debe ser evaluada para todas las concentraciones de interés. Incluso, para curvas analíticas lineales, donde la sensibilidad de calibración permanece constante, la sensibilidad analítica varía con la concentración del analito.

Una expresión más apropiada para la sensibilidad analítica sería aquella que tuviera en cuenta el análisis de regresión, cuyo valor es característico del método de calibración instrumental e independiente del instrumento usado y de las transformaciones matemáticas llevadas a cabo sobre las lecturas de las medidas.

$$SA = b/S_{y/x}$$

siendo, $S_{y/x}$ la desviación estándar de la regresión lineal y b la pendiente de la recta de calibrado. La sensibilidad analítica así definida, resulta más apropiada a la hora de caracterizar un método analítico.

Tal como hemos comentado anteriormente, la relación entre la altura de pico y la

concentración de amina cromatografiada no resulta una relación lineal, sino que se ajusta a una ecuación de segundo grado. Pues bien, a la hora de determinar la sensibilidad, hemos tenido en cuenta solamente el tramo lineal de las curvas de calibrado que, como hemos visto, se consigue para concentraciones de derivado dansilado inferiores a 50 ng. Los valores calculados para cada una de las aminas estudiadas se encuentran en la Tabla VII.12.

Tabla VII.12.- Sensibilidades para la determinación de aminas biogénicas

Amina	Sensibilidad de calibración	Sensibilidad Analítica
	$IF_r \cdot \text{ng}^{-1}$	ng^{-1}
Putrescina	3.99	1.02
Cadaverina	3.92	0.78
Espermidina	3.03	0.98
Espermina	2.79	2.84

Las aminas estudiadas presentan sensibilidades de calibración comprendidas, aproximadamente, entre el 2.8 y el 4% (IF_r/ng). En cuanto a la sensibilidad analítica, los valores obtenidos son próximos a la unidad, excepto en el caso de la Espermina, que presenta un valor superior al resto de las aminas, debido al bajo valor de la desviación estándar del ajuste que presenta su recta de calibración.

También es posible establecer la sensibilidad de calibración como la relación señal/concentración correspondiente a cada punto de la curva de calibrado. La Figura VII.9 muestra la representación de la sensibilidad de calibración frente a la concentración de amina dansilada. Se observa, como cabía esperar, que las mejores sensibilidades de calibración se obtienen para cantidades bajas de analito.

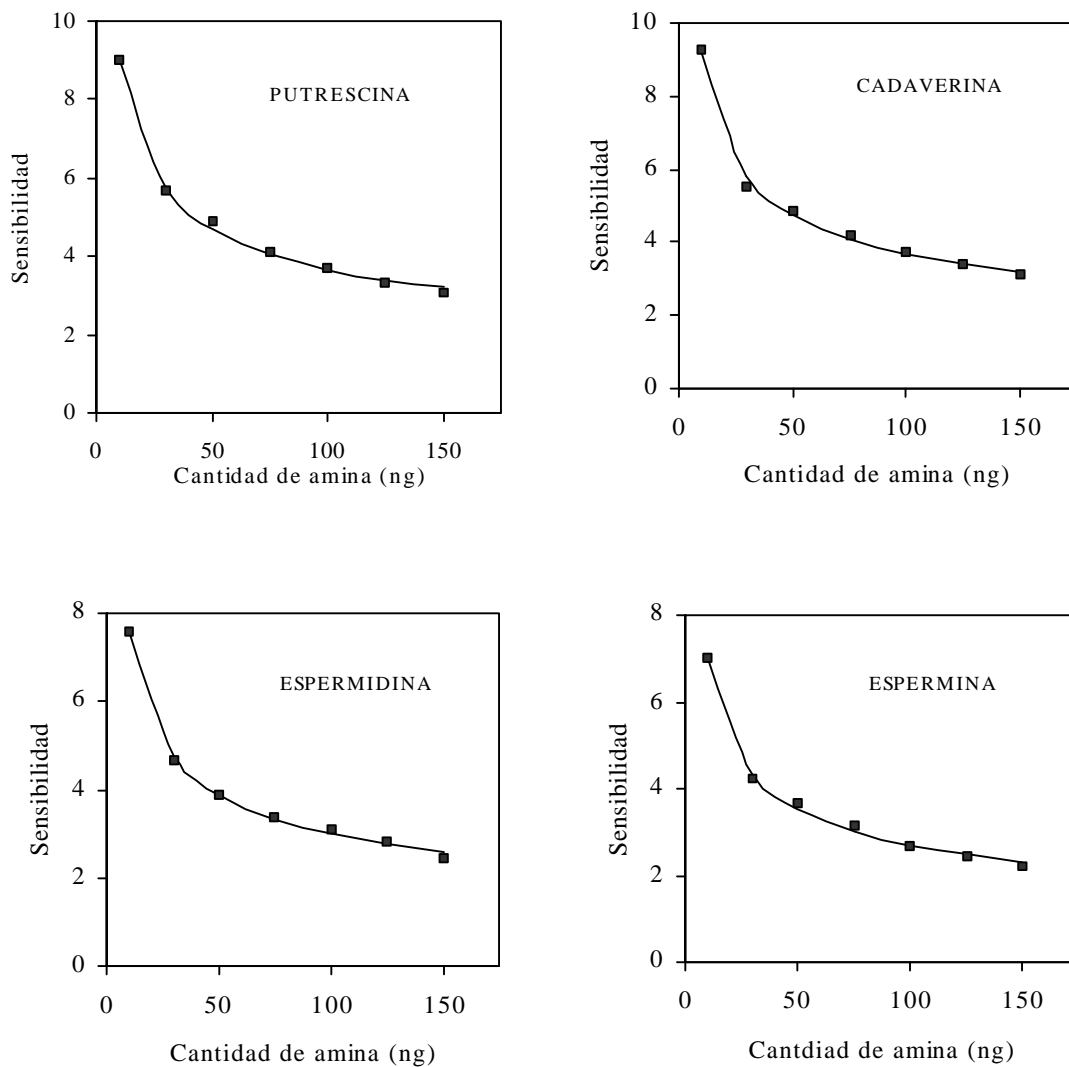


Figura VII.9.- Variación de la sensibilidad de calibración en función de la cantidad de dansilamina.

Límite de detección

Existen diferentes formas para calcular el límite de detección de un método analítico. Para métodos instrumentales de análisis, la IUPAC recomienda definir el límite de detección como la concentración cuya señal corresponde a la media del blanco más tres veces la desviación estándar del blanco:

$$y = y_B + 3S_B \quad (5)$$

Sin embargo, esta expresión no tiene en cuenta la imprecisión del valor de la pendiente y la ordenada en el origen obtenida en la regresión.

El límite de detección, según Winefordner [280]), expresado como la cantidad (C_L) que corresponde a la medida más pequeña que puede ser detectada con razonable certeza, viene dado por la expresión:

$$C_L = \frac{K[S_B^2 + S_a^2 + (a/b)^2 S_b^2]^{1/2}}{b} \quad (6)$$

donde b y a son, respectivamente, la pendiente y la ordenada en el origen de la recta de calibrado; S_B , S_a y S_b son las desviaciones estándar del blanco, de la ordenada en el origen y de la pendiente, respectivamente, y K es un factor numérico escogido de acuerdo con el nivel de confianza deseado.

Para técnicas como las cromatográficas, en las que no es posible realizar determinaciones de blancos, una estimación aproximada del límite de detección, propuesta por Cuadros y colaboradores [281], puede calcularse mediante la expresión:

$$LD = 3 \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{(n+2)}{n+1}} \quad (7)$$

en la que n representa el número total de pares de valores utilizados para establecer la recta de calibrado, mientras que $S_{y/x}$ y b tienen el mismo significado antes indicado.

Ahora bien, un supuesto fundamental del método de los mínimos cuadrados sin ponderar, es que cada punto en la representación gráfica, incluido el que representa el blanco, tiene una variación que se distribuye normalmente con una desviación estándar estimada por $S_{y/x}$. Por lo tanto, es apropiado utilizar $S_{y/x}$, en lugar de S_B , en la estimación del límite de detección. El valor de a , la ordenada en el origen calculada, puede utilizarse como una estimación de y_B , la propia señal del blanco. De aquí, que el límite de detección podría expresarse como la concentración cuya señal corresponda a la ordenada en el origen más tres veces la desviación estándar de la regresión [282].

$$Y = a + 3 \cdot S_{y/x} \quad (4)$$

Las expresiones (6) y (7) para el cálculo del límite de detección, exigen la existencia de una relación lineal entre la señal medida y la concentración de analito. Como hemos visto anteriormente, en el caso que nos ocupa no existe una relación lineal entre la fluorescencia medida y la concentración de analito inyectado en la placa, por lo que, en ambos casos de ajustes, consideraremos solamente el tramo lineal de las curvas de calibración.

Para el cálculo del límite de detección se realizaron siete barridos de la placa cromatográfica, después de eluidas en las mismas condiciones experimentales que las empleadas para obtener la curva de calibrado. Con los resultados obtenidos ($y_B=44.12$ y $S_B=0.711$) y asumiendo como recomendable un valor de $K = 3$, para un nivel de confianza del 99.9%, se obtienen los valores del límite de detección, para cada una de las aminas estudiadas, y para los diferentes ajustes llevados a cabo, excluyendo el lineal.

De los valores agrupados en las Tablas VII.13 a VII.16, se puede observar que con la excepción del procedimiento recomendado por la IUPAC, que conduce, en algunos casos, incluso a valores negativos, los otros procedimientos, con pocas excepciones, presentan buena concordancia para los distintos métodos de cálculo y de ajuste.

Tabla VII.13.- Diferentes límites de detección para la Putrescina

Ecuaciones	Tipos de ajuste / Límites de detección (ng)			
	Tramo Lineal	Cuadrático	Cúbico	Potencial
$x_b + 3 \cdot S_b$	-0.26	-0.39	0.57	0.61
$a + 3 \cdot S_b$	0.53	0.49	0.44	0.08
$a + 3 \cdot S_{y/x}$	2.94	3.83	1.58	3.03
Ecuación 6	2.41			
Ecuación 7	2.5			

Tabla VII.14.- Diferentes límites de detección para la Cadaverina

Ecuaciones	Tipos de ajuste / Límites de detección (ng)			
	Tramo Lineal	Cuadrático	Cúbico	Potencial
$x_b + 3 \cdot S_b$	-0.55	-0.28	0.14	0.59
$a + 3 \cdot S_b$	0.54	0.49	0.47	0.09
$a + 3 \cdot S_{y/x}$	3.85	2.85	2.61	3.49
Ecuación 6	3.09			
Ecuación 7	3.25			

Tabla VII.15.- Diferentes límites de detección para la Espermidina

Ecuaciones	Tipos de ajuste / Límites de detección (ng)			
	Tramo Lineal	Cuadrático	Cúbico	Potencial
$x_b + 3 \cdot S_b$	0.24	1.16	0.45	0.99
$a + 3 \cdot S_b$	0.70	0.60	0.67	0.12
$a + 3 \cdot S_{y/x}$	3.06	3.50	3.03	6.46
Ecuación 6	2.51			
Ecuación 7	2.74			

Tabla VII.16.- Diferentes límites de detección para la Espermina

Ecuaciones	Tipos de ajuste / Límites de detección (ng)			
	Tramo Lineal	Cuadrático	Cúbico	Potencial
$x_b + 3 \cdot S_b$	1.11	1.32	1.64	1.06
$a + 3 \cdot S_b$	0.76	0.67	0.64	0.12
$a + 3 \cdot S_{y/x}$	1.05	3.78	3.76	6.11
Ecuación 6	0.88			
Ecuación 7	1.19			

Precisión y exactitud

Para calcular la precisión de las determinaciones, según los tres tipos de ajuste empleados: cuadrático, cúbico y potencial, se realizaron 7 medidas de una disolución patrón de cada uno de los derivados dansilados de las aminas en estudio. Las

concentraciones se han hallado midiendo altura de pico y determinando la cantidad de amina directamente de la calibración establecida. Los parámetros obtenidos al realizar la evaluación estadística de dichos resultados, para cada una de las aminas, se muestran en las Tablas VII.17 a VII.20.

De acuerdo con lo resultados expuestos, y tomando un nivel de confianza de 95% y 6 grados de libertad ($t_{\text{tabulado}} = 2.447$), podemos concluir que para las aminas estudiadas, es el ajuste cuadrático el que en todos los casos conduce a métodos correctos y suficientemente precisos.

Tabla VII.17.- Parámetros estadísticos representativos de la precisión y exactitud en la determinación de 27.5 ng de Putrescina, según el ajuste llevado a cabo en la calibración.

Parámetros	Tipo de ajuste		
	Cuadrático	Cúbico	Potencial
O	27.72	27.00	27.68
S	0.33	0.34	0.38
CV(%)	1.20	1.28	1.39
E(%)	1.11	1.18	1.29
t_{exp}	0.658	1.44	0.474
t'_{exp}	1.742	3.81	1.254

Tabla VII.18.- Parámetros estadísticos representativos de la precisión y

exactitud en la determinación de 29.0 ng de Cadaverina, según el ajuste llevado a cabo en la calibración.

Parámetros	Tipo de ajuste		
	Cuadrático	Cúbico	Potencial
O	28.99	28.69	28.98
S	0.13	0.14	0.15
CV(%)	0.45	0.47	0.52
E(%)	0.42	0.44	0.48
t_{exp}	5.44E-02	2.29	0.11
t'_{exp}	0.144	6.06	0.299

Tabla VII.19.- Parámetros estadísticos representativos de la precisión y exactitud en la determinación de 28.5 ng de Espermidina, según el ajuste llevado a cabo en la calibración.

Parámetros	Tipo de ajuste		
	Cuadrático	Cúbico	Potencial
O	28.66	29.18	29.12
S	0.24	0.24	0.28
CV(%)	0.83	0.81	0.52
E(%)	0.77	0.75	0.96
t_{exp}	0.689	2.851	2.22
t'_{exp}	1.823	7.54	5.88

Tabla VII.20.- Parámetros estadísticos representativos de la precisión y exactitud en la determinación de 29.0 ng de Espermidina, según el ajuste llevado a cabo en la calibración.

Parámetros	Tipo de ajuste		
	Cuadrático	Cúbico	Potencial
O	29.05	28.75	29.53
S	0.24	0.25	0.29
CV(%)	0.84	0.86	0.98
E(%)	0.78	0.80	0.90
t_{exp}	0.193	0.999	1.85
t'_{exp}	0.511	2.644	4.91

De acuerdo con los resultados expuestos el método propuesto para la determinación de poliaminas presenta una buena repetibilidad, permitiendo una alta precisión en los análisis. Sin embargo, para asegurar la exactitud es necesario un estricto programa del control de calidad externo e interno. En particular, son aspectos críticos, la preparación de disoluciones de calibración, las placas utilizadas, la fase móvil, etc.

Si bien los gráficos de control se utilizan para distintos fines, su interés para el analista reside en que constituyen un medio indispensable para monitorizar la precisión y exactitud del proceso analítico.

Los gráficos de control se han obtenido del análisis cromatográfico de una muestra de aminos previamente dansiladas según el procedimiento descrito.

Como valor central hemos considerado la media, y como límites de aviso y de acción se han utilizado los intervalos definidos por $\bar{x} \pm 2s$ y $\bar{x} \pm 3s$, respectivamente. Los datos experimentales con objeto de determinar dichos valores se recogen en la Tabla

VII.17.

Dicha muestra de control, conservada a 4 °C, fue analizada a lo largo del tiempo. Los resultados se recogen en los gráficos de control, para cada una de las aminas estudiadas, representados en la Figura VII.10. De acuerdo con dichos resultados, el sistema en estudio está dentro del control estadístico.

Tabla VII.17.- Datos experimentales empleados en el gráfico de control

Experiencia (n°)	Putrescina	Cadaverina	Espermidina	Espermina
1	49.12	48.41	50.00	50.48
2	50.64	51.61	49.15	48.40
3	50.95	50.55	51.23	50.22
4	49.73	49.76	49.49	50.23
5	49.9	50.00	49.95	49.99
6	51.72	49.57	50.67	51.28
7	49.87	50.17	49.87	49.85
8	50.15	50.22	49.96	49.89
O	50.26	50.04	50.04	50.08
S	0.813	0.905	0.649	0.822

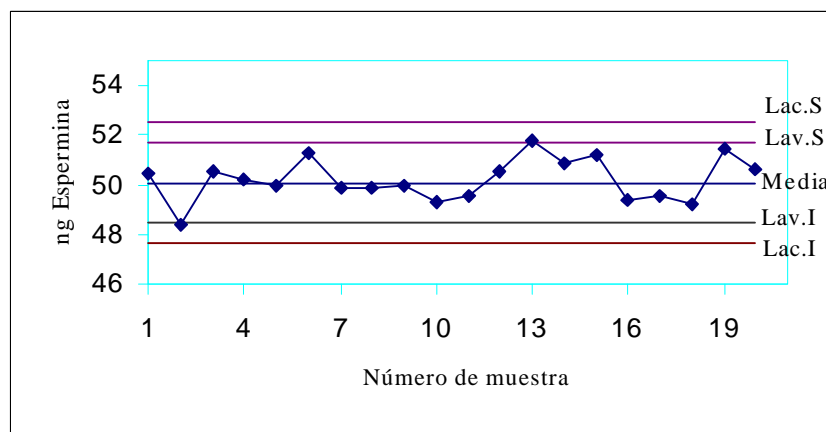
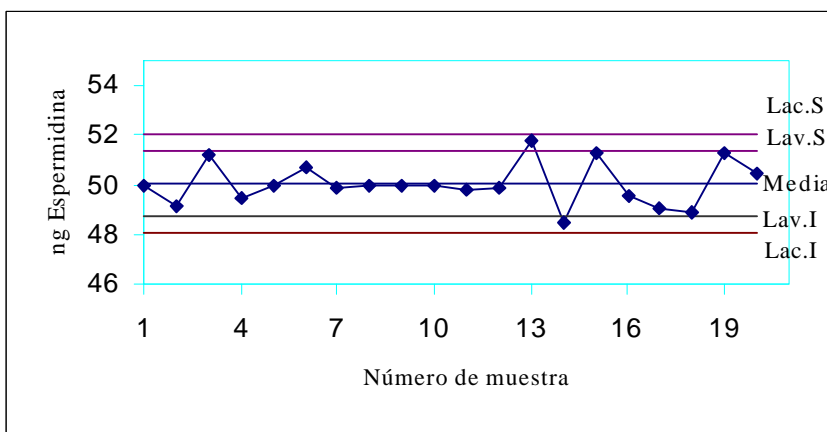
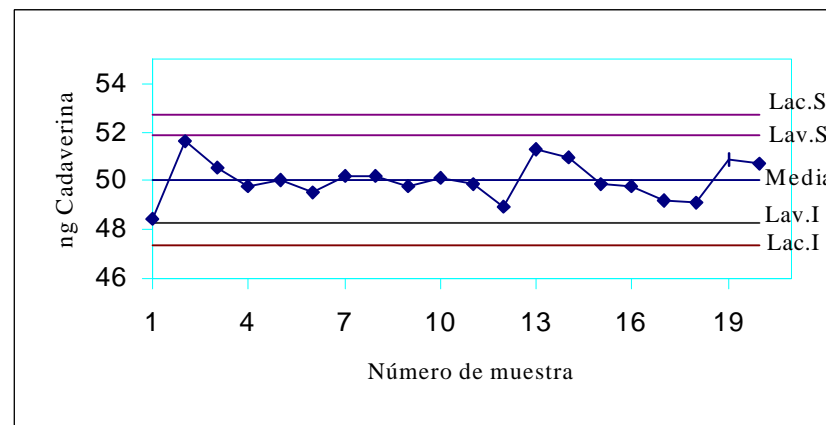
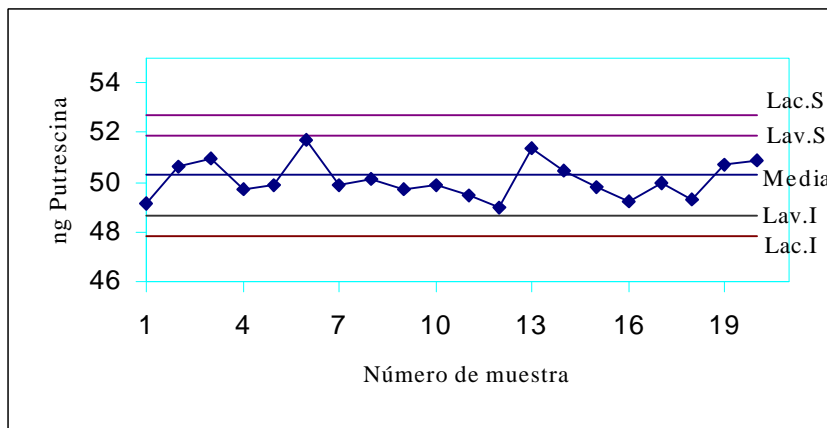


Figura VII.10.- Gráficos de control de las poliaminas dansiladas

Conclusiones

-
- 1.- El estudio de las características espectrofluorimétricas de los derivados del Indol: ácido Indol-3-Acético, Triptófano, 5-Hidroxitriptófano y Serotonina, sobre distintos soportes sólidos, pone de manifiesto que la intensidad de la fluorescencia emitida es el parámetro que presenta mayores variaciones al modificar la naturaleza del soporte y de los solutos. Sus valores máximos se alcanzan con el 5-Hidroxitriptófano, seguido de la Serotonina y el Triptófano, sobre soportes de papel.
 - 2.- Se establece un nuevo método para la separación y cuantificación de los compuestos derivados del Indol por TLC, usando Cloroformo:Metanol:Amoniaco (12:7:1) (v:v:v) como eluyente, Celulosa como fase estacionaria y detección fluorescente “in situ” a $\lambda_{exc}=280$ nm y $\lambda_{em}=347$ nm. Los compuestos se determinan en un rango de concentraciones de 10-100 ng, presentando desviaciones estándar relativas comprendidas entre 1.70 y 6.52 %, y límites de detección que oscilan entre 16.39 ng para el 5-Hidroxitriptófano y 22.50 ng para el ácido Indol-3-Acético.
 - 3.- Se estudian los diferentes parámetros que controlan la velocidad de calentamiento en un horno de microondas y su influencia en las reacciones de derivatización de las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, con Cloruro de Dansilo. Después de la optimización de las variables experimentales, se consiguen reacciones cuantitativas en tiempos inferiores a cinco minutos, lo que supone un aumento de 150 veces en la velocidad de reacción, con respecto al método de dansilación a temperatura ambiente que se ha venido utilizando habitualmente.
 - 4.- Para la determinación de poliaminas dansiladas, se ha establecido un nuevo método de análisis, mediante HPLC con fase inversa de C-18 y elución mediante un gradiente de Acetonitrilo:Agua. Para los distintos analitos, las desviaciones estándar relativas oscilan entre 1.53 y 2.07, mientras que los límites de detección se
-

encuentran comprendidos entre 0.35 y 1.74 ng.

- 5.- Al establecer el comportamiento fluorescente de los derivados dansilados de las poliaminas: Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, sobre soportes sólidos, se observa que, mientras las longitudes de onda de excitación y emisión no se modifican significativamente, en función del soporte utilizado, sí experimentan cambios importantes las intensidades de la radiación emitida. En soportes de microcelulosa y de papel, dicho parámetro llega a presentar valores que superan en tres veces los obtenidos en otros soportes.
 - 6.- Para la determinación de las poliaminas dansiladas, Se establece un nuevo método de HPTLC, usando una fase móvil Cloroformo:Trietilamina (2:1) (v:v), y Gel de Sílice como fase estacionaria. La detección fluorimétrica se lleva a cabo sobre el soporte a $\lambda_{exc} = 338$ nm y $\lambda_{em} = 502$ nm. Los compuestos se determinan en un rango de 2-85 ng, con desviaciones estándar que se encuentran entre 1.75 y 2.39 ng, y límites de detección comprendidos entre 1.80 y 3.99 ng.. El método fue aplicado, con buenos resultados, a la determinación de putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina en tejidos de plantas.
 - 7.- La incorporación de surfactantes no iónicos, como aditivos a la fase móvil empleada para la separación por HPTLC de los derivados dansilados de las poliaminas, provoca aumentos importantes en la intensidad de la fluorescencia emitida. Con un 5% (m:v) del tensioactivo Polioxietilen-10-lauriléter, incorporado a una fase móvil de Cloroformo:Trietilamina, se producen pequeñas modificaciones en la retención y resolución cromatográfica, pero se obtienen valores de relación señal/ruido entre 4.5 y 9 veces superiores a los obtenidos sin la adición del tensioactivo.
 - 8.- Se establece un nuevo método para la determinación de derivados dansilados de Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina por HPTLC, utilizando como fase estacionaria Gel de Sílice y como fase móvil Cloroformo:Trietilamina:Polioxietilen-10-lauriléter (8:4:5%) (v:v:m). Los compuestos son determinados en el rango de
-

0.5-85 ng de amina libre, con desviaciones estándar comprendidas entre 0.44 y 1.16 %, y límites de detección entre 0.18-0.39 ng, comparables a los obtenidos por otros métodos cromatográficos.

- 9.- Con la utilización del método de análisis que se acaba de describir, se ha establecido el contenido de Putrescina, Cadaverina, Espermidina y Espermina, en muestras comerciales de cerveza, sin necesidad de etapas previas de clean-up o de preconcentración. Los resultados obtenidos son concordantes con los aportados por otros autores y ponen de manifiesto que existen relaciones estadísticas entre los contenidos de poliaminas.
- 10.- Se estudia la relación existente entre la respuesta del sensor de fibra óptica y el contenido de las poliaminas retenidas sobre un soporte de Gel de Sílice. Se establece la falta de linealidad de dichas curvas de calibración y se muestra que, un ajuste cuadrático, es el que mejor explica la relación entre la intensidad de fluorescencia medida y las cantidades de analito. Asimismo, se comparan las características analíticas del método, para los distintos tipos de ajuste de las curvas de calibración.
-

Bibliografia

-
- [1] F. W. Went, *Recl. Trav. Bot Néerl.* **25**, 1 (1928).
- [2] F. Kögl y D.G.F.R. Kostermanns , *Physiol. Chem.*, **228**, 113 (1934).
- [3] R. Heerkloss y E. Libbert, *Biol. Plantarum*, **18**, 327 (1976).
- [4] R. Heerkloss y E. Libbert, *Planta*, **131**, 299 (1976).
- [5] P. Larsent, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **2**, 169 (1951).
- [6] S.A. Gord, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **5**, 341 (1954).
- [7] E. Libbert, N. Erdamm y U. Schiewer, *Auxinbiosynthese. Biol. Rundsch.*, **8**, 369 (1970).
- [8] E.A. Schneider y F. Wightman, *Annu. Rev. Plant. Physiol.*, **25**, 487 (1974).
- [9] N. Erdmann y U. Schiewer, *Planta*, **97**, 135 (1971).
- [10] G.B. Baker y R.T. Coutts, *Analysis of Biogenic Amines*, Part A, Vol. 4, Elsevier Scientific Publishing Company, (1982).
- [11] Z.M. Kawka, *Am. J. Pharmacol.*, **139**, 136 (1967).
- [12] G. Curzon, *Adv. Pharmacol.*, **6**, 161 (1968).
- [13] L.E. DeLisi, L.M. Neckers, D.R. Weinberger y R.J. Wyatt, *Arch. Gen. Psychiat.*, **38**, 647 (1981).
- [14] J.E. Hardebo, L. Edvinsson, L. Owman y Ch. Svengaard, *Neurology*, **28**, 64 (1978).
- [15] A. Coppen, C. Swadem, K. Wood y J.D. Carroll, *Lancet*, **2**, 914 (1979).
- [16] D. Mück-Seler, Z. Deanovik y M. Dupeli, *Headache*, **19**, 14 (1979).
- [17] M.A. Moskowitz, J.F. Reinard, J. Romero, E. Helamed, y D.J. Pettibore, *Lancet*, **2**, 883 (1979).
- [18] C. Ponder, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* , **61**, 1089 (1978).
- [19] C. García Moreno y A. Mariné Font, *Agroquímica y Tecnología de los Alimentos*, **23**, 60 (1983).
- [20] C. García Moreno, A. Gómez Cerro, A. Nogales Alarcón y A. Mariné Font, *Alimentaria*, **93**, 21 (1978).
- [21] C. García Moreno, A. Nogales Alarcón, A. Gómez Cerro y A. Mariné Font, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **63**, 19 (1980).
-

-
- [22] M.C. Vidal Carou, A. Mariné Font, *Alimentaria*, **90**, 45 (1978).
- [23] B. Blackwell, L.A. Mabbit, *Lancet*, **1**, 938 (1965).
- [24] C. Tejedor Gil y A. Mariné Font, *Alimentaria*, **90**, 45 (1978).
- [25] S.N. Young, *Brit. J. Pharmacol.*, **74**, 695 (1981).
- [26] S.N. Young y G.M. Anderson, *Neuroendocrinology.*, **36**, 464 (1982).
- [27] V. Erspamer, *J. Physiol.*, **127**, 118 (1955).
- [28] C. Co, J.E. Smith y J.D. Lane, *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **16**, 641 (1982).
- [29] P. Evans y R. Malmberg, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **40**, 235 (1989).
- [30] N. Bagni, U. Bachrach y Y.M. Heimer, *The Physiology of Polyamines*, Vol. II CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 107 (1989).
- [31] A.W. Galston y R. Kaur-Sawhney, *Plant Physiol.*, **94**, 406 (1983).
- [32] U. Bachrach y M. Heimer, *The Physiology of Polyamines*, Vol. II, CRC Press, Boca Ratón, Florida, p. 121 (1989).
- [33] H. Felix y J. Harr, *Physiolog. Plantarum*, **71**, 245 (1987).
- [34] J. Martin-Tanguy, *Plant Growth Regul.*, **399**, 3381 (1985).
- [35] T.A. Smith, S.J. Croker y R.S.T. Loeffler, *Phytochemistry*, **25**, 683 (1986).
- [36] A.F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney y A.W. Galston, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **9**, 111 (1987).
- [37] A.F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney y A.W. Galston, *Plant Cell Physiology*, **29**, 1241 (1988).
- [38] H.E. Flores y P. Filner, *Plant Growth Regulation*, **3**, 277 (1985).
- [39] A.F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney, R.B. Ingersoll y A.W. Galston, *Plant Physiology*, **78**, 323 (1985).
- [40] C.W. Tabor y H. Tabor, *Annu. Rev. Biochem.*, **53**, 749 (1984).
- [41] T.A. Smith, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **36**, 117 (1985).
- [42] T.A. Smith, *Biochem. Soc. T.*, **13**, 319 (1985).
- [43] H.E. Flores y P. Filner, *Primary and Secondary metabolism of plant Cell Cultures*, Springer-Verlag, Berlin, p. 174 (1985).
- [44] A.F. Tiburcio, R. Kaur-Sawhney y A.W. Galston, *Plant Physiol.*, **82**, 375 (1986).
-

-
- [45] A. Toumadje y D.G. Richardson, *Phytochemistry*, **20**, 335 (1998).
- [46] R.A. Saftner y R.G. Baldi, *Plant Physiol.*, **92**, 547 (1990).
- [47] W. Veciana Nogués, N.C. Vidal Carou y A. Mariné Font, *J. Food Sci.*, **55**, 1192 (1990).
- [48] M.C. Vidal Carou y A. Mariné Font, *Alimentaria*, **151**, 93 (1984).
- [49] M.D. Simmaco, D. Biase y D. Barra, *J. Chromatogr.*, **504**, 129 (1990).
- [50] M.A.J.S. Van Boekel y A.P. Arentsen Stasse, *J. Chromatogr.*, **389**, 267 (1987).
- [51] D.D. Koch y P.T. Kissinger, *J. Chromatogr.*, **164**, 441 (1979).
- [52] B. Petrucelli, G. Bakris, T. Miller, E.R Korpi, y M. Linnoila, *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **51**, 421 (1982).
- [53] E. Martínez, F. Artigas, C. Sunol, J.M. Tusell y E. Gelpi, *Clin. Chem.*, **29**, 1354 (1983).
- [54] R.F. Seegal, K.O. Brosch, y B. Bush, *J. Chromatogr.*, **377**, 131 (1986).
- [55] G.M. Anderson, J.G. Yung y D.J. Cohen, *J. Chromatogr.*, **164**, 501 (1979).
- [56] G.M. Anderson y W.C. Purdy, *Anal. Chem.*, **51**, 283 (1979).
- [57] I.N. Mefford y J.D. Barchas, *J. Chromatogr.*, **181**, 187 (1980).
- [58] D.D. Koch y P.T. Kissinger, *Life Sci.*, **26**, 1099 (1980).
- [59] W.H. Lynes, N.M. Friedle y K.E. Moore, *Life Sci.*, **26**, 1109 (1980).
- [60] J.F. Jr. Reinhard, M.A. Moskowitz, A.F. Sved y J.D. Fernstrom, *Life Sci.*, **27**, 905 (1980).
- [61] L. Smerdjian-Rouquier, L. Bossi y B. Scatton, *J. Chromatogr.*, **218**, 663 (1981).
- [62] G.M. Anderson, J.G. Yung, D.K. Batter, S.N. Young, D.J. Cohen y B.A. Shaywitz, *J. Chromatogr.*, **223**, 315 (1981).
- [63] J.A. Nielsen y C.A. Johnston, *Life Sci.*, **31**, 2847 (1982).
- [64] W.A. Wolf y D.M. Kuhn, *J. Chromatogr.*, **275**, 1 (1983).
- [65] J. De Jopng, U.R. Tjaden, W. Van't Hoff y C.F.M. J. Van Valkenburg, *Chromatogr.*, **282**, 443 (1983).
- [66] S.M. Lasley, I.A. Michaelson, R.D. Greenland y P.M. McGinnis, *J. Chromatographia*, **305**, 27 (1984).
-

-
- [67] C.F. Saller y A.I. Salama, *J. Chromatogr.*, **309**, 287 (1984).
- [68] N.F. Mart y M. Aldegund, *J. Chromatogr.*, **491**, 221 (1989).
- [69] Q.C. Meng, Y. Chen y S. Oparil, *Life Sci.*, **44**, 1207 (1989).
- [70] A. Crozier, K. Loferski, J.B. Zaerr y R.O. Morris, *Planta*, **150**, 366 (1980).
- [71] S.R. Hagen y J. Augustin, *J. Micronutrient Analysis*, **5**, 303 (1989).
- [72] H.M.L.J. Joosten y C. Olieman, *J. Chromatogr.*, **356**, 311 (1986).
- [73] A. Jussofie, J. Lojewski y C. Hiemke, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 447 (1983).
- [74] W.F. Staruzkiewicz y J.F. Bond, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **64**, 584 (1981).
- [75] F.A.J. Muskiet, A.G. Vandenberg, A.W. Kingma, D.C.M. Fremouw-Ottevangers, y M.R. Halle, *Clin. Chem.*, **30**, 187 (1984).
- [76] E.D. Conte y D.W. Miller, *J. High Resolu. Chromatogr.*, **19**, 294 (1996).
- [77] A. G. Vandenberg, F.A.J. Muskiet, A.W. Kingma, W. van der Silk y M.R Halle, *Clin. Chem.*, **32**, 1930 (1986).
- [78] M. Bonilla, L.G. Enriquez y H.M. Mcnair, *J. Chromatogr. Sci.*, **35**, 53 (1997).
- [79] M. Makita, S. Yamamoto y M. Kono, *Clin.Chim. Acta*, **61**, 403 (1975).
- [80] M. Makita, S. Yamamoto, M. Miyake y K. Masamoto, *J. Chromatogr.*, **156**, 340 (1978).
- [81] M.T. Bakowski, P.A. Toseland, J.F.C. Wicks y J.R. Trounce, *Clin.Chim. Acta*, **110**, 273 (1981).
- [82] J.M. Rattenbury, P.M. Lax, K. Blau, y M. Sandler, *Clin.Chim. Acta*, **95**, 61 (1979).
- [83] S. Fujihara, T. Nakashima y Y. Kurogochi, *J. Chromatogr.*, **277**, 53 (1983).
- [84] S. Yamamoto, M. Yokogawa, K. Wakamatsu, H. Kataoka y M. Makita, *J. Chromatogr.*, **233**, 29 (1982).
- [85] T. Ohki, A. Saito, N. Yamanaka, K. Ohta, J. Sakakibara, T. Niwa y K. Maeda, *J. Chromatogr.*, **228**, 51 (1982).
- [86] G.A. Vand den Berg, J.M. Schaaf, G.T. Nagel, A.W. Teelken y F.A.J. Muskiet, *Clin. Chim. Acta*, **165**, 147 (1987).
- [87] A.W. Galston, *Bioscience*, **33**, 382 (1983).
-

-
- [88] N.D. Young y A.W. Galston, *Plant Physiol.*, **76**, 331 (1984).
- [89] F. Feth y K.G. Wagner, *Physiol. Plantarum*, **75**, 71 (1989).
- [90] C. Tricard, J.M. Cazabeil y M.H. Salagoity, *Analisis*, **19**, 53 (1991).
- [91] O. Busto, M. Mestres, J. Guasch y F. Borrull, *Chromatographia*, **40**, 404 (1995).
- [92] D.O. Adams, K.E. Franke y L.P. Christensen, *Am. J. Enol. Viticult.*, **41**, 121 (1990).
- [93] A.R. Olson y J. Nowak, *Hort Science*, **23**, 1042 (1988).
- [94] A. Ibe, , K. Saito, M. Nakasato, Y. Kikuchi, K. Fujinuma y K. Nishima, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **74**, 695 (1991).
- [95] P. Antila, V. Antila, J. Mattila y H. Hakkarainen, *Milchwissenschaft*, **39**, 81 (1984).
- [96] J.L. Mietz y E. Karmas, *J. Assoc Off. Anal. Chem.*, **61**, 139 (1978).
- [97] S. Moret y R. Bortolomeazzi, *J. Chromatogr.*, **591**, 175 (1990).
- [98] J.L. Mietz, y E. Karmas, *J. Food Sci.*, **42**, 155 (1977).
- [99] P. Malle, M. Vallé y S. Bouquelet, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **79**, 43 (1996).
- [100] M.H. Abdel Monem y K. Ohno, *J. Chromatogr.*, **107**, 416 (1975).
- [101] S.C. Minocha, R.C.A. Minocha y Robie, *J. Chromatogr. Sci.*, **511**, 177 (1990).
- [102] C. Buteau, C.L. Duitschaever y G. Ashton, *J. Chromatogr.*, **284**, 201 (1984).
- [103] S. Suzuki, K. Kobayashi, J. Noda, T. Suzuki y Takama, *J. Chromatogr.*, **508**, 225 (1990).
- [104] J.W. Redmon y A. Tseng, *J. Chromatogr.*, **170**, 479 (1979).
- [105] M. Z. Hauschild, *J. Chromatogr.*, **630**, 397 (1993).
- [106] S. Moret y L.S. Conte, *J. Chromatogr.*, **729**, 363 (1996).
- [107] R.D. Slocum, H.E. Flores, A.W. Galston y L.H. Weinstein, *Plant Physiol.*, **89**, 512 (1989)
- [108] M.A. Smith y P.J. Davies, *J. Plant Physiol.*, **78**, 89 (1985).
- [109] P.J. Neil, J.L. Price, D.O. Firmin y Gray, *J. Chromatogr.*, **598**, 51 (1992).
- [110] Kónigshofer y Helga, *J. Plant Physiol.*, **134**, 736 (1989).
- [111] J. Kirschbaum, B. Luckas y W.D. Beinert, *Am. Lab.*, **26**, C28 (1994).
-

-
- [112] T. Bauza, A. Blaise, F. Daumas y J.C. Cabanis, *J. Chromatogr.*, **707**, 373 (1995).
- [113] G. Chiavari, G.C. Galletti y P. Vitali, *Chromatogr.*, **27**, 216 (1989).
- [114] D. Hornero Méndez y A. Garrido Fernández, *Analyst*, **119**, 2037 (1994).
- [115] O. Busto, J. Guasch y F. Borrull, *J. Chromatogr.*, **718**, 309 (1995).
- [116] O. Busto, J. Guasch y F. Borrull, *J. Chromatogr.*, **737**, 205 (1996).
- [117] O. Busto, M. Miracle, J. Guasch y F. Borrull, *J. Liq. Chrom.*, **20**, 743 (1997).
- [118] N. Vera, L. Camón y E. Martínez, *J. Pharm. Pharmacol.*, **47**, 204 (1995).
- [119] M.Y. Khuhawar, M.B. Rind y G.A. Qureshi, *J. Chem. Soc. Pakistan*, **18**, 119 (1996).
- [120] H.M.H. Vaneijk, D.R. Rooyakkers y N.E.P. Deutz, *J. Chromatogr.*, **730**, 115 (1996).
- [121] M.L. Izquierdo Pulido, M.C. Vidal Carou y A. Mariné Font, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **76**, 1027, (1993).
- [122] C.F. Poole y S.K. Poole, *Anal. Chem.*, **66**, 27 (1994).
- [123] A.M. Siouffi, E. Mincsovics y E. Tyihak, *J. Chromatogr.*, **492**, 471 (1989).
- [124] J. Sherma, *Anal. Chem.*, **68**, 1R (1996).
- [125] J.P. Abjean, *J. Planar Chromatogr.*, **6**, 147 (1993).
- [126] C.F. Poole y M.T. Belay, *J. Planar Chromatogr.*, **4**, 345 (1991).
- [127] C.F. Poole, S.K. Poole, T.A. Dean y Chirco, *J. Planar Chromatogr.*, **2**, 180 (1989).
- [128] W.W. Wendlandt y H.G. Hecht, *Reflectance Spectroscopy*. Interscience Publishers, New York, (1966).
- [129] G. Kortum, *Reflectance Spectroscopy*. Interscience Publishers, New York (1969).
- [130] R.J. Hurtubise, *Molecular Luminescence Spectroscopy: Methods and Applications, Part II*; S.J. Schulman, Ed.; Wiley, New York (1988); Chapter 1.
- [131] Y. Liang, M.E. Baker, B. T. Yeager y M.B. Denton, *Anal. Chem.* **68**, 3885 (1996).
- [132] G.W. Somsen, W. Morden y I.D. Wilson, *J. Chromatogr.*, **703**, 613 (1995).
- [133] W.R.G. Baeyens y B. Lin Ling, *Appl. Spectrosc.*, **43**, 1180 (1989).
-

-
- [134] K.L. Busch, *Trends Anal. Chem.*, **6**, 95 (1987).
- [135] K.L. Busch, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 314 (1992).
- [136] M.P. Fuller y P.R. Griffiths, *Anal. Chem.*, **50**, 1906 (1978).
- [137] G.E. Zuber, R.J. Warren, P.P. Begosh y E.L. O Donell, *Anal. Chem.*, **56**, 2935 (1984).
- [138] A. Otto, U. Bode y Heise, *F. Z. Anal. Chem.*, **331**, 376 (1988).
- [139] G. Busch y A.J. Breaux, *Mikrochim. Acta*, **I**, 17 (1989).
- [140] B.T. Jr. Beauchemin y Brown, *Anal. Chem.*, **61**, 615 (1989).
- [141] P.R. Brown y B.T.Jr. Beauchemin, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1001 (1988).
- [142] K.O Alt y G. Szekely, *J. Chromatogr.*, **202**, 151 (1980).
- [143] H. Schütz y S. Suphachearabhan, *Mikrochim. Acta*, **II**, 109 (1983).
- [144] U. Bode y H.M. Heise, *Mikrochim. Acta*, **I**, 143 (1988).
- [145] H. Hellmann, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **332**, 433 (1988).
- [146] B. Chase, *Anal. Chem.*, **14**, 881A (1987).
- [147] J. Fidanza y J.J. Aaron, *Talanta*, **33**, 215, (1986).
- [148] C.R. Sawicki y E. Sawicki, *Progress in Thin-Layer Chromatography and Related Methods, Vol. III*, A. Niederwieser and G. Pataki, eds., Ann Arbor Science Publishers Inc., Ann Arbor, Mich. (1972), Chap. 6.
- [149] D.K. Basu y J. Saxena, *Environ. Sci. Technol.*, **7**, 791, (1978).
- [150] D.K. Basu y J. Saxena, *Environ. Sci. Technol.*, **7**, 795 (1978).
- [151] R.J. Hurtubise, J.D. Phillip y G.T. Skar, *Anal. Chim. Acta*, **101**, 333 (1978).
- [152] A.P. Bentz, *Anal. Chem.*, **48**, 454A (1976).
- [153] R. Amos, *Talanta*, **20**, 1231 (1973).
- [154] A. Herold, *J. of Planar Chromatogr.*, **7**, 180 (1994).
- [155] J. Van Buren, L. De Vos y W. Pilnik, *J. Food Sci.*, **38**, 656 (1973).
- [156] R.K. Ibrahim, *J. Chromatogr.*, **42**, 544 (1969).
- [157] E.R. Lieber y S.L. Taylor, *J. Chromatogr.*, **160**, 227, (1978).
- [158] E.R. Lieber y S.L. Taylor, *J. Chromatogr.*, **153**, 143, (1978).
- [159] J.C. Young, *J. Chromatogr.*, **151**, 215, (1978).
-

-
- [160] C. K. Cross, K.B. Bharucha y G.M. Telling, *J. Agr. Food. Chem.*, **26**, 657, (1978).
- [161] J.D. MacNeil y R.W. Frei, *J. Chromatogr. Sci.*, **13**, 279 (1975).
- [162] W. Thornburg, *Anal. Chem.*, **51**, 196R (1979).
- [163] R.J. Hurtubise, *Solid Surface Luminiscence Analysis. Theory, Instrumentation, Applications*, Dekker, New York (1981).
- [164] D.E. Jaenchen y H. J. Issaq, *J. Liq. Chromatogr.*, **11**, 1941 (1988).
- [165] C.F. Poole y S.K. Poole, *Anal. Chem.* **61**, 1257A, (1989).
- [166] M.C. Moreno-Bondí, O.S. Wolfbeis, M.J. Leiner y B.P.H. Schaffar, *Anal. Chem.* **62**, 2377 (1990).
- [167] J.B. Zung, M.S. Fuh y I.M. Warner, *Anal. Chim. Acta*, **224**, 235 (1989).
- [168] F.V. Bright y K.S. Litwiler, *Anal. Chem.* **61**, 1510 (1989).
- [169] A. Navas, *Anal. Chim. Acta*, **225**, 297 (1991).
- [170] W. Funk, V. Dammann, T. Couturier, J. Schiller, L. Völker, *J. High Resolu. Chromatogr.*, **9**, 224 (1986).
- [171] T. Murashige y F. Skoog, *Physiol. Plantarum*, **15**, 473 (1962) .
- [172] A. Santos-Buelga, A. Nogales-Alarcón y A. Mariné-Font, *J. Food Sci.*, **46**, 1794 (1981).
- [173] J.D. Ingle, Jr. y S.R. Crouch, *Spectrochemical Analysis*, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, (1988), p.146.
- [174] H.M.N.H. Irving, H. Freiser y T.S. West, *Compendium of Analytical Nomenclature*, Pergamon press (1977), p. 133.
- [175] B. Viell, K.H. Vestweber y B. Krause, *J. Pharm. Biom. Anal.* **6**, 939 (1988).
- [176] T.C.M. Pastore y C.G. de Lima, *Analyst*, **111**, 707 (1986).
- [177] R.J. Henry y C.P. Szuskiewicz, *Química Clínica Tomo I*, R.J. Henry, D.C. Cannon, J.W. Winkelman, eds., Jims, Barcelona, (1980), p. 390.
- [178] T.S. Moh, *Anal. Chem.*, **52**, 1978 (1980).
- [179] J.A. Hesek y R.S. Wilson, *Anal. Chem.*, **46**, 8 (1974).
- [180] A. Zlotorzynsky, *CRC Crit. Rev. Anal. Chem.*, **25**, 43 (1995).
- [181] A. A. Samra, J. S. Morris y S.R. Koirtyojann, *Anal. Chem.*, **47**, 1475 (1975).
-

-
- [182] H.M. Kuss, *Fresen. J. Anal. Chem.*, **343**, 788 (1992).
- [183] A. Siquin, T. Görner y E. Dellacherie, *Analisis*, **21**, 1 (1993)
- [184] R. Blust, A van der Linden y W. Decler, *Atom. Spectrosc.*, **6**, 163 (1985).
- [185] P. Aysola, P. Anderson y C.M. Langford, *Anal. Chem.*, **59** 1582 (1987).
- [186] F. Smith, B. Cousins, J. Bozic y W. Flora, *Anal. Chim. Acta*, **177**, 243 (1985).
- [187] R.A.Nadkarni, *Anal. Chem.*, **56**, 2233 (1984).
- [188] M.A.B. Pougnet y M.A.E. Wandt, *ChemSA*, **12**, 16 (1986).
- [189] M.A.E. Wandt y M.A.B. Pougnet, *Analyst*, **111**, 1249 (1986).
- [190] R.T. White, Jr. y G.E. Douthit, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **68**, 766 (1985).
- [191] P.J. Lamothe, T.L. Fries y J.J. Consul, *Anal. Chem.*, **58**, 1881 (1986).
- [192] L.A. Fernando, W.D. Heavner y C.C. Gabrielli, *Anal. Chem.*, **58**, 511 (1986).
- [193] K. Ganzler, A. Salgo y K. Valko, *J. Chromatogr.*, **371**, 229 (1986).
- [194] K. Ganzler, A. Salgo y K. Valko, *Z. Unters. Forsch.*, **184**, 274 (1987).
- [195] F. Onuska y K.A. Terry, *Chromatographia*, **36**, 191 (1993).
- [196] V. López Ávila, R. Young, J. Benedicto, P. Ho y R. Kim, *Anal. Chem.*, **67**, 2096 (1995).
- [197] V. López Ávila, R. Young y W.F. Beckert, *Anal. Chem.*, **66**, 1097 (1994).
- [198] V. López Ávila y R. Young, *Application of Microwave Energy to the Extraction of Organic Compounds from Solid Samples*, EPA Report 600/R-94/031; U.S. Environmental Protection Agency, Environmental Monitoring Systems Laboratory: Las Vegas, NV, (1994).
- [199] I.J. Barnabas, J.R. Dean, I.A. Fowles y S.P. Owen, *Analyst*, **120**, 1897 (1995).
- [200] R. Gedye, F. Smith, K. Westaway, H. Ali, L. Baldisera, L. Laberge y J. Rousell, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 279 (1986).
- [201] R.J. Giguere, T.L. Bray, S.M. Duncan y G. Majetich, *Tetrahedron Lett.*, **27**, 4945 (1986).
- [202] S. Caddick, *Tetrahedron*, **51**, 10403 (1995).
- [203] Z. Bouhsain, S. Garrigues, A. Morales Rubio y M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, **330**, 56 (1996).
-

-
- [204] K. Dema Khalaf, A. Morales Rubio y M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta*, **281**, 249 (1993).
- [205] M. De La Guardia, A. Salvador, M.J. Gómez y Z. De Benzo, *Anal. Chim. Acta*, **224**, 123 (1989)
- [206] J. Martínez Calatayud y S. Sagrado Vives, *J. Pharm. Biomed. Anal., J. Anal. At. Spectrom*, **8**, 697 (1993).
- [207] J.I. Hui y S.L. Taylor, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 853 (1983).
- [208] E. Nikolaos, Zoulis, P. Dimitros, Nokolelis, E. Constantinos y Efstathiou, *Analyst*, **115**, 291 (1990).
- [209] F.V. Carlucci y E. Karmas, *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **119**, 2037 (1994).
- [210] N.P.J. Price y D.O. Gray, *J. Chromatogr.*, **635**, 165 (1993).
- [211] N.N. Singhm, C. Periera y U.M. Patil, *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 1845 (1993).
- [212] N. Khayria, A.M. Ayesh, A.M. Ayesh y A.R. Shalaby, *J. Agric. Food Chem.*, **43**, 134 (1995).
- [213] N. Seiler, *Methods Biochem. Anal.*, **18**, 259 (1970).
- [214] A.R. Hayman y D.O. Gray, *Phytochemistry*, **28**, 673 (1989).
- [215] D.A. Durden, B.A. Davis y A.A. Boulton, *Biol. Mass Spectrom.*, **1**, 83 (1974).
- [216] B. Morrelli, *Analyst*, **113**, 1077 (1988).
- [217] C. K.D. Henry y E. Koehler, *J. Food Sci.*, **48**, 1826 (1983).
- [218] H.E Flores y A.W. Galston, *Plant Physiol.*, **69**, 701 (1982).
- [219] C.F. Poole y S.K. Poole, *J. Chromatogr.*, **703**, 573 (1995).
- [220] C.F. Poole y S.K. Poole, *J. Chromatogr.*, **492**, 539 (1989).
- [221] W.R.G. Baeyens y B. Lin Ling. *J. Planar Chromatogr.*, **1**, 198 (1988) .
- [222] L. Lepri, V. Coas y P.G. Desideri, *J. Planar Chromatogr.*, **3**, 533 (1990).
- [223] L. Lepri, V. Coas y P.G. Desideri, *J. Planar Chromatogr.*, **4**, 338 (1991).
- [224] W. Lovenberg, *J. Agric. Food. Chem.*, **22**, 23 (1974).
- [225] J. Stratton, R. Hutkins y S. Taylor, *J. Food Protect.*, **54**, 460 (1991).
- [226] E. Mentasti, C. Sarzanini, O. Abollino y V. Porta, *Chromatographia*, **31**, 41 (1991).
-

-
- [227] J. A. Zee, R.E. Simard y M. Desmarais, *J. Inst. Can. Food Sci. Technol.*, **14**, 119 (1989).
- [228] G. Cerutti, C. Finoli, S. Peluzzi y A. Vecchio, *Monatsschr. Brauwiss.*, **38**, 296 (1985).
- [229] E. Chen, y G. Van Gheluwe, *J. Am. Soc. Brew. Chem*, **37**, 91 (1979).
- [230] M.L. Izquierdo Pulido, M.C. Vidal Carou y A. Mariné Font, *J. Food Comp. Anal.*, **2**, 219 (1989).
- [231] N.P. Sen, *J. Food Sci.*, **34**, 22 (1969).
- [232] S. Granerus, S.E. Svenson y H. Wetterqvist, *Lancet*, **1**, 1320 (1969)
- [233] J.C. Rivas, P. Pindado y A. Mariné Font, *Rev. Agroquim. Technol. Alim.*, **22**, 133 (1982)
- [234] G. Cerutti, *Enotecnico*, **21**, 31 (1985).
- [235] S.L. Taylor, *Crit. Rev. Toxicol.*, **17**, 91 (1986).
- [236] G. Cerutti, *Latte*, **14**, 382 (1989).
- [237] U. Pechanek, W. Pfannhauser y H. Woidich, *Ernähr. Nutr.*, **7**, 683 (1983).
- [238] W.J. Hurst, *J. Liq. Chromatogr.*, **13**, 1 (1990).
- [239] J.J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno, B. Suárez y D. Blanco, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 3303 (1996).
- [240] J.J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno y D. Blanco, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 268 (1996).
- [241] J.J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno y D. Blanco, *Lebensm. Wiss. Technol.*, **44**, 268 (1996).
- [242] J.J. Mangas, R. Rodríguez, J. Moreno, B. Suárez y D. Blanco, *J. Agric. Food Chem.*, **45**, 4076 (1997).
- [243] M. Cruz Ortiz, J.A. Saez y J. López Palacios, *Analyst*, **118**, 801 (1993).
- [244] C. García López, N. Grané Teruel, J. Berenguer Navarro, E. García García y M.L. Martín Carratalá, *J. Agric. Food Chem.*, **44**, 1751 (1996).
- [245] E. Pueyo, P. Martín Álvarez y C. Polo, *Am. J. Enol. Vitic.*, **46**, 518 (1995).
- [246] P. Etiévant, P. Schlich, R. Cantagrel, A. Bertrand y J.C. Bouvier, *J. Sci. Food*
-

-
- Agric.*, **46**, 421 (1989).
- [247] P.P. Mouly, E.M. Gaydou, C.R. Arzouyan y J.M. Estionne, *Analisis*, **24**, 230 (1996)
- [248] D. Blanco Gómez, P. Fernández Rubio, M.D. Gutiérrez Álvarez y J.J. Mangas Alonso, *Analyst*, **123**, 125 (1998).
- [249] P. Valera, F. Pablos y A.G. González, *Talanta*, **43**, 415 (1996).
- [250] M. Suchánek, H. Filipová, K. Volka, I. Delgadillo y A.N. Davies, *F. Z. Anal.Chem.*, **354**, 327 (1996).
- [251] N. Dupuy, J.P. Huvenne, L. Duponchel y P. Legrand, *Appl. Spectrosc.*, **49**, 580 (1995).
- [252] D.L. Massart, B.G.M. Vandeginste, S.N. Deming, Y. Michotte y L. Kaufman, *Chemometrics a Textbook*, Ed. Elsevier Science Publishers B.V., New York, (1988).
- [253] N.H. Nie, C.H. Hull, J.G. Jenkins, K. Steinbrenner y D.H. Bent, *Statistical Package for the Social Sciences*, McGraw-Hill Book Company, (1975), p. 468.
- [254] M.A. Sharaf, D.L. Illman y B.R. Kowalski, *Chemometrics*, Wiley Interscience, (1982), p.179.
- [255] S. Buiatti, O. Boschelle, M. Mozzon y F. Battistutta, *Food Chem.*, **52**, 199 (1995).
- [256] H.F. Kaiser, *Pedagogical and Psychological Measurement*, **20**, 141 (1960).
- [257] V. Pollak y A.A. Boulton, *J. Chromatogr.*, **72**, 231 (1972).
- [258] G. Kortum, *Reflectance Spectroscopy*, Springer-Verlag, New York, N.Y. (1969).
- [259] V. Pollak, *J. Chromatogr.*, **133**, 49 (1977).
- [260] J. Goldman, *J. Chromatogr.*, **78**, 7 (1973).
- [261] J. Goldman y R.R. Goodall, *J. Chromatogr.*, **32**, 24 (1968).
- [262] R.R. Goodall, *J. Chromatogr.*, **78**, 153 (1973).
- [263] R.J. Hurtubise, *Anal. Chem.*, **49**, 2160 (1977).
- [264] V. Pollak, *J. Chromatogr.*, **133**, 195 (1977).
- [265] L. Cuadros Rodríguez, A.M. García Campaña, C. Jiménez Linares y M. Román Ceba, *Anal. Lett.*, **26(6)**, 1243 (1993).
-

- [266] J.D. Ingle Jr., *J. Chem. Educ.*, **51**, 100 (1971).
- [267] R.K. Skogerboe y C.L. Grand, *Spectrosc. Lett.*, **3**, 216 (1970).
- [268] G.L. Long y J.D. Winefordner, *Anal. Chem.*, **55**, 712A (1983).
- [269] J.C. Miller y J.N. Miller, *Estadística para Química Analítica*, Adisson-Wesley Iberoamerican, S.A., Wilmington, Delaware, E.U.A., (1993), p. 100.
-