



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS BIOQUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA

**“DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA
DE FUSIÓN DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN
DE ORIGEN FLUORIMÉTRICO Y SU
APLICACIÓN A MUESTRAS AMBIENTALES”**

INFORME DE PRÁCTICA FINAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE
LICENCIADO EN QUÍMICA

SANTIAGO ANDRÉS ANTONELLI

DIRECTORA: DRA. ROCÍO B. PELLEGRINO V.
CO-DIRECTORA: DRA. MAIRA D. CARABAJAL

ROSARIO, ARGENTINA
2021

“DESARROLLO DE UNA NUEVA ESTRATEGIA DE FUSIÓN DE DATOS DE SEGUNDO ORDEN DE ORIGEN FLUORIMÉTRICO Y SU APLICACIÓN A MUESTRAS AMBIENTALES”

SANTIAGO ANDRÉS ANTONELLI

Esta tesina es presentada como parte de los requisitos para optar al título de Licenciado en Química. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones desarrolladas en el Departamento de Química Analítica, dependiente de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR, bajo la dirección de la Dra. Rocío B. Pellegrino V. y la co-dirección de la Dra. Maira D. Carabajal.

ÍNDICE

1. Introducción.....	6
1.1. Contaminantes emergentes con actividad biológica.....	6
1.2. Espectroscopía de fluorescencia molecular.....	9
1.3. Fluorescencia fotoinducida.....	12
1.4. Calibración Multivariada.....	14
1.5. Procesamiento de datos.....	17
1.6. Análisis paralelo de factores.....	20
1.7. Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes.....	23
1.8. Fusión de datos.....	28
1.9. Objetivos.....	29
1.9.1. Objetivo general.....	29
1.9.2. Objetivos específicos.....	29
2. Experimental.....	30
2.1. Reactivos.....	30
2.2. Preparación de muestras de calibración y validación para métodos fluorescentes.....	30
2.3. Preparación de muestras de calibración para método de referencia.....	31
2.4. Preparación de muestras reales.....	31
2.4.1. Muestras reales para espectroscopía de fluorescencia.....	31
2.4.2. Muestras reales para cromatografía líquida de alta eficacia.....	32
2.5. Instrumental.....	32
2.6. Determinación de analitos por fluorescencia con calibración de segundo orden.....	33
2.7. Método de referencia.....	34
2.8. Calibración y validación para métodos de espectroscopía de fluorescencia.....	35
2.9. Calibración para método de referencia.....	37
2.10. Análisis de datos.....	37
2.10.1. Datos de espectroscopía de fluorescencia.....	37
2.10.2. Fusión de datos: Restricción de proporcionalidad de <i>scores</i>	38
2.10.3. Datos de cromatografía líquida de alta eficacia.....	42
2.11. Software.....	42

	2
3. Resultados y discusión	43
3.1. Optimización de las condiciones experimentales.....	43
3.2. Análisis de validación.....	47
3.3. Muestras reales.....	55
3.3.1. Análisis por espectroscopía de fluorescencia.....	55
3.3.2. Análisis por cromatografía líquida de alta eficacia.....	58
3.3.3. Resultados.....	60
4. Conclusiones	64
5. Bibliografía	65

AGRADECIMIENTOS

A Rocío y Maira, por todo lo que me enseñaron, por los oportunos consejos que me ofrecieron y por la predisposición a apoyarme que tuvieron desde el comienzo de este trabajo.

A toda mi familia, especialmente a mis abuelos, por el soporte y la ayuda que me brindaron.

A mis amigos, por la buena compañía y por el genuino entusiasmo con el que me alentaron.

ABREVIATURAS

γ	Sensibilidad analítica
AINE	Antiinflamatorio no esteroideo
ALS	Cuadrados mínimos alternantes (siglas en inglés)
DAD	Detector de arreglo de diodos
DTLD	Descomposición trilineal directa
EJCR	Región elíptica de confianza conjunta (siglas en inglés)
FD	Detector de fluorescencia
FP	Fotoproducto
FQs	Fluoroquinolonas
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia (siglas en inglés)
LOD	Límite de detección (siglas en inglés)
LOQ	Límite de cuantificación (siglas en inglés)
MCR-ALS	Resolución multivariada de curvas por cuadrados mínimos alternantes (siglas en inglés)
MEEF	Matriz de excitación-emisión de fluorescencia
MEEFP	Matriz de excitación-emisión de fluorescencia de fotoproducto
MS	Detector de espectrometría de masas
PARAFAC	Análisis paralelo de factores (siglas en inglés)
PAVs	Principios activos veterinarios
PCA	Análisis por componentes principales (siglas en inglés)
PIF	Fluorescencia fotoinducida (siglas en inglés)
RMSEP	Error cuadrático medio en la predicción (siglas en inglés)
REP	Error relativo de predicción (siglas en inglés)
SSE	Suma de los errores cuadrados (siglas en inglés)
SVD	Descomposición en valores singulares (siglas en inglés)
UV	Luz ultravioleta
UV-Vis	Luz ultravioleta-visible
UVD	Detector de absorción ultravioleta-visible

RESUMEN

Los contaminantes emergentes son compuestos orgánicos que no integran naturalmente los ecosistemas en los que se encuentran, y que al estar biodisponibles pueden producir efectos adversos en los seres vivos. Se detectan con frecuencia en aguas naturales y suelo, y, si bien su presencia debe controlarse en forma estricta, su regulación es incompleta. Con el propósito de cuantificar simultáneamente un grupo de contaminantes emergentes en muestras de origen ambiental, en este trabajo se propuso el desarrollo de un método espectroscópico basado en una calibración de segundo orden construida a partir de la fusión de datos de segundo orden de fluorescencia y fluorescencia fotoinducida. Además, en el presente trabajo se analizaron las ventajas de la fusión de datos comparando los resultados obtenidos en un análisis de muestras de validación por el método propuesto con aquellos conseguidos mediante modelado de los datos sin fusionar, y se validó el método propuesto frente a un método de referencia, cromatografía líquida de alta eficacia con detector de absorción ultravioleta-visible. Se observó una mayor capacidad predictiva en el método con fusión de datos, evidenciada en una mayor precisión y exactitud, y un menor error relativo de predicción.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. CONTAMINANTES EMERGENTES CON ACTIVIDAD BIOLÓGICA

Los contaminantes emergentes son compuestos orgánicos que no están presentes naturalmente en los ecosistemas. Estas sustancias tienen posibles efectos dañinos hacia los seres humanos y el ambiente, y poseen una regulación legal incompleta.¹ Dentro de ellos se incluyen a los principios activos veterinarios (PAVs).

Los PAVs permiten mejorar la salud y prevenir la muerte de los animales. Sin embargo, en las últimas décadas, el uso inadecuado de PAVs contribuyó a la presencia de residuos de estos compuestos en alimentos, se debe mencionar que estos residuos ocasionan efectos adversos a la salud humana, causando resistencia bacteriana y reacciones alérgicas en individuos hipersensibles.² Debido a esto es de interés el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan la determinación de estos contaminantes a niveles de trazas en muestras ambientales o alimenticias.

Dentro de los PAVs se incluye a una conjunto de compuestos denominados fluoroquinolonas (FQs), antibióticos sintéticos activos frente a un amplio espectro de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Estructuralmente, las FQs son compuestos bicíclicos que contienen un fluoruro como sustituyente en uno de sus anillos. En la *Figura 1* se representa la estructura general de las FQs. Estos antibióticos pueden existir en tres formas: como anión, catión o zwitterión. La determinación simultánea de FQs generalmente se basa en el uso de cromatografía líquida de alta eficacia con detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD)³, detector de fluorescencia (HPLC-FD)⁴ o detector de espectrometría de masas (HPLC-MS)⁴⁻⁶. En el caso de HPLC-FD, se ha utilizado también la fluorescencia fotoinducida (PIF) para la cuantificación simultánea de FQs, la cual consiste en irradiar las FQs para convertirlas en especies que cuentan con propiedades fluorescentes distintas a las de las especies originales.^{7,8} A diferencia de la absorción UV, las propiedades fluorescentes de las FQs dependen fuertemente del pH del medio. Las FQs cuentan con dos grupos funcionales con comportamiento ácido-base relevante, un grupo carboxilo y el N-4 de un grupo

piperazinil.^{9,10} Se ha determinado que las formas aniónicas generalmente no presentan fluorescencia nativa, mientras que la intensidad de fluorescencia más alta se obtiene, usualmente, a pH ácido (entre 2,5 y 4,5), es decir, valores de pH a los que predominan las formas catiónicas o zwitterionicas.¹¹

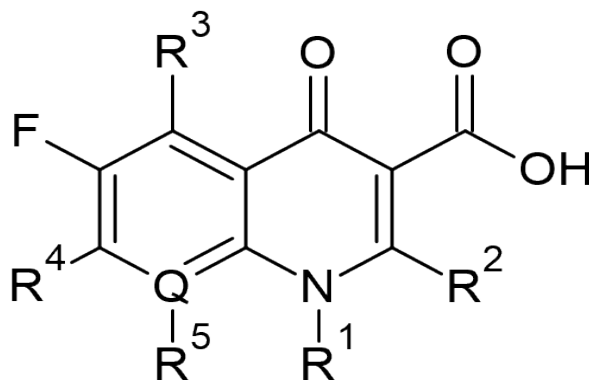


Figura 1: Estructura general de las fluoroquinolonas. Q: átomo de carbono o nitrógeno.

Otro contaminante emergente con actividad biológica de relevancia es el naproxeno, perteneciente a la familia de los antiinflamatorios no esteroideos (AINE), los cuales se utilizan para contrarrestar inflamación, fiebre y dolor. El naproxeno se ha determinado por HPLC con detector de absorción ultravioleta-visible (HPLC-UVD)¹² o por HPLC-FD¹³ y por espectroscopía de fosforescencia a temperatura ambiente.¹⁴

En este trabajo se propone un método para la determinación simultánea de naproxeno y de cuatro FQs, danofloxacin, ofloxacin, sarafloxacin y enoxacin. En la **Tabla 1** se presentan las estructuras de los compuestos en estudio y sus constantes de disociación ácida, estos valores se confirmaron por bibliografía⁹ y usando el *software* MarvinSketch. En la **Figura 2** se representa el equilibrio entre las distintas especies de ofloxacin. El método propuesto está basado en la fusión de dos tipos de datos de fluorescencia: medidas de la señal fluorescente propia de los analitos en estudio y de los mismos compuestos luego de ser irradiados con luz UV. En este método se utiliza una calibración de segundo orden que permite una “separación digital” de los constituyentes de las muestras analizadas,¹⁵ lo cual lleva a una simplificación del pretratamiento y del análisis instrumental.

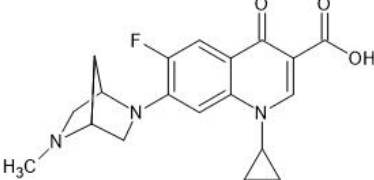
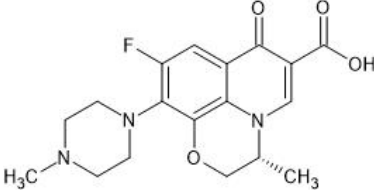
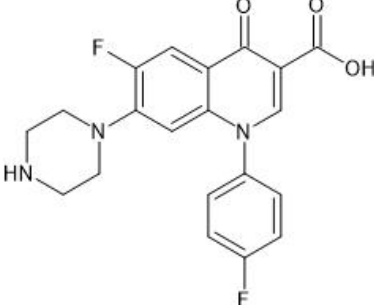
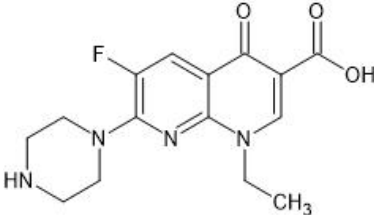
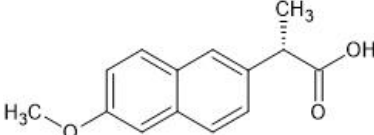
Nombre	Estructura	Constantes de disociación ácida
Danofloxacina		$pK_{a1} = 5,65$ $pK_{a2} = 9,43$
Ofloxacina		$pK_{a1} = 5,45$ $pK_{a2} = 8,22$
Sarafloxacina		$pK_{a1} = 5,74$ $pK_{a2} = 8,68$
Enoxacina		$pK_{a1} = 5,50$ $pK_{a2} = 8,59$
Naproxeno		$pK_a = 4,19$

Tabla 1: Estructuras y constantes de disociación ácida de los compuestos en estudio.

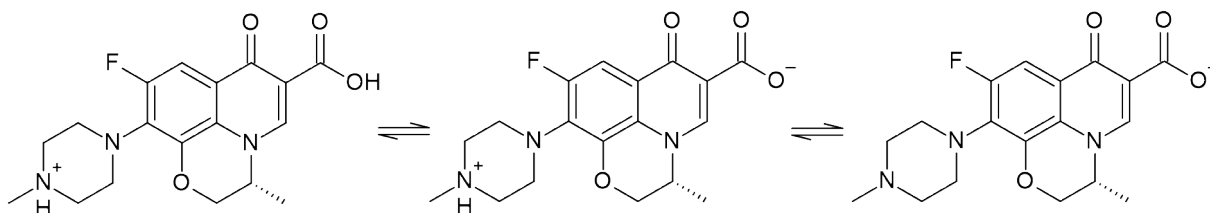


Figura 2: Equilibrios entre las distintas especies de la ofloxacina.

1.2. ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

En los métodos luminiscentes moleculares, las moléculas de analito se excitan para formar una especie cuyo espectro de emisión suministra información para el análisis cuantitativo y cualitativo. En estos métodos, los cuales incluyen fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia, la excitación se consigue a través de la absorción de un fotón por parte de un electrón, consecuentemente, se alude a estos dos primeros métodos con el término de fotoluminiscencia.¹⁶

El principio de exclusión de Pauli establece que no puede haber dos electrones en un átomo cuyos cuatro números cuánticos sean iguales. Para que se cumpla con esta restricción, no pueden encontrarse más de dos electrones en un orbital y, además, los espines de los electrones que se encuentran en un mismo orbital deben ser opuestos, es decir, deben estar apareados o emparejados. Un estado electrónico de una molécula en el cual todos los espines de los electrones están emparejados se denomina estado singlete. Cuando un electrón de una molécula es excitado, se forma un nuevo estado singlete, mediante una transición en la cual el espín del electrón promovido no cambia, o un estado triplete, en el cual existen dos electrones cuyos espines están desapareados, debido al cambio de espín del electrón promovido. Cabe destacar que una transición desde un estado singlete a uno triplete, o viceversa, es un proceso significativamente menos probable que la correspondiente transición singlete a singlete, ya que la primera es un proceso prohibido cuánticamente por una de las reglas de selección. Este hecho se refleja en los tiempos de vida medio de estos estados excitados, los estados excitados singlete tienen un tiempo de vida medio menor que los estados excitados triplete.¹⁶ En la *Figura 3* se representan distintos estados electrónicos.

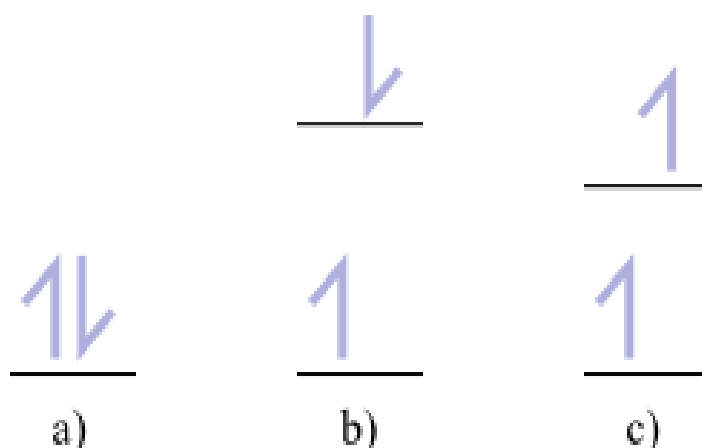


Figura 3: Estados electrónicos moleculares. En a) se representa el estado electrónico fundamental, es decir, el de menor energía, como los espines están emparejados, es un estado singlete. En b) se representa un estado excitado singlete. En c) se representa un estado excitado triplete.

En los métodos luminiscentes, la excitación electrónica ocurre siempre a través del mismo mecanismo, la absorción de un fotón, proceso que sucede con una velocidad del orden de 10^{-14} a 10^{-15} s. Para que ocurra la absorción, el fotón debe ser energéticamente equivalente a la diferencia entre el estado electrónico de menor energía y uno de los estados excitados de la molécula.¹⁷

Se denomina como proceso de desactivación o de relajación a una de las etapas mecánicas a través de las cuales una molécula excitada regresa a su estado fundamental. Existen dos procesos de relajación radiantes, fluorescencia y fosforescencia, estos involucran la emisión de un fotón de radiación, y procesos de relajación no radiantes, los cuales incluyen la relajación vibracional, la conversión interna, la conversión externa y el cruce entre sistemas. Además de los procesos de relajación, una molécula excitada puede atravesar procesos de disociación, en los cuales se rompe un enlace de la molécula.

En la **Figura 4** se puede observar el diagrama de Jablonski, en el que se representan los niveles de energía parcial para una molécula fotoluminiscente y los distintos procesos de excitación y relajación que puede atravesar una molécula a lo largo de un proceso luminiscente.

Las transiciones electrónicas que causan la fluorescencia no cambian el espín del electrón, por esta razón los estados excitados en los que hay fluorescencia presentan una vida media corta, del orden de 10^{-5} a 10^{-10} s. Por otro lado, las emisiones de fosforescencia están

acompañadas por un cambio en el espín electrónico; consecuentemente los estados excitados que se relajan mediante fosforescencia tienen tiempos de vida medio más largos, de órdenes mayores a 10^{-4} s. Debido a esto, en algunos casos, la emisión de fosforescencia puede persistir por un tiempo después de que la irradiación se haya interrumpido.

Por otro lado, la relajación vibracional consiste en una transición desde un nivel vibracional excitado a uno de menor energía del mismo nivel electrónico. Este proceso es tan eficaz que el tiempo de vida medio de una molécula excitada vibracionalmente es de 10^{-12} s. Consecuentemente, la fluorescencia siempre involucra una transición desde el nivel vibracional más bajo de un estado electrónico excitado, a su vez esto lleva a que la emisión de fluorescencia se presente a longitudes de onda más largas que las de la radiación utilizada para la excitación. Este corrimiento hacia longitudes de onda más largas se conoce como desplazamiento de Stokes.¹⁶ La conversión interna es un cruce entre dos estados de la misma multiplicidad, y es particularmente eficaz cuando hay superposición entre niveles vibracionales pertenecientes a distintos niveles electrónicos. La conversión interna puede, en algunos casos, causar la predisociación. En este proceso un electrón pasa por conversión interna a un nivel vibracional lo suficientemente energético para causar la ruptura de un enlace. En la disociación, en cambio, no interviene la conversión interna, sino que es la radiación absorbida la que excita de manera directa a un electrón para que llegue a un nivel vibracional lo suficientemente alto como para producir la ruptura de un enlace de la molécula. La conversión externa consiste en la transferencia de energía entre una molécula excitada y el solvente u otros solutos. El cruce entre sistemas es un cruce entre estados electrónicos de distinta multiplicidad. El camino más propicio hacia el estado fundamental es aquel que reduce al mínimo el tiempo de vida del estado excitado, dando lugar a una competencia entre la fluorescencia y los restantes procesos de relajación. El rendimiento cuántico o la eficacia cuántica de la fluorescencia es la relación entre la cantidad de moléculas que se relajan por fluorescencia y el número total de moléculas excitadas.¹⁶

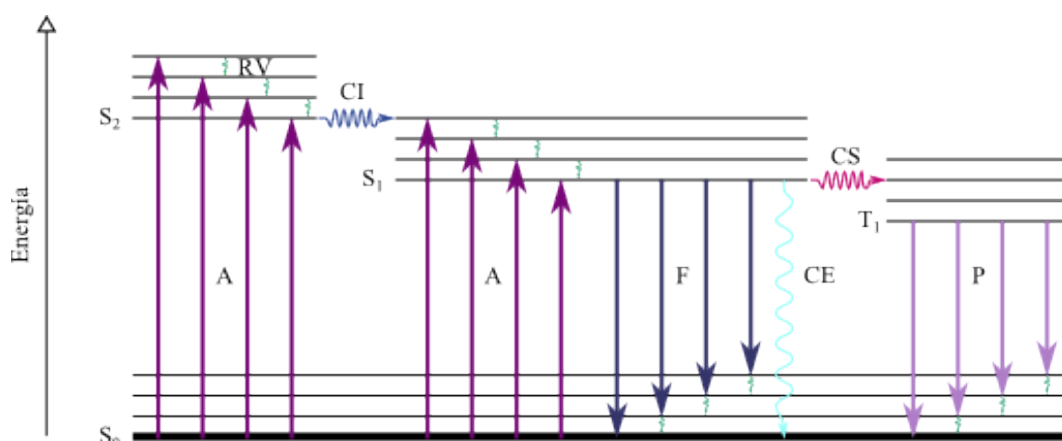


Figura 4: Diagrama de Jablonski. Se representan con líneas rectas horizontales los niveles de energía electrónicos y vibracionales, siendo S_0 el estado electrónico fundamental y S_1 , S_2 y T_1 , el primer y segundo estado excitado singlete, y primer estado excitado triplete, respectivamente. Las líneas onduladas representan los procesos de relajación no radiantes, es decir, relajación vibracional (RV), conversión interna (CI), conversión externa (CE) y cruce entre sistemas (CS). Las líneas rectas verticales representan los procesos en los que se absorbe o emite un fotón, absorción (A), fluorescencia (F) y fosforescencia (P).

En un experimento de fluorescencia la muestra se irradia a una cierta longitud de onda, llamada longitud de onda de excitación, y se mide la emisión a otra longitud de onda, conocida como longitud de onda de emisión. Controlando los valores de estos dos parámetros se pueden obtener dos tipos de espectros a partir de una única muestra, espectros de emisión y espectros de excitación. Un espectro de emisión de fluorescencia se consigue midiendo la intensidad de fluorescencia a distintas longitudes de onda de emisión manteniendo la longitud de onda de excitación constante, se puede representar en un gráfico de intensidad de fluorescencia en función de la longitud de onda de emisión. Por otro lado, un espectro de excitación de fluorescencia se obtiene variando la longitud de onda de la luz con que se excita a la muestra midiendo la luz emitida a una longitud de onda particular, resultando en un gráfico de intensidad de fluorescencia en función de longitud de onda de excitación.¹⁷

1.3. FLUORESCENCIA FOTOINDUCIDA

La fluorescencia fotoinducida implica la irradiación de un analito con luz ultravioleta transformándolo en un fotoproducto (FP) que cuenta con propiedades luminiscentes distintas a las de la sustancia original (frecuentemente denominada especie o forma nativa), lo cual

puede incluir aumentos o disminuciones en la intensidad de fluorescencia.¹⁸ La producción de un FP con un rendimiento cuántico de fluorescencia mayor que el de la especie nativa conlleva un aumento en la sensibilidad, propiedad utilizada para el desarrollo de diversos métodos analíticos basados en fluorescencia fotoinducida.^{7,18-20}

La irradiación de una molécula con luz ultravioleta-visible (UV-Vis) puede causar fotorreacciones, término que abarca distintas reacciones como la fotólisis, fotorreducción, fotooxidación, fotociclación o fotoisomerización. Las fotorreacciones pueden ser directas o indirectas. En una fotorreacción directa los fotones son absorbidos por la molécula a transformar, mientras que en una fotorreacción indirecta la molécula a transformar absorbe la energía a partir de alguna otra molécula que fue previamente excitada por absorción de un fotón. Los principales parámetros que determinan el grado de conversión de una molécula en su FP son la energía necesaria para romper enlaces de la especie nativa, espectro emitido por la fuente, la intensidad de la luz UV-Vis (potencia de la fuente, distancia entre la misma y la solución irradiada y configuración del reactor), el tiempo de exposición a la luz UV-Vis, propiedades del medio que contiene a la especie nativa y la presencia de intermediarios apropiados en el medio de reacción.²¹

En general, las fotorreacciones ocurren en tres pasos básicos:

- Absorción de un fotón para generar un estado electrónico excitado.
- Procesos fotoquímicos que involucran la molécula excitada.
- Procesos secundarios que involucran a los intermediarios formados en el paso anterior.

La utilización de luz UV-Vis como agente promotor presenta ciertas características favoreables:²¹

- Minimiza o evita el uso de reactivos tóxicos y, consecuentemente, la producción de residuos peligrosos.
- Evita la necesidad de diluir muestras, lo cual es inevitable en caso de usar reactivos químicos para derivatizar al analito.
- Las reacciones fotoquímicas suelen ser rápidas, por lo cual facilitan el análisis.
- Una amplia gama de lámparas se encuentra comercialmente disponible. La utilización de lámparas con distintos espectros puede llevar a un aumento en la selectividad, mientras que distintas potencias alteran el tiempo de reacción.
- Las fuentes de luz son, generalmente, estables, por lo cual permiten el desarrollo de un método reproducible.

Las condiciones que una fotorreacción debe cumplir para poder ser analíticamente útil son las siguientes:

- La luz utilizada para inducir la formación del FP debe ser fuertemente absorbida por la especie nativa, pero no por el FP.
- El rendimiento debe ser alto.
- Los FP deben ser estables durante la duración del análisis.
- El FP formado debe tener un rendimiento cuántico de fluorescencia adecuado.

Debido a las características favorables anteriormente mencionadas, se encuentra en la bibliografía un método para la determinación de un grupo de FQs (ofloxacina, enoxacina, norfloxacina y ciprofloxacina) basado en la separación de los FP de las mismas y su posterior detección por fluorescencia.⁷

1.4. CALIBRACIÓN MULTIVARIADA

En una calibración analítica se intenta encontrar la relación entre la concentración del analito con la señal o respuesta de un instrumento analítico, por lo cual es una etapa fundamental en el desarrollo de un método cuantitativo. En una calibración univariada se relaciona la concentración de un único analito en una muestra de calibración con una única señal instrumental, es decir que para cada muestra se registra un dato escalar. Un conjunto de estos datos se emplea en la construcción de una curva de señal instrumental en función de la concentración del analito, generalmente estas curvas muestran una relación lineal entre las dos variables, esto permite la obtención de los parámetros de la curva mediante una regresión lineal por mínimos cuadrados, los cuales indican cómo se relaciona la cantidad del analito con la señal instrumental. Una de las limitaciones de la calibración univariada es que sólo se puede aplicar cuando la señal es atribuible únicamente al analito de interés. Esto implica que ante la presencia de una especie interferente (lo cual suele ocurrir en muestras complejas) no se puede cuantificar un analito mediante una calibración univariada, a menos que se apliquen pretratamientos de separación o limpieza.

Las limitaciones de la calibración univariada pueden ser sorteadas mediante la utilización de algoritmos quimiométricos, los cuales hacen posible el análisis de datos de gran complejidad. La quimiometría es una disciplina que emplea matemática, estadística y lógica formal para seleccionar condiciones experimentales óptimas, extraer la mayor cantidad

posible de información analítica a partir de datos químicos y obtener conocimiento sobre distintos sistemas químicos.²² El uso de estos algoritmos permite el análisis de los datos obtenidos a partir de una calibración multivariada.

La calibración multivariada emplea una señal de orden mayor para cada muestra, por lo cual su propósito es determinar la relación entre la concentración de uno o más analitos y varias señales instrumentales. Dependiendo de la configuración del instrumento, los datos obtenidos para una sola muestra pueden tener diversos grados de complejidad:

- El dato puede ser un escalar, es decir, un objeto de orden cero, al cual le corresponde una calibración de orden cero, también conocida como calibración univariada.
- El dato obtenido puede ser organizado en forma de vector. Se dice que este objeto, el vector, tiene un único modo instrumental o que es de primer orden. Los ejemplos más comunes son los espectros y cromatogramas. Se conoce como sensor a cada uno de los valores que toma un modo instrumental. A este conjunto de datos le corresponde una calibración de orden uno, también llamada de primer orden.
- El dato puede ser organizado en forma de matriz. Este tipo de dato se denomina dato de segundo orden. Se dice que la matriz tiene dos modos instrumentales y que le corresponde una calibración de orden dos o de segundo orden.
- El dato puede contar con arreglos que tengan más modos instrumentales, lo cual deriva en arreglos de datos en tres o más modos instrumentales.

Además de los modos instrumentales (los cuales determinan el orden de los datos y de la calibración), en el caso de un grupo de muestras se puede agregar un modo adicional, el modo muestral. Entonces, por ejemplo, datos de orden cero obtenidos para varias muestras se pueden ordenar en un vector, datos de primer orden obtenidos para varias muestras se pueden arreglar en forma de matriz, datos de segundo orden para varias muestras se pueden disponer en un arreglo tridimensional, etcétera. Esto permite la utilización de una nomenclatura alternativa a la basada en la cantidad de modos instrumentales en la cual las calibraciones se denominan de acuerdo a cantidad de vías (número de modos instrumentales más modo muestral) de un arreglo para un conjunto de muestras.¹⁵ En la **Figura 5** se muestran las equivalencias entre estas dos nomenclaturas.

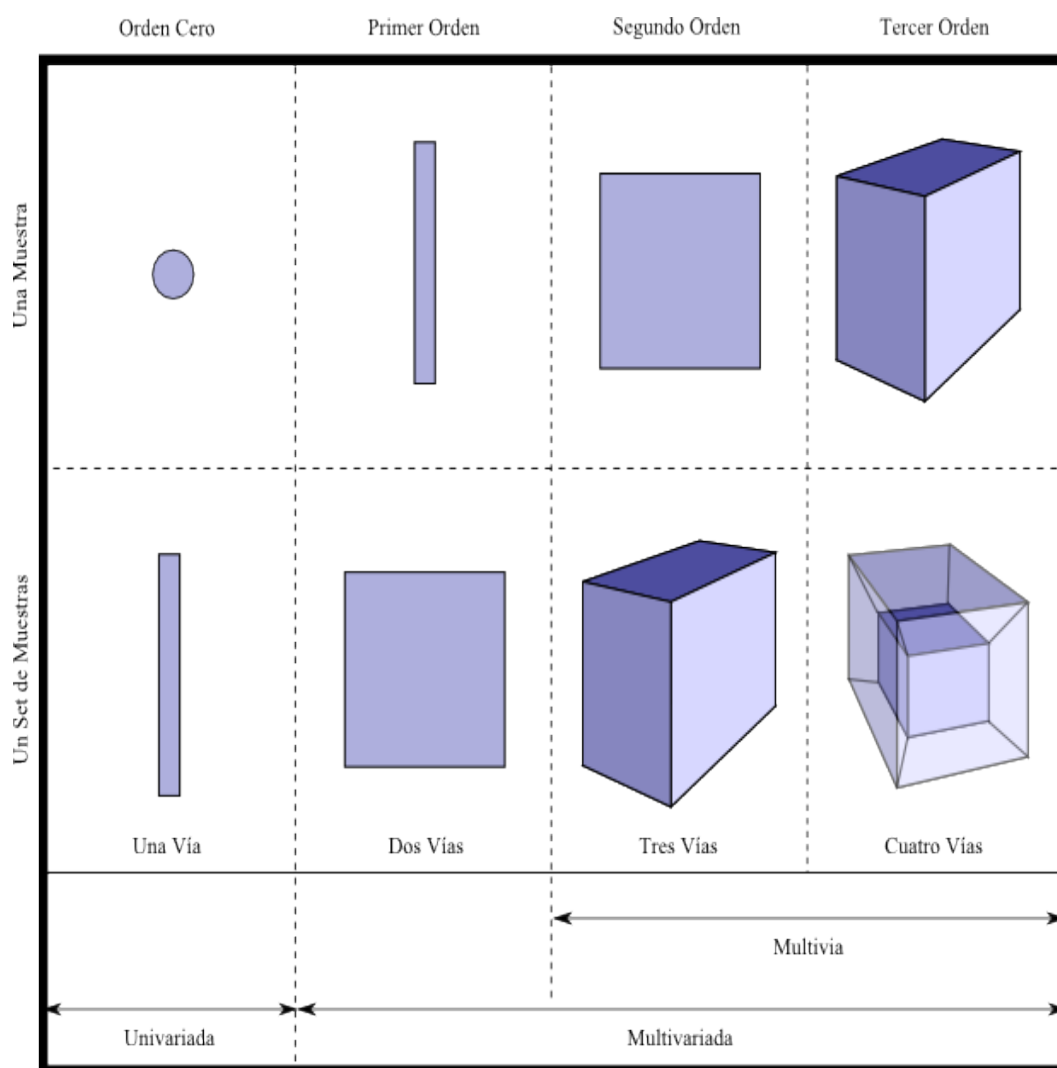


Figura 5: Tipos de arreglos de datos usados en distintas clases de calibraciones.

El empleo de calibraciones multivariadas posibilita:

- La determinación simultánea de varios analitos con mayor selectividad, debido a que cada modo instrumental otorga a los datos un grado adicional de selectividad.
- La detección de muestras *outliers*, cuya composición difiere significativamente de aquellas correspondientes a las muestras de calibración representativas. Esta propiedad recibe el nombre de Ventaja de Primer Orden.
- La cuantificación de analitos calibrados en presencia de especies interferentes que no fueron modeladas en la calibración. Esta propiedad, llamada Ventaja de Segundo Orden, se presenta en calibraciones de segundo orden u órdenes superiores, pero no en calibraciones multivariadas de primer orden.¹⁵

Utilizando un espectrofluorímetro se puede obtener a partir de una sola muestra un conjunto de datos de segundo orden, es decir, una matriz de datos, la cual se denomina matriz de excitación-emisión de fluorescencia (MEEF). Dicha matriz se consigue realizando para la misma muestra varios espectros de emisión de fluorescencia cada uno de ellos a distintas longitudes de onda de excitación o varios espectros de excitación detectando en cada uno distintas longitudes de emisión. La planificación para generar MEEF útiles consiste en:

- Definir un rango de emisión apropiado para la muestra en estudio.
- Elegir la cantidad de longitudes de onda de excitación a usar (se recomiendan entre 10 y 20 puntos para poder definir la forma de un espectro de excitación, hay que tener en cuenta que aumentar la cantidad de puntos trae como consecuencia una mayor demanda de tiempo en la recolección de datos) y el rango de los espectros de excitación. Al elegir el rango de excitación se debe tener presente la dispersión de Rayleigh y su armónico de segundo orden, que son señales intensas y angostas que se deben a la dispersión de la luz causada por el solvente. El pico de Rayleigh aparece a la longitud de onda correspondiente a la luz que excita a la muestra, mientras que su armónico de segundo orden tiene una longitud de onda dos veces más grande. Las longitudes de onda de excitación a usar deben estar distribuidas uniformemente dentro del rango elegido.
- Se obtienen los espectros de emisión de la muestra fijando la excitación en los distintos valores establecidos.

Cabe notar que también es válido seguir el proceso inverso, es decir, definir en primera instancia un rango de excitación, para luego elegir una cantidad de longitudes de onda de emisión uniformemente distribuidas dentro de un rango acorde al rango de excitación previamente definido.

1.5. PROCESAMIENTO DE DATOS

Así como en una calibración univariada es necesario conocer si la señal varía linealmente respecto a la concentración del analito o no para seleccionar el tipo de regresión a utilizar, en una calibración de segundo orden es preciso conocer si la matriz de datos de cada muestra es bilineal o no y si el arreglo de tres vías correspondiente es trilineal o no para elegir el algoritmo de calibración.

Si a una muestra que cuenta con un único constituyente se le mide el espectro de emisión de fluorescencia en J longitudes de onda, fijando la longitud de onda de excitación en K valores distintos, entonces se puede expresar (obviando el ruido instrumental) la intensidad de fluorescencia x_{jk} a longitud de onda de emisión j y longitud de onda de excitación k como el producto entre el rendimiento cuántico a longitud de onda j , b_j , y el coeficiente de extinción a longitud de onda k , c_k , se incluye la constante de proporcionalidad (concentración del constituyente, parámetros instrumentales) dentro de uno de estos dos parámetros.¹⁵

$$x_{jk} = b_j c_k \quad \text{Ec. 1}$$

Además, se puede expresar la matriz de excitación-emisión \mathbf{X} en su totalidad como un producto entre dos vectores columna, uno que representa el comportamiento de emisión del componente (\mathbf{b}) y otro para describir el comportamiento de excitación del componente (\mathbf{c}), donde el primer vector cuenta con J elementos y el segundo con K elementos, es decir tantos elementos como sensores haya en el correspondiente modo instrumental. Cada uno de estos vectores columna se conoce como perfil instrumental.

$$\mathbf{X} = \mathbf{b} \mathbf{c}^T \quad \text{Ec. 2}$$

Como \mathbf{X} es lineal en \mathbf{b} (para \mathbf{c} fijo) y lineal en \mathbf{c} (para \mathbf{b} fijo), es decir que es lineal en ambos modos instrumentales, entonces se dice que \mathbf{X} es una matriz bilineal.¹⁵

Para el caso de una muestra que contiene N componentes, se puede expresar la intensidad de fluorescencia x_{jk} , sabiendo que la señal medida es igual a la suma de las contribuciones individuales de cada uno de los N componentes, de la siguiente manera:

$$x_{jk} = b_{j1} c_{k1} + b_{j2} c_{k2} + \dots + b_{jN} c_{kN} = \sum_{n=1}^N b_{jn} c_{kn} \quad \text{Ec. 3}$$

Mientras que la matriz de datos \mathbf{X} para la muestra con N componentes se expresa como:

$$\mathbf{X} = \mathbf{B} \mathbf{C}^T \quad \text{Ec. 4}$$

Esta matriz \mathbf{X} ($J \times K$), correspondiente a una muestra con N es componentes, es bilineal sólo si se puede descomponer en el producto entre dos matrices \mathbf{B} y \mathbf{C} , donde ambas matrices tienen tantas columnas como componentes químicos hay en la muestra a partir de la cual se obtuvo la matriz \mathbf{X} . Entonces, en el caso de datos bilineales, la matriz \mathbf{B} ($J \times N$) contiene N perfiles de emisión, mientras que la matriz \mathbf{C} ($K \times N$) contiene N perfiles de excitación. Las

matrices de datos con dos modos instrumentales son bilineales si los fenómenos descritos por los modos instrumentales son independientes entre sí, hecho que se cumple en el caso de las MEEFs.¹⁵

A partir de matrices de tamaño $J \times K$ para I muestras se puede construir un arreglo tridimensional de datos de tres vías “apilando” las distintas matrices de manera tal de obtener un objeto de tamaño $I \times J \times K$, donde dos dimensiones corresponden a los modos instrumentales y la dimensión restante, al modo muestral. Cuando las matrices de datos que conforman los arreglos tridimensionales son bilineales, estos arreglos pueden ser trilineales o no trilineales. Los arreglos de datos de tres vías son trilineales cuando los perfiles instrumentales normalizados de todos los componentes son independientes del número de muestra, lo cual implica que para cada componente existe un único perfil constante de muestra a muestra que describe su comportamiento dentro de un modo instrumental. Cada elemento x_{ijk} de un arreglo tridimensional trilineal $\mathbf{\tilde{X}}$ se puede representar de la siguiente manera:

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} \quad \text{Ec. 5}$$

Donde N corresponde al número de componentes, a_{in} corresponde al valor del perfil del modo muestral para el n -ésimo componente en la i -ésima muestra, b_{jn} corresponde al valor del perfil del primer modo instrumental para el n -ésimo componente en el j -ésimo sensor del primer modo instrumental y c_{kn} corresponde al valor del perfil del segundo modo instrumental para el n -ésimo componente en el k -ésimo sensor del segundo modo instrumental.

Las MEEFs son matrices bilineales que generalmente originan arreglos de tres vías trilineales, donde para cada componente el perfil único del modo instrumental de excitación es el espectro de excitación normalizado del componente y el perfil único del modo instrumental de emisión es el espectro de emisión normalizado del componente.¹⁵ Sin embargo, si los perfiles de un mismo modo correspondientes a dos o más componentes son iguales, es decir dos o más analitos tienen espectros de emisión o excitación muy similares entre sí, las MEEFs dan lugar a arreglos de tres vías no trilineales.

Las matrices bilineales de datos que no dan lugar a un arreglo tridimensional trilineal pueden disponerse una adyacente a otra, formando así una matriz de mayor tamaño conocida como matriz aumentada, la cual a su vez puede ser bilineal o no.¹⁵ En la **Figura 6** se ilustran distintas maneras en que pueden disponerse matrices bilineales de datos de manera tal de obtener arreglos bi o tridimensionales.

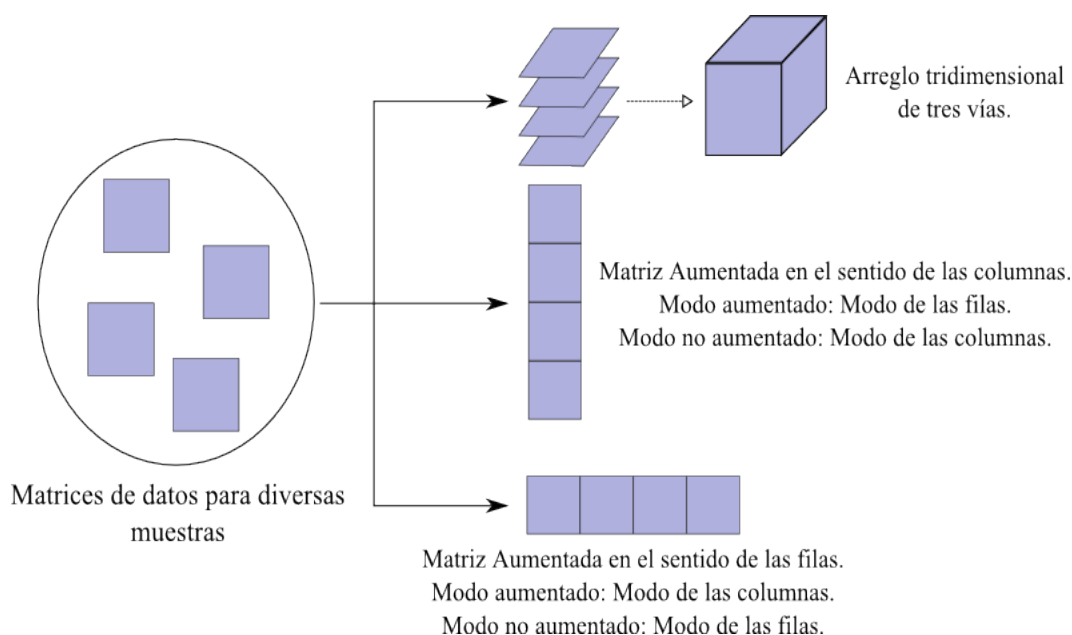


Figura 6: Representación de arreglos de matrices bilineales.

Habitualmente, los datos de especies nativas y FP se analizan por separado, sin embargo en este trabajo se propone que mediante la fusión de los datos de fluorescencia nativa y de PIF se pueden obtener resultados superiores a aquellos obtenidos por el análisis de estos datos por separado.

1.6. ANÁLISIS PARALELO DE FACTORES

El Análisis Paralelo de Factores, o PARAFAC, es un algoritmo quimiométrico utilizado para modelar arreglos de tres vías de acuerdo al modelo trilineal. El modelado de los datos consiste en el ajuste de las intensidades medidas experimentalmente (valores de x_{ijk}), las cuales conforman un arreglo tridimensional $\mathbf{\tilde{X}}$ $((I+1) \times J \times K)$ (donde J y K son el número de sensores en el primer y segundo modo instrumental, respectivamente, y $(I+1)$ es la cantidad de muestras, I muestras de calibración y una muestra incógnita), siguiendo el modelo trilineal, de manera tal de obtener los valores para a_{in} , b_{jn} y c_{kn} . El modelo se puede escribir como:²³

$$x_{ijk} = \sum_{n=1}^N a_{in} b_{jn} c_{kn} + e_{ijk} \quad \text{Ec. 6}$$

Donde e_{ijk} son los errores del modelado y el resto de los términos mantiene los significados ya detallados en la **Ec. 5**. El algoritmo determina los valores de los parámetros a_{in} , b_{jn} y c_{kn} minimizando la suma de los errores cuadrados (SSE):¹⁵

$$SSE = \sum_{i=1}^{I+1} \sum_{j=1}^J \sum_{k=1}^K e_{ijk}^2 \quad \text{Ec. 7}$$

A partir de estimaciones iniciales para a_{in} , b_{jn} y c_{kn} , mediante un proceso iterativo conocido como cuadrados mínimos alternantes (ALS), los valores para a_{in} , b_{jn} y c_{kn} se refinan hasta que SSE alcanza un valor menor que el criterio de convergencia, parámetro cuyo valor puede ser establecido por el usuario, o hasta que se supera el número máximo de iteraciones, también fijado por el usuario.

Los valores de a_{in} se almacenan en la matriz de *scores* **A** ($I \times N$), mientras que los valores de b_{jn} y c_{kn} se recogen en las matrices de *loadings* **B** ($J \times N$) y **C** ($K \times N$), respectivamente. Las columnas de las matrices **B** y **C** están normalizadas, de forma que la matriz de *scores* provee la información acerca de la concentración de los componentes, mientras que las de *loadings* dan información cualitativa respecto al comportamiento de los componentes dentro de los correspondientes modos instrumentales, es decir que las matrices de *loadings* contienen los perfiles instrumentales normalizados de los N componentes. En la **Figura 7** se representan el arreglo tridimensional $\tilde{\mathbf{X}}$, la matriz de *scores* y las matrices de *loadings*. Los *scores* (valores de a_{in}) son proporcionales a la concentración de los analitos presentes en las muestras, en particular el *score* a_{in} es proporcional a la concentración del n -ésimo componente en la i -ésima muestra (tanto en las muestras de calibración como en las de validación). Esta propiedad permite reducir un problema multivariado a uno pseudo-univariado, en este caso la calibración consiste en la construcción de una curva de *scores* de calibración en función de concentración nominal de analitos, llamada curva de calibración pseudo-univariada.¹⁵

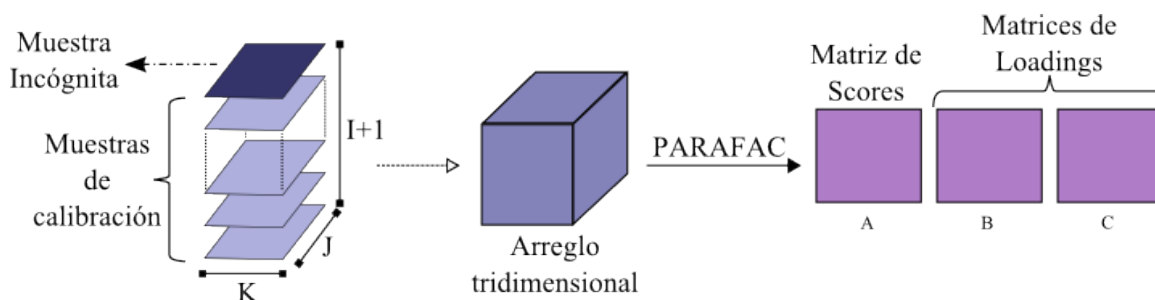


Figura 7: Representación esquemática de la formación y descomposición por PARAFAC de un arreglo de tres vías.

Para aplicar el modelo PARAFAC, se deben tomar en cuenta ciertas consideraciones:

- Inicialización del algoritmo: el proceso ALS requiere de estimados iniciales. Estos valores iniciales se pueden obtener de diversas maneras, entre ellas se encuentran la descomposición trilineal directa (DTLD), descomposición en valores singulares (SVD) y valores al azar.
- Determinación del número de componentes: el número de componentes seleccionado debe llevar a un buen ajuste del modelo (*Ec. 6*). Un parámetro relacionado con la bondad del ajuste es el error residual del modelo (s_{fit}), el cual decrece al mejorar el ajuste hasta estabilizarse en un valor óptimo, similar al ruido instrumental, que se alcanza al utilizar un número adecuado de componentes. La otra opción involucra un parámetro llamado consistencia núcleo.²⁴ En este segundo caso, se considera que se ha llegado a un número apropiado de componentes cuando el valor del parámetro cae por debajo de 50. En general, se asume que el número de componentes es adecuado si el agregado de un componente adicional no lleva a una mejora significativa del modelo sin la aparición de perfiles duplicados o ruidosos.
- Aplicación de restricciones: se pueden imponer condiciones matemáticas a los perfiles devueltos por PARAFAC, de forma tal que estos tengan sentido fisicoquímico. Por ejemplo, si uno de los modos instrumentales corresponde a emisión de fluorescencia, se puede forzar a que todos los elementos que forman los perfiles correspondientes a este modo sean positivos, ya que el rendimiento cuántico de fluorescencia no puede tener un valor negativo. El propósito de estas restricciones es forzar a las soluciones a cumplir con ciertas propiedades, para así disminuir el número de soluciones en los casos en los que hay más de una solución para la descomposición.¹⁵

Una de las ventajas de PARAFAC es que la solución al modelo para arreglos trilineales de datos es única (sin importar qué estimaciones iniciales se utilizaron para a_{in} , b_{jn} y c_{kn}), siempre y cuando se utilice el número correcto de componentes y la relación señal-ruido sea apropiada. Cuando estas dos condiciones se cumplen, el verdadero modelo trilineal subyacente en los datos es el modelo con el mejor ajuste, consecuentemente, bajo estas condiciones, la solución única es un modelo estimado que coincide con el modelo verdadero.²³

1.7. RESOLUCIÓN MULTIVARIADA DE CURVAS POR CUADRADOS MÍNIMOS ALTERNANTES

La Resolución Multivariada de Curvas por Cuadrados Mínimos Alternantes (MCR-ALS) es un método quimiométrico muy utilizado para la resolución de respuestas provenientes de una mezcla desconocida con múltiples componentes.²⁵

MCR-ALS, a diferencia de PARAFAC, puede ser aplicado a matrices de datos bilineales que no forman arreglos tridimensionales trilineales, siempre y cuando estas matrices puedan utilizarse para producir una matriz aumentada bilineal. Las matrices de datos bilineales pueden formar matrices aumentadas bilineales cuando para al menos uno de los dos modos instrumentales existen perfiles únicos para cada componente que se mantienen constantes de muestra a muestra. Se dice que el modo dentro del cual los componentes no tienen un perfil único es el modo que rompe la trilinealidad. La matriz aumentada bilineal se genera aumentando en el sentido de las columnas o de las filas, según cual sea el modo instrumental que rompe la trilinealidad. Cabe destacar que el modelo de MCR-ALS también puede ser aplicado a datos trilineales, como las MEEFs, debido a que para este tipo de datos los perfiles únicos para cada componente existen en ambos modos instrumentales.¹⁵ En este caso particular, la matriz aumentada se puede generar aumentando cualquiera de los dos modos, ya que al tratarse de datos trilineales, ninguno de los dos modos rompe la trilinealidad.

MCR-ALS está basado en la descomposición de la matriz aumentada bilineal. El ajuste de los datos se realiza de acuerdo al siguiente modelo:²⁶

$$D = C S^T + E \quad \text{Ec. 8}$$

Donde **D** es la matriz aumentada de datos construida a partir de las matrices para las muestras de calibración y la matriz para una muestra incógnita, **C** es la matriz que contiene los perfiles modelados del modo aumentado (cada uno de estos está compuesto por los sub-perfiles correspondientes a las distintas muestras, es decir que cada muestra tiene su propio sub-perfil), **S** es la matriz que contiene los perfiles modelados del modo no aumentado (los cuales son comunes a todas las muestras) y **E** es la matriz de residuos. Los *scores* (valores proporcionales a la concentración de los componentes) son las áreas bajo las curvas de cada sub-perfil, es decir que la información acerca de la concentración de los analitos en cada

muestra está contenida en la matriz **C**. Los perfiles de la matriz **S** están normalizados, en consecuencia no contienen información respecto a la concentración de analitos. Los *scores* para cada componente en cada muestra se recogen en la matriz de *scores*, generalmente denominada **A**.

En la **Figura 8** se ilustra la construcción de dos matrices aumentadas a partir de *I* matrices pertenecientes a muestras de calibración y una matriz correspondiente a una muestra incógnita, donde cada matriz individual cuenta con *J* filas y *K* columnas.

La descomposición se realiza por cuadrados mínimos alternantes, minimizando los elementos de la matriz **E**, empleando restricciones adecuadas para los datos en estudio, por ejemplo unimodalidad, no negatividad, clausura o correspondencia de especies.²⁷

A diferencia de PARAFAC, la descomposición por MCR-ALS no lleva a una solución única, debido a esto para obtener perfiles modelados que tengan sentido fisicoquímico y evitar que el algoritmo converja en una solución no deseada, es necesario:¹⁵

- Estimar un número adecuado de componentes responsables de la señal.
- Proveer al algoritmo ALS estimados iniciales similares a los verdaderos perfiles de los componentes.
- Imponer restricciones adecuadas a los perfiles de los componentes.

El número adecuado de componentes se puede estimar mediante el Análisis de Componentes Principales (PCA). En cuanto a la relación entre número de componentes y la bondad del ajuste, se sigue el mismo principio que en PARAFAC, es decir que se asume que la cantidad de componentes es adecuada si el agregado de un componente adicional lleva a la aparición de perfiles duplicados o ruidosos, o a un ajuste menos satisfactorio. Al igual que en PARAFAC, la bondad del ajuste se puede estimar mediante el error residual del modelo.

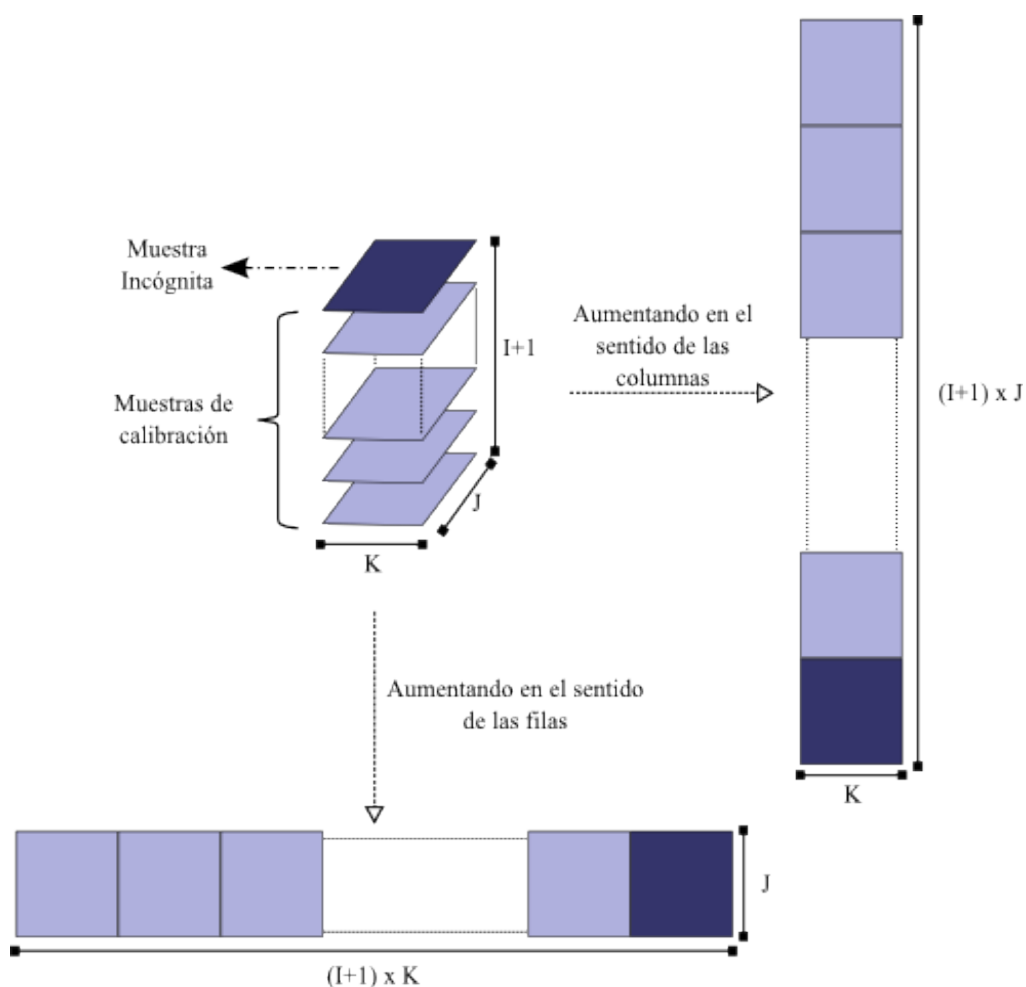


Figura 8: Representación de los dos posibles desdoblamientos de un arreglo tridimensional de datos para formar una matriz aumentada.

Se pueden obtener estimados iniciales apropiados valiéndose de las llamadas “variables más puras”, las cuales son aproximaciones de los perfiles de un modo instrumental, donde a cada variable pura le corresponde un único componente, y viceversa. Las variables más puras se extraen a partir de mezclas de composición variada mediante la aplicación un algoritmo multivariado,^{28,29} éste se conoce como *Simple-to-use Interactive Self-Modelling analysis* (SIMPLISMA). Otra alternativa consiste en proveer al algoritmo un perfil puro para cada componente, estos se pueden obtener experimentalmente de manera sencilla en el caso de analitos o señales de fondo, sin embargo, en el caso de especies desconocidas o inesperadas esta opción no se puede aplicar. Esta limitación no aplica a SIMPLISMA, ya que mediante esta se obtienen estimados iniciales para todos los componentes.

La aplicación de restricciones es necesaria para llegar a soluciones con significado fisicoquímico.³⁰ Las restricciones a aplicar dependen de la naturaleza de las técnicas analíticas empleadas, de relaciones estequiométricas, del conjunto de muestras y los constituyentes presentes en ellas, etcétera. Las restricciones pueden aplicarse a uno o más modos instrumentales, y a aquellos perfiles en que se considere necesario. Algunas de las restricciones que se pueden aplicar son:³¹

- No negatividad: fuerza a los elementos de los perfiles a ser positivos o nulos.
- Unimodalidad: fuerza la existencia de un único máximo dentro de cada perfil.
- Clausura: se impone una condición de balance de masa. Se aplica a perfiles de concentración de sistemas que involucran una reacción.
- Correspondencia de especies: fuerza la presencia o ausencia de componentes en muestras analizadas.
- Trilinealidad: es un tipo particular de las restricciones conocidas como restricciones de modelo. Esta restricción fuerza a que los perfiles modelados cumplan con un modelo trilineal.

En la **Figura 9** se representa gráficamente la descomposición de datos de segundo orden por MCR.

La restricción de trilinealidad debe ser aplicada sólo a aquellos datos que sean trilineales. Una forma de verificar experimentalmente si un conjunto de datos es trilineal es:¹⁵

- Construir la matriz aumentada en el sentido de las columnas (**D**).
- Obtener el número de componentes (**N**) de la matriz **D** por PCA.
- Construir la matriz aumentada en el sentido de las filas (**D'**).
- Obtener el número de componentes (**N'**) de la matriz **D'** por PCA.

Si, por ejemplo, el modo de las filas rompe la trilinealidad, entonces **N'** será mayor que **N**. La discrepancia entre los valores de **N** y **N'** sugiere fuertemente que el conjunto de datos no es trilineal.

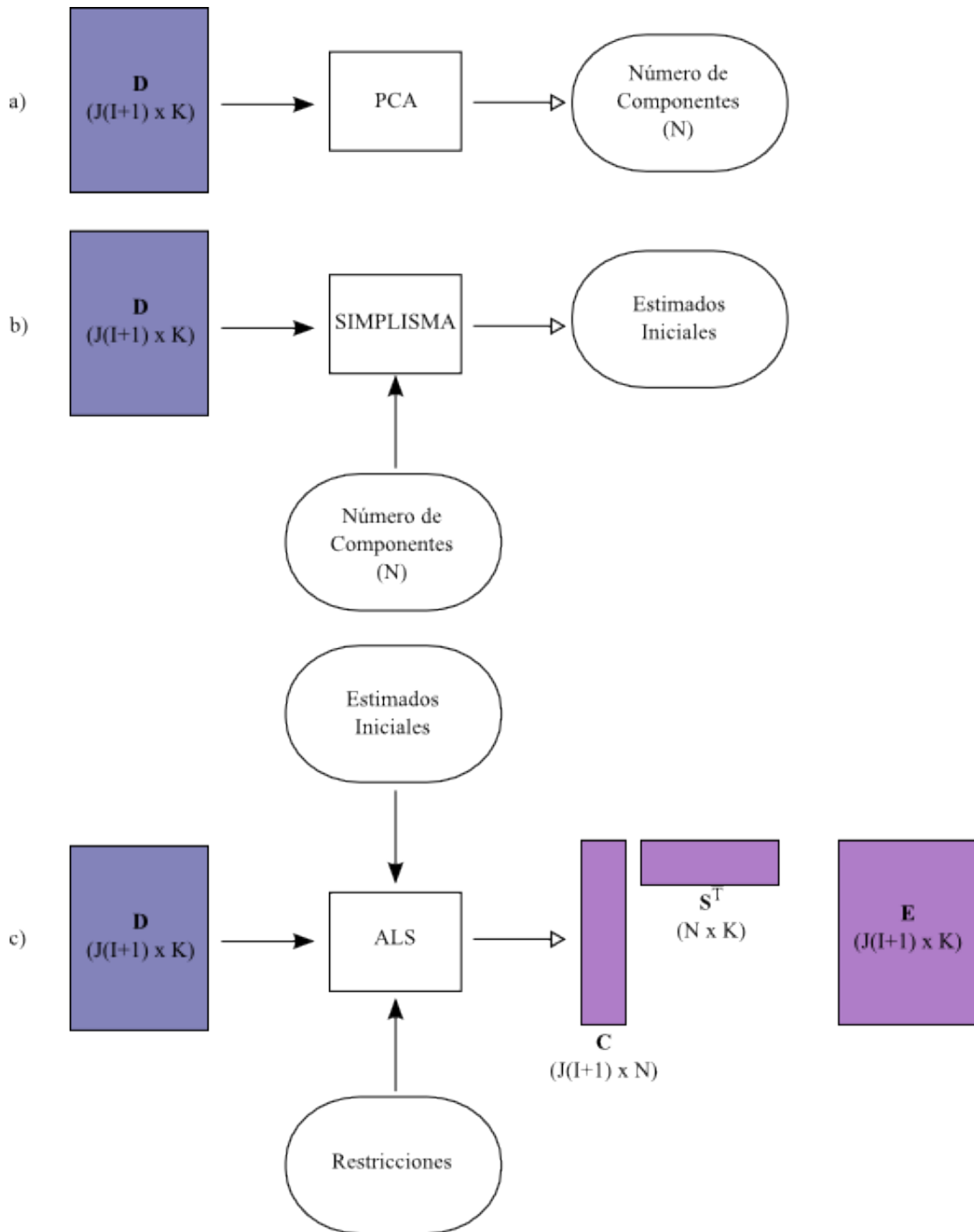


Figura 9: Representación de la descomposición por MCR de una matriz aumentada D . a) Estimación del número de componentes (N) por PCA. b) Obtención de los estimados iniciales por SIMPLISMA. c) Obtención de los perfiles modelados (matrices C y S^T) por ALS, donde J es la cantidad de sensores en un modo instrumental y K es la cantidad de sensores en el restante modo instrumental, I es la cantidad de muestras de calibración y E es la matriz de residuos.

1.8. FUSIÓN DE DATOS

La fusión de datos consiste en la combinación de señales provenientes de diferentes técnicas analíticas, de diversas fuentes u obtenidas bajo diferentes condiciones, con el propósito de mejorar la capacidad predictiva de un método analítico. La combinación puede llevarse a cabo mediante tres estrategias:³²

- Fusión a nivel de los datos: se basa en la combinación de datos obtenidos a partir de diferentes técnicas analíticas, de diversas fuentes u obtenidas bajo diferentes condiciones y su posterior procesamiento a través de un método quimiométrico, con el propósito de obtener un modelo predictivo único para todos los datos. La combinación puede o no requerir un preprocesamiento matemático de los datos (normalización, transformación Min Max, etc.), dependiendo de la naturaleza de los mismos.
- Fusión a nivel de las variables: se basa en la extracción de variables a partir de cada arreglo de datos original y en la subsiguiente combinación de estas variables en un único arreglo, el cual se utiliza para obtener un único modelo predictivo.
- Fusión a nivel de las decisiones: consiste en la construcción de modelos predictivos para cada uno de los arreglos de datos originales para la posterior combinación de los resultados obtenidos a partir de estos modelos predictivos.

Se pueden encontrar en la literatura diversas publicaciones en las que se utiliza la fusión de datos de primer³³⁻³⁵ o segundo orden.^{35,36} En este trabajo en particular se fusionaron datos de segundo orden de tipo MEEF y matrices de excitación-emisión de fluorescencia de fotoproducto (MEEFP), para la determinación de cinco contaminantes emergentes mediante un algoritmo basado en MCR-ALS.

1.9. OBJETIVOS

1.9.1. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y aplicar un método para la cuantificación de un grupo de contaminantes emergentes, basado en espectroscopía de fluorescencia molecular acoplada a calibración multivariada con fusión de datos.

1.9.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Optimizar las condiciones experimentales para la obtención de datos de segundo orden del tipo MEEFs de los analitos en estudio.
- Construir y validar una calibración de segundo orden utilizando los datos MEEFs obtenidos.
- Analizar las ventajas de la fusión de datos a través de la comparación entre los resultados obtenidos mediante el método propuesto y los obtenidos a partir del modelado de los datos sin fusionar.
- Aplicar el método desarrollado al análisis de muestras reales.
- Validar el método desarrollado para muestras reales frente a un método de referencia (HPLC-UVD).

2. EXPERIMENTAL

2.1. REACTIVOS

Los analitos fueron obtenidos de los siguientes proveedores:

- Enoxacina de Fluka (Seelze, Alemania).
- Danofloxacin y sarafloxacin de Riedel-de Hane (Alemania).
- Ofloxacin de Sigma (Seelze, Alemania).
- Naproxeno de Fluka (St. Louis, EEUU).
- Acetonitrilo y metanol de Merck (Darmstadt, Alemania).
- Agua ultrapura obtenida mediante un sistema Millipore (Massachusetts, EEUU).

2.2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN PARA MÉTODOS FLUORESCENTES

Las soluciones madre de los analitos de concentraciones comprendidas entre 200-500 mg L⁻¹ fueron preparadas mediante pesada en balanza analítica de los analitos y posterior disolución de cada analito en metanol. Soluciones intermedias de concentraciones 2-5 mg L⁻¹ fueron preparadas también en metanol por dilución de las soluciones madre. Tanto las soluciones madre como las intermedias se almacenaron en frascos de color caramelo y en heladera, de forma de prevenir la descomposición de los analitos. Las soluciones de trabajo de calibración y validación fueron preparadas inmediatamente antes de su uso midiendo alícuotas adecuadas de las soluciones intermedias, evaporando con aire comprimido el metanol de dichas alícuotas y llevando a volumen con una mezcla 1:1 de acetonitrilo y buffer fosfato ácido - fosfato diácido (pH=7,00; Concentración analítica del buffer: Ca=5mM).

2.3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS DE CALIBRACIÓN PARA MÉTODO DE REFERENCIA

Las soluciones de trabajo de calibración fueron preparadas emitiendo alícuotas de las soluciones intermedias en matraces, evaporando el solvente mediante el uso de una corriente de aire y agregando volúmenes de acetonitrilo y buffer fosfato diácido - ácido fosfórico (pH=3,0; Concentración analítica del buffer: Ca=5mM) de forma tal que la proporción fase acuosa - fase orgánica final de la muestra fuese igual a la composición de la fase móvil inicial del cromatógrafo. Luego, las muestras fueron filtradas utilizando un cabezal de acero inoxidable con filtro de nylon de 0,45 micras y jeringa.

2.4. PREPARACIÓN DE MUESTRAS REALES

Se analizaron muestras reales de agua ambientales contaminadas con los analitos en estudio. Las muestras de agua se recogieron en botellas de vidrio con tapas de recubrimiento de politetrafluoroetileno y se conservaron a 4 °C hasta el momento del análisis.

Las muestras provinieron de diferentes sectores de un sistema de humedales para el tratamiento de desechos de una planta de cría de perros en la ciudad de Santa Fe, Argentina.

Debido a la presencia de turbidez, las muestras reales fueron filtradas con cabezal de acero inoxidable con filtro de nylon de 0,45 micras y jeringa. Posteriormente, fueron recogidas en sendos tubos de ensayo. A partir de cada uno de estos se tomaron dos alícuotas; una para espectroscopía de fluorescencia y la otra para el método de referencia. El análisis por ambos métodos de cada una de estas muestras se realizó durante el mismo día.

2.4.1. MUESTRAS REALES PARA ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Se tomaron alícuotas de 2,00 ml de cada muestra filtrada utilizando pipetas aforadas y las mismas fueron emitidas en matraces de 5,00 ml. Posteriormente, se reguló el pH mediante la

adición de 500 μL de buffer fosfato monoácido - fosfato diácido ($\text{pH}=7,00$), y se llevó a volumen utilizando acetonitrilo (concentración analítica final del buffer: 2,5mM), obteniéndose así muestras que sufrieron una dilución 2:5. Seguidamente, las muestras se filtraron nuevamente por el método explicado anteriormente y se analizaron siguiendo el método detallado en la **Sección 2.6**.

2.4.2. MUESTRAS REALES PARA CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Se tomaron alícuotas de 880 μL de cada muestra filtrada utilizando una micropipeta de 1000 μL y se emitieron en sendos viales de 1 ml. Luego se añadieron 120 μL de acetonitrilo y 10 μL de buffer fosfato diácido – ácido fosfórico ($\text{pH}=3,00$) (concentración analítica final del buffer: 5mM). En este caso, cada muestra sufrió una dilución 22:25. Por último, las muestras fueron analizadas mediante el método descrito en la **Sección 2.7**.

2.5. INSTRUMENTAL

Las medidas de fluorescencia se realizaron utilizando un espectroluminómetro Perkin Elmer LS 55 (Norwalk, EEUU) equipado con una lámpara pulsante de xenón. En todos los casos se empleó un ancho de ranura de 10 nm tanto para la excitación como para la emisión, se utilizó una velocidad de scan de 1200 nm min^{-1} y se fijó el voltaje del fotomultiplicador en 650 V. Para todas las medidas se utilizó una celda de cuarzo con un paso óptico de 1 cm.

Las fotorreacciones fueron llevadas a cabo en un fotorreactor sencillo construido en el laboratorio de la cátedra de química analítica de la FBIOyF. El mismo consta de dos tubos germicidas de 4W. La **Figura 10** es una representación del fotorreactor utilizado. Los tiempos de reacción y reposo fueron fijados de manera tal de asegurar la formación de un FP que contase con una intensidad de fluorescencia constante en el tiempo bajo las condiciones de trabajo. Los tiempos de reacción y reposo se fijaron en 7 min y 3 min, respectivamente.

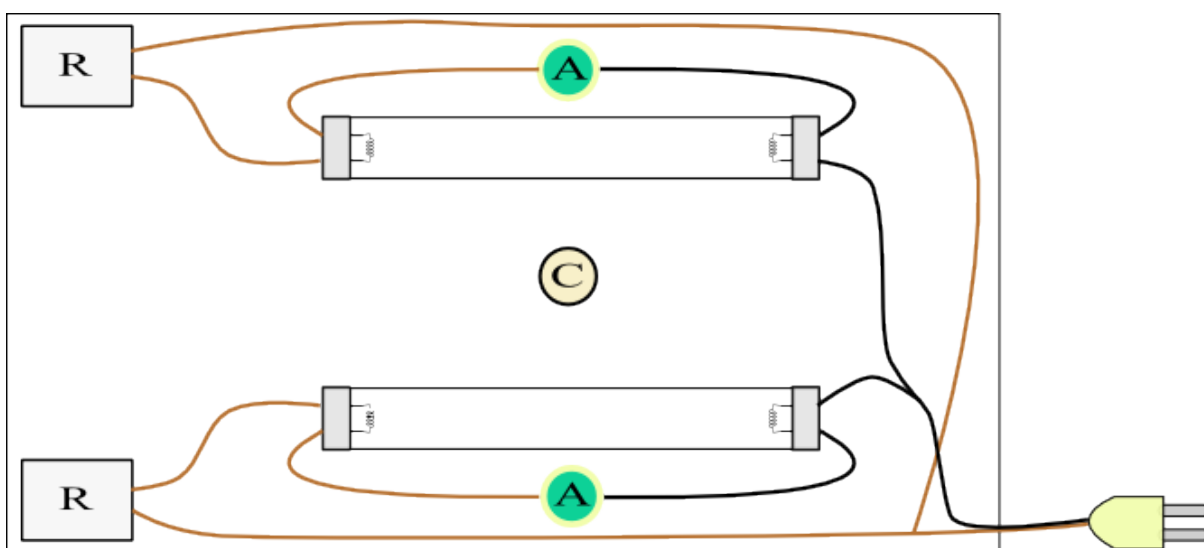


Figura 10: Representación del fotorreactor. C: celda de cuarzo. R: reactancia. A: arrancador.

Las corridas cromatográficas se realizaron utilizando un cromatógrafo líquido Shimadzu (Kyoto, Japón) equipado con bomba binaria, detector de luz ultravioleta-visible, un inyector Rheodyne con carga de 20 μL , columna cromatográfica Eclipse XDB-C18 de 4,6 mm \times 150 mm de diámetro interno y largo, respectivamente, y partículas de 5 μm de tamaño y compartimento termostatizador de columna.

Se ajustaron los valores de pH de los buffers utilizando un pH-metro Orion 420 Thermoscientific (Waltham, EEUU).

2.6. DETERMINACIÓN DE ANALITOS POR FLUORESCENCIA CON CALIBRACIÓN DE SEGUNDO ORDEN

Para todas las muestras se siguió el mismo procedimiento básico para obtener las correspondientes MEEFs:

- Obtención de la MEEF de la muestra en su forma nativa.
- Realización de la fotorreacción (Tiempo de reacción: 7 min), estando la muestra todavía contenida en la cubeta de fluorescencia.
- Reposo (3 min).
- Obtención de la MEEFP.

Para todas las muestras, y tanto como para las formas nativas como para las FP, las MEEFs fueron obtenidas registrando 24 espectros de excitación a distintas longitudes de onda de emisión, el rango de excitación de los espectros de excitación se definió entre 245 nm y 300 nm y se registraron valores de intensidad cada 0,5 nm de longitud de onda de excitación. El rango de emisión utilizado se fijó entre 360 nm y 475 nm y se desplazó la longitud de onda de emisión 5 nm entre espectros de excitación consecutivos (24 espectros de excitación con 111 datos cada uno o 111 espectros de emisión con 24 datos cada uno, dando un total de 2664 datos por cada MEEF). El modo instrumental de excitación se registró en las columnas, y el de emisión en las filas, por lo tanto, cada MEEF constó de 111 filas y 24 columnas.

2.7. MÉTODO DE REFERENCIA

Las corridas cromatográficas se realizaron de la misma manera para todas las muestras. Las condiciones utilizadas se obtuvieron basándose en un trabajo disponible en bibliografía.³⁷ Como fase móvil se utilizó una mezcla de acetonitrilo y buffer fosfato diácido - ácido fosfórico (pH=3,0; Ca=5mM). Se realizó para todas las muestras una elución con gradiente, la cual se detalla en la *Figura 11*. El tiempo de duración de cada corrida fue de quince minutos a un flujo total de 1,31 ml min⁻¹. El volumen de inyección utilizado fue de 20 µL. Se fijó la longitud de onda de detección a 280 nm. Los solventes fueron previamente filtrados a través de membranas de nylon de 0,22 micras.

Composición de la fase móvil

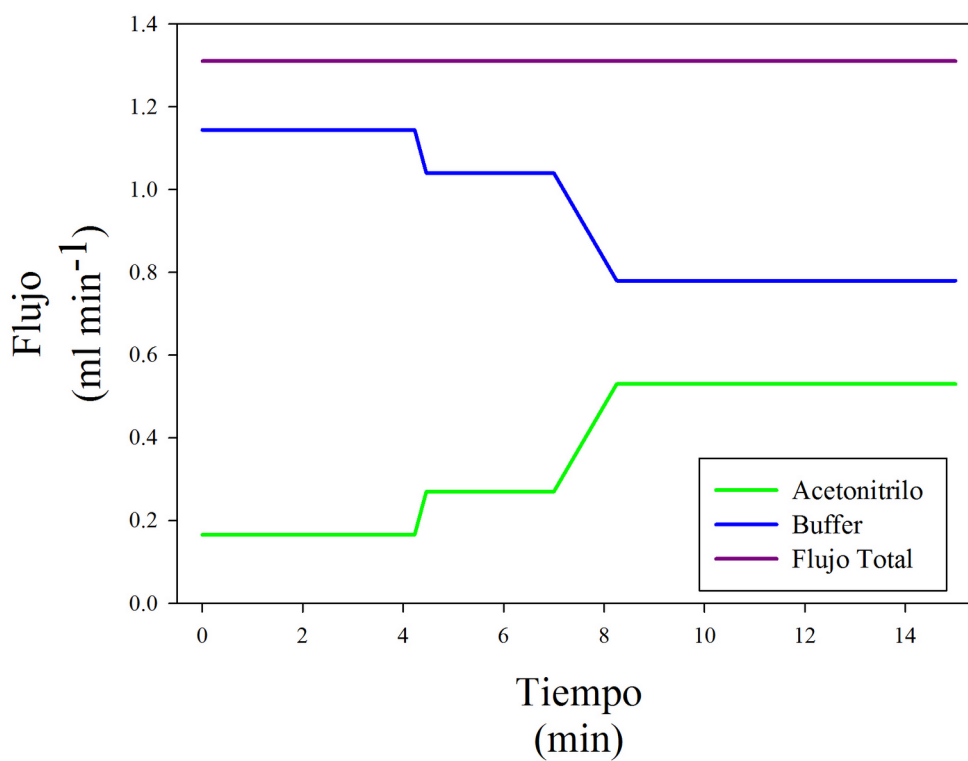


Figura 11: Representación gráfica de la composición de la fase móvil en las corridas de HPLC.

2.8. CALIBRACIÓN Y VALIDACIÓN PARA MÉTODOS DE ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA

Se preparó un conjunto de catorce muestras de calibración para la determinación simultánea de danofloxacina, ofloxacina, sarafloxacina, enoxacina y naproxeno en muestras acuosas. Para ocho de estas muestras se utilizó un diseño multifactorial de dos niveles fraccionario, además se incluyeron un blanco y una muestra de cada uno de los analitos puros a un nivel de concentración intermedio. Por otro lado, se preparó un conjunto de diez muestras de validación con concentraciones de valores aleatorios dentro del rango de concentración del rango de calibrado. Se detalla la composición de las muestras de calibración y validación en las **Tabla 2** y **Tabla 3**, respectivamente.

Calibración				
Danofloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ofloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sarafloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Enoxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Naproxeno ($\mu\text{g L}^{-1}$)
6	12	100	40	5
20	12	10	8	5
20	100	100	40	40
6	100	100	8	5
6	12	10	40	40
20	12	100	8	40
6	100	10	8	40
20	100	10	40	5
0	0	0	0	0
10	0	0	0	0
0	52	0	0	0
0	0	50	0	0
0	0	0	20	0
0	0	0	0	20

Tabla 2: Composición de las muestras de calibración.

Validación				
Danofloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ofloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sarafloxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Enoxacina ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Naproxeno ($\mu\text{g L}^{-1}$)
16	96	21	27	18
18	62	27	38	20
2	16	40	34	14
18	97	96	15	10
13	25	33	36	26
2	49	12	7	30
6	80	43	21	29
11	14	47	10	6
16	95	84	32	22
5	34	75	6	5

Tabla 3: Composición de las muestras de validación.

2.9. CALIBRACIÓN PARA MÉTODO DE REFERENCIA

Se preparó un conjunto de diez muestras de calibración para la determinación simultánea de danofloxacin, ofloxacin, sarafloxacin, enoxacin y naproxeno en muestras acuosas, la composición de las mismas se detalla en la **Tabla 4**. La calibración se realizó con cuatro niveles y ceros por duplicado.

Calibración				
Danofloxacin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ofloxacin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Sarafloxacin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Enoxacin ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Naproxeno ($\mu\text{g L}^{-1}$)
0	20	60	80	100
20	60	100	100	0
50	100	140	0	20
80	140	0	20	50
100	0	20	48	80
0	20	60	80	100
20	60	100	100	0
50	100	140	0	20
80	140	0	20	50
100	0	20	48	80

Tabla 4: Composición de las muestras de calibración del método de referencia.

2.10. ANÁLISIS DE DATOS

2.10.1. DATOS DE ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los datos de las especies nativas y de los FP, tanto los correspondientes a muestras de validación como los correspondientes a las reales, fueron modelados utilizando PARAFAC para el caso de los datos por separado y MCR-ALS para los datos fusionados.

En el caso de PARAFAC, los datos de especies nativas y FP se analizaron por separado, es decir que se realizaron dos descomposiciones trilineales por PARAFAC para cada conjunto de muestras (MEEF-PARAFAC y MEEFP-PARAFAC). El número de componentes se

determinó valiéndose del s_{fit} y de la forma de los perfiles espectrales. Los estimados iniciales fueron obtenidos por SVD. Se aplicó la restricción de no negatividad a los tres modos (*scores*, emisión y excitación). Una vez alcanzada la convergencia, los analitos se identificaron por sus perfiles espectrales y fueron cuantificados mediante la correspondiente curva de calibración pseudo-univariada.

Para el caso de MCR-ALS, los datos de especies nativas y FP fueron fusionados, es decir que se realizó sólo una descomposición trilineal por MCR-ALS (MEEF-MEEFP-MCR-ALS). El funcionamiento del algoritmo fusionado se desarrolla en la siguiente sección. El número de componentes fue determinado por PCA. Como estimados iniciales para los analitos se utilizaron los verdaderos espectros de excitación, mientras que para interferentes los estimados iniciales se obtuvieron por medio del algoritmo SIMPLISMA. Se aplicaron las restricciones de no negatividad (en ambos modos instrumentales), de correspondencia de especies, trilinealidad y de proporcionalidad de *scores*. Como criterio de convergencia se utilizó un valor de 0,01%. Se empleó como modo aumentado el modo instrumental de emisión; esto implicó, dada la disposición original de cada MEEF, un aumento en el sentido de las filas. Al alcanzarse la convergencia, los analitos se cuantificaron utilizando la correspondiente curva de calibración pseudo-univariada.

2.10.2. FUSIÓN DE DATOS: RESTRICCIÓN DE PROPORCIONALIDAD DE *SCORES*

Como se detalló previamente, se obtuvieron dos tipos de datos de fluorescencia complementarios de segundo orden: MEEFs y MEEFPs, y se procedió a analizarlos conjuntamente mediante un algoritmo de fusión de datos basado en MCR-ALS. En este caso en particular, los datos obtenidos tuvieron las mismas dimensiones y estuvieron constituidos por el mismo tipo de señal instrumental. Sin embargo, cabe destacar que el método de fusión de datos propuesto puede ser aplicado a conjuntos de datos que posean distinto número de sensores en sus modos instrumentales y a datos de diferente origen.

El método de análisis de datos propuesto implicó una fusión de datos a nivel de las variables y se basó en las siguientes etapas:

- Se construyeron dos matrices aumentadas, **D1** (a partir de las MEEFs) y **D2** (a partir de las MEEFPs). Se decidió aumentar las matrices en el modo “emisión de fluorescencia”, ya que en este caso fue el modo espectral menos selectivo.
- Se calculó el número de componentes en ambos *sets* de datos a partir de PCA. Si bien normalmente el número de componentes (N) coincide para ambos *sets* de datos, en caso de que no sea así, se emplea el mayor N obtenido.
- Se obtuvieron los estimados iniciales. En este trabajo, los estimados iniciales de los analitos en estudio fueron los espectros de excitación experimentales, mientras que los estimados iniciales de los interferentes se obtuvieron mediante la aplicación del algoritmo SIMPLISMA.
- Se empleó el algoritmo MCR-ALS para obtener los perfiles modelados **B1**, **B2**, **C1** y **C2**, es decir los perfiles de emisión aumentados y de excitación, para el *set* de fluorescencia nativa y de fotoproducto, respectivamente. Durante el proceso de ALS se aplicaron las restricciones convencionales (no negatividad, correspondencia de especies y trilinealidad) y, además, se definió y aplicó una nueva restricción: proporcionalidad de *scores*. Esta restricción implica que los *scores* de los analitos para el modelo de MEEF y MEEFP (almacenados en las matrices **A1** y **A2**, respectivamente) sean proporcionales entre sí, mediante el código de MATLAB presentado en la **Figura 12**.
- Se obtuvieron dos modelos, uno correspondiente a las MEEFs y otro para el conjunto de MEEFPs, en los cuales se cumple que para el n-ésimo analito en la i-ésima muestra: $a_{1,i,n} \propto a_{2,i,n}$, siendo estos términos los elementos correspondientes a la i-ésima fila y a la n-ésima columna de las matrices **A1** y **A2**, respectivamente
- A partir de los *scores* del modelo MEEF se calcularon las curvas de calibración pseudo-univariadas de los analitos, y se procedió a la predicción de las concentraciones de los analitos en las muestras *test*, es decir, muestras de validación o reales.

La nueva restricción de MCR-ALS propuesta en este trabajo se basa en que los *scores* de los analitos son proporcionales a sus concentraciones. Entonces, para una muestra dada, si bien los perfiles de fluorescencia nativa y de fluorescencia de FP son diferentes, ambos deben ser proporcionales a las concentraciones de los analitos, y por lo tanto, entre sí. Esto se traduce en que los *scores* de un analito para el modelo MEEF y MEEFP también deben ser

proporcionales. De este modo, si bien se obtienen dos matrices de *scores*, puede utilizarse cualquiera de las dos, de forma indistinta, para construir las curvas de calibración pseudo-univariadas.

```

for i=1:Nsamp
    for n=1:N
        if A2(i,n)>0.1
            B2(daug*(i-1)+1:daug*i,n)=B2(daug*(i-1)+1:daug*i,n)*A1(i,n)/A2(i,n);
        end
    end
end
end

```

Figura 12: Código a través del cual se aplicó la restricción de proporcionalidad de *scores*. Donde *Nsamp*: número total de muestras; *N*: número de componentes; **A2**: matriz de *scores* de PIF; **A1**: matriz de *scores* de fluorescencia nativa; **B2**: matriz que contiene los perfiles de emisión de PIF; *daug*: número de sensores de emisión de fluorescencia por cada muestra; *i* y *n*: variables auxiliares.

Es importante tener en cuenta que si existen componentes no calibrados en las muestras de *test*, no corresponde aplicar la restricción de proporcionalidad de *scores* para los mismos, ya que MCR-ALS puede modelar como un único componente a una mezcla de interferentes, y por lo tanto forzar a sus *scores* a ser proporcionales no tiene sentido químico. Por otro lado, si algún analito no posee señal instrumental significativa en uno de los métodos empleados, no es recomendable aplicar la restricción de proporcionalidad de *scores* a dicho componente, ya que estos serán cercanos a cero, lo cual puede llevar un error mayor y a una disminución de la calidad del modelado. En este caso, se debe emplear el *set* de *scores* correspondiente al método instrumental de mayor señal para la construcción de la curva pseudo-univariada del analito en cuestión.

El algoritmo desarrollado fue aplicado por medio de una rutina desarrollada en el laboratorio del departamento de Química Analítica de la FBIOyF escrita en entorno MATLAB, basada en el código de MCR-ALS disponible en internet.²⁵

En la **Figura 13** se presenta un diagrama ilustrativo del funcionamiento del algoritmo descrito.

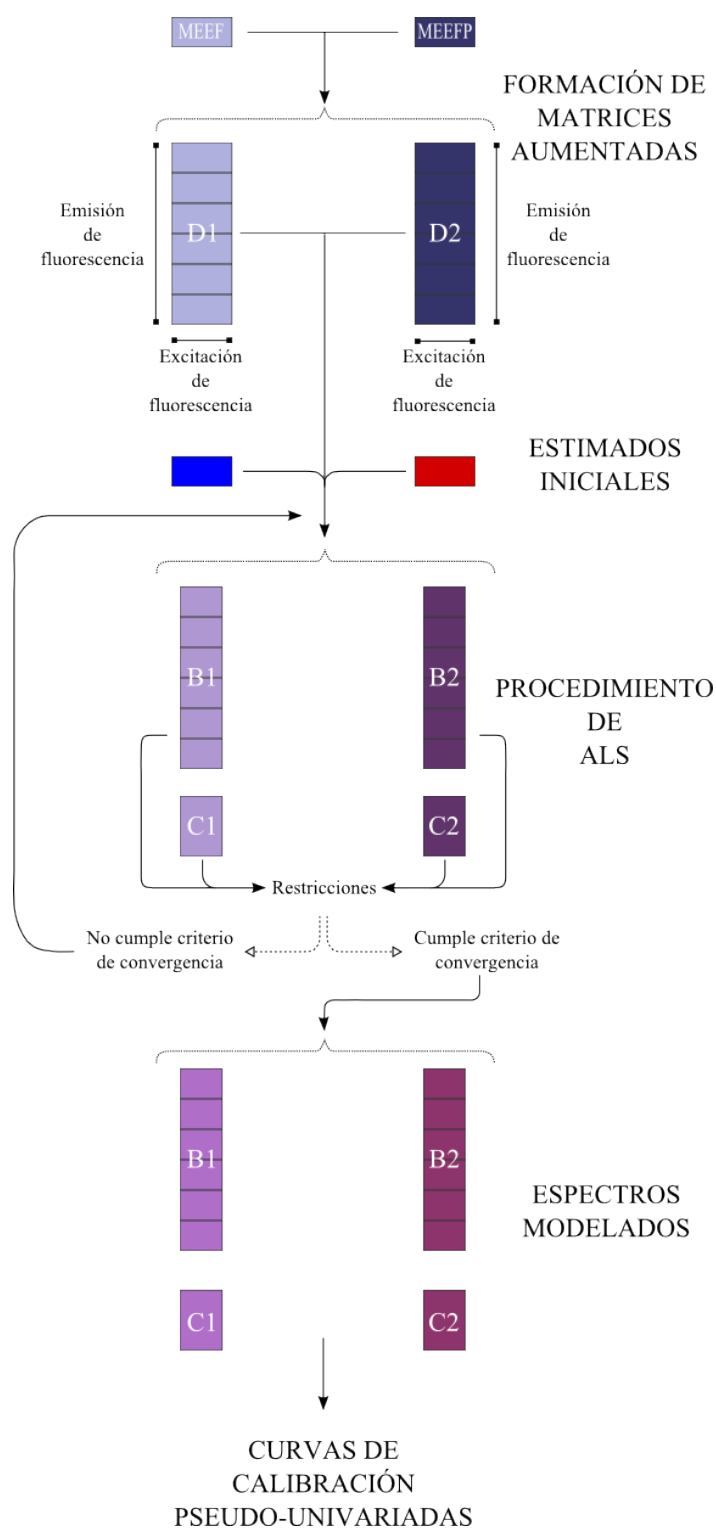


Figura 13: Representación esquemática del funcionamiento del algoritmo quimiométrico con fusión de datos empleado para obtener las curvas de calibración pseudo-univariadas de los analitos, donde **D1** y **D2** son las matrices aumentadas formadas a partir de las MEEFs y MEEFPs, respectivamente; **B1** y **B2** son las matrices que contienen los sub-perfiles del modo aumentado para las muestras nativas y de FP, respectivamente; **C1** y **C2** son las matrices que contienen los perfiles únicos del modo no aumentado para las muestras nativas y de FP, respectivamente.

2.10.3. DATOS DE CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Una vez realizadas las corridas cromatográficas, se cuantificaron los analitos mediante respectivas calibraciones univariadas y se calcularon las cifras de mérito de las mismas.

2.11. SOFTWARE

Las MEEFs se analizaron por PARAFAC utilizando la interfaz gráfica MVC2,¹⁵ integrada a un entorno de MATLAB, y por MCR-ALS utilizando una rutina desarrollada en el laboratorio de química analítica de la FBIOyF, escrita en entorno MATLAB. Las calibraciones univariadas del método de referencia se realizaron utilizando la rutina lr_cal, escrita en entorno MATLAB. Los gráficos e imágenes fueron elaborados en SigmaPlot 11.0 y en Inkscape 0.48.5. Las representaciones de las estructuras de los analitos se realizaron en ChemSketch 2019.2.1.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con el propósito de desarrollar un método analítico que permita la cuantificación simultánea de contaminantes emergentes en muestras de agua, se decidió utilizar fluorescencia y PIF en combinación con una calibración de segundo orden.

Se optimizaron las condiciones experimentales (pH, solvente, tipo de buffer, concentración del buffer, tiempos de reacción y reposo) para la obtención de MEEFs a partir de soluciones de los analitos.

Se registraron MEEFs de los analitos en estudio, bajo condiciones experimentales previamente optimizadas. Los datos obtenidos se analizaron mediante distintos algoritmos (PARAFAC y MCR-ALS) para demostrar que la fusión de datos lleva a mejores resultados que el análisis por separado. Las calibraciones obtenidas por cada algoritmo fueron utilizadas para determinar la concentración de los analitos en un conjunto de muestras de validación y en muestras reales.

Los resultados obtenidos utilizando el método propuesto fueron validados frente a un método de referencia (HPLC-UVD).

3.1. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES EXPERIMENTALES

Se realizaron ensayos cualitativos preliminares para determinar las condiciones experimentales de los ensayos de fluorescencia y PIF, estas condiciones fueron: pH, solvente, buffer, concentración del buffer, proporción solvente:buffer, rango de longitudes de onda de excitación y emisión, y tiempo de fotoreacción y reposo.

En las espectroscopía de fluorescencia y en PIF se precisa que las muestras sean translúcidas, es decir, que los componentes de las muestras estén completamente disueltos. Además, para que la fusión de datos dé lugar a una mejoría relevante en la cuantificación de los analitos en estudio, debe haber diferencias significativas entre el espectro de la especie nativa y el espectro del FP correspondiente. Teniendo esto en cuenta, se desarrollaron ensayos

de solubilidad, de fluorescencia y de PIF para determinar el solvente correcto, las especies a utilizar como buffer, la concentración del buffer y la proporción solvente:buffer en las soluciones de trabajo. Se realizaron ensayos con tres tipos de buffer, acetato - ácido acético, citrato - citrato ácido y fosfato ácido - fosfato diácido (en distintas concentraciones y valores de pH), y dos solventes, metanol y acetonitrilo. En la **Tabla 5** se describen las distintas combinaciones ensayadas.

Denominación de la mezcla solvente	Buffer			Solvente Orgánico	Proporción final de Buffer - Solvente orgánico
	Especies	Concentración analítica (mM)	pH		
I	Acetato - Ácido acético	25	4,2	Acetonitrilo	1:1
II	Citrato - Citrato ácido	25	6,0	Acetonitrilo	1:1
III	Citrato - Citrato ácido	25	6,0	Acetonitrilo	30:70
IV	Citrato - Citrato ácido	10	6,0	Acetonitrilo	30:70
V	Citrato - Citrato ácido	10	6,0	Metanol	15:85
VI	Fosfato ácido - Fosfato diácido	5	7,0	Acetonitrilo	1:1
VII	Fosfato ácido - Fosfato diácido	5	7,0	Metanol	1:1

Tabla 5: Detalle de las mezclas solvente para espectroscopía de fluorescencia con las que se realizaron ensayos.

Los pH de los buffer se seleccionaron teniendo en cuenta las constantes de disociación ácida de los analitos (**Tabla 1**) y experiencias previas del grupo de trabajo, en las que se

observó que los FP se formaban en la formas ácida y en el zwitterión de los analitos. De igual manera, se eligieron los solventes de acuerdo a su miscibilidad con agua y tomando en cuenta experiencias anteriores.

En los ensayos de solubilidad, fluorescencia nativa y PIF para las distintas mezclas de solventes se observó:

- Mezcla de solvente I: Durante la fotorreacción de la danofloxacin y ofloxacin no se forma el fotoproducto, sino que ocurre una degradación de los analitos, dando lugar a la formación de productos sin comportamiento fluorescente apreciable.
- Mezclas de solvente II, V y VII: se forman los fotoproductos, pero estos presentan un comportamiento fluorescente similar al de sus respectivas especies nativas.
- Mezclas de solvente III y IV: ocurre la precipitación del buffer al agregarse el solvente orgánico.
- Mezcla de solvente VI: no ocurre precipitación y los analitos presentan un cambio importante en las propiedades fluorescentes al pasar desde la especie nativa al fotoproducto.

Como consecuencia de los ensayos, se concluyó que se debía utilizar una mezcla de acetonitrilo y fosfato ácido - fosfato diácido como solvente. Se optó por una concentración del buffer de 5 mM y una proporción 1:1 de acetonitrilo: buffer fosfato ácido - fosfato diácido, ya que esta combinación no lleva a precipitación del buffer y permite un cambio sustantivo en los espectros de fluorescencia al pasar de las especies nativas a las FP.

Se observó que al irradiar los analitos, la sarafloxacin reacciona de manera más lenta que el resto. Por lo tanto, se determinaron las condiciones para obtener una reacción completa de la sarafloxacin, ya que estas equivalen a las condiciones necesarias para obtener una reacción completa para todos los analitos. Se fijaron el tiempo de reacción y el de reposo en 7 y 3 minutos, respectivamente.

En la **Figura 14** se representan los espectros normalizados de excitación y emisión de fluorescencia y PIF de los analitos, tomados desde una MEEF. En estos gráficos se observa el gran grado de superposición que existe entre los analitos. Tanto para las especies nativas como para las FP, los espectros de emisión y excitación de la danofloxacin, la sarafloxacin y la ofloxacin están altamente superpuestos. Como la intensidad de la forma nativa de la enoxacin es despreciable, esta fluoroquinolona sólo afecta la cuantificación por PIF de los restantes analitos, presenta un alto nivel de superposición con el naproxeno, danofloxacin y

sarafloxacin en su espectro de excitación, mientras que su espectro de emisión se superpone con los correspondientes a la danofloxacin y sarafloxacin. Este elevado grado de superposición impide la cuantificación simultánea de estos analitos por fluorescencia utilizando una calibración de orden cero o de primer orden, y justificando el uso de una calibración de segundo orden. Teniendo en cuenta que aumentar la cantidad de sensores en los espectros causa un aumento en el tiempo requerido para registrar la MEEF, se fijaron los rangos de longitud de onda de excitación y emisión de manera tal que las MEEF proveyeran la suficiente información para determinar simultáneamente los analitos y fueran registradas en tiempos coherentes. Se definió el rango de excitación como [245 – 300] nm, mientras que el de emisión se fijó como [360 – 475] nm teniendo en cuenta la región de mayor intensidad de señal y selectividad para los analitos. Debido a la baja cantidad de sensores en cada espectro de emisión (24) y la distancia entre sensores de emisión consecutivos (5 nm), los espectros de emisión tomados de una MEEF son más ruidosos que los correspondientes espectros de excitación (111 sensores separados por 0,5 nm).

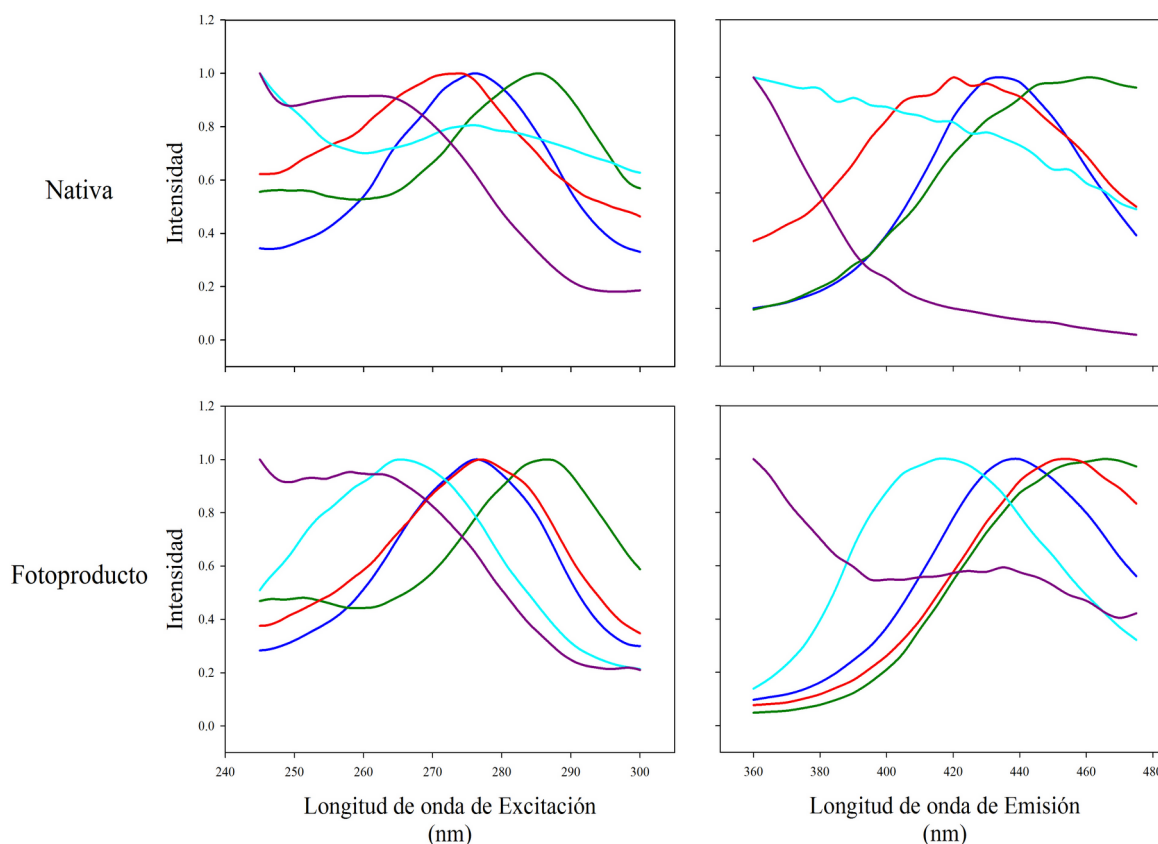


Figura 14: Espectros normalizados de excitación y emisión de los analitos, obtenidos desde una MEEF. Azul: danofloxacina. Verde: ofloxacina. Rojo: sarafloxacina. Celeste: enoxacina. Violeta: naproxeno.

3.2. ANÁLISIS DE VALIDACIÓN

Se realizó un análisis de validación en soluciones de los cinco analitos en estudio: danofloxacina, ofloxacina, sarafloxacina, enoxacina y naproxeno. Para lograr la cuantificación simultánea de estos analitos se realizó una calibración de segundo orden. En la **Figura 15** se presentan las superficies de contorno pertenecientes a las dos MEEFs obtenidas a partir de la misma muestra de validación, correspondiendo una a las especies nativas y la otra a los FP, y en la **Figura 16** se representan los gráficos en tres dimensiones de estas mismas dos MEEFs, pudiéndose observar la mayor intensidad fluorescente de los FP.

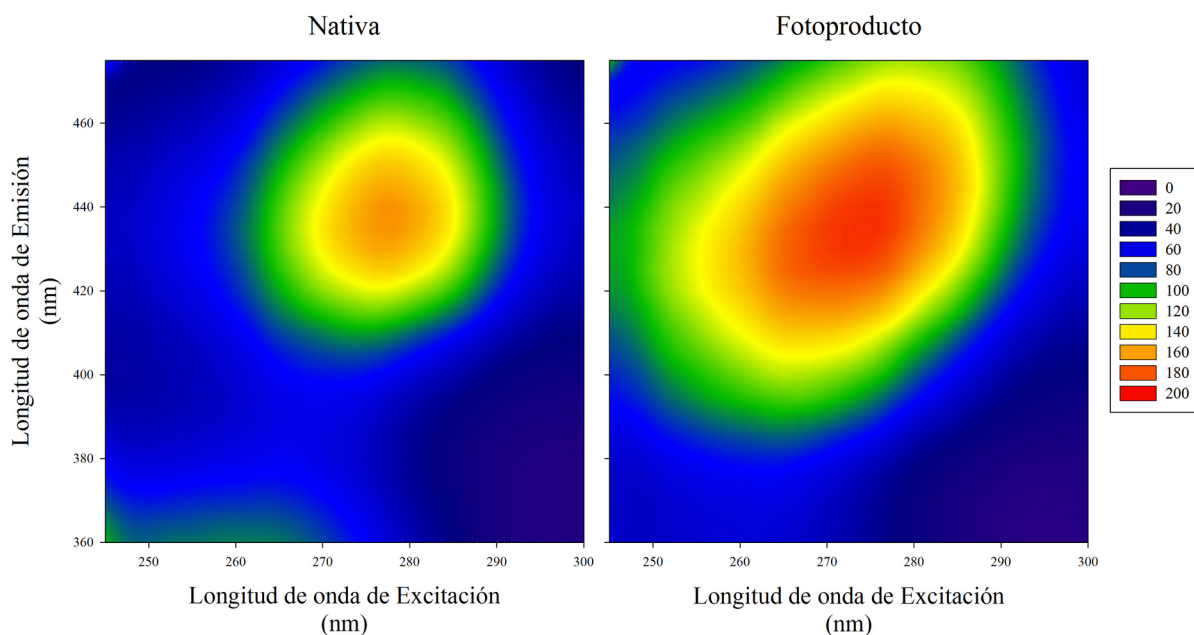


Figura 15: Superficies de contorno de dos MEEFs correspondientes a una muestra de validación.

Los datos de fluorescencia y de PIF obtenidos para este conjunto de muestras fueron analizados por separado utilizando PARAFAC y fusionados, usando MCR-ALS. La capacidad predictiva de estos modelos se comparó a través del análisis de muestras de validación.

Tomando en cuenta la intensidad de fluorescencia de los analitos (tanto en su forma nativa como en FP), se emplearon los siguientes rangos de concentración en la etapa de calibración: Danofloxacina: $[0 - 20] \mu\text{g L}^{-1}$; ofloxacina: $[0 - 100] \mu\text{g L}^{-1}$; sarafloxacina: $[0 - 100] \mu\text{g L}^{-1}$; enoxacina: $[0 - 40] \mu\text{g L}^{-1}$ y naproxeno: $[0 - 40] \mu\text{g L}^{-1}$.

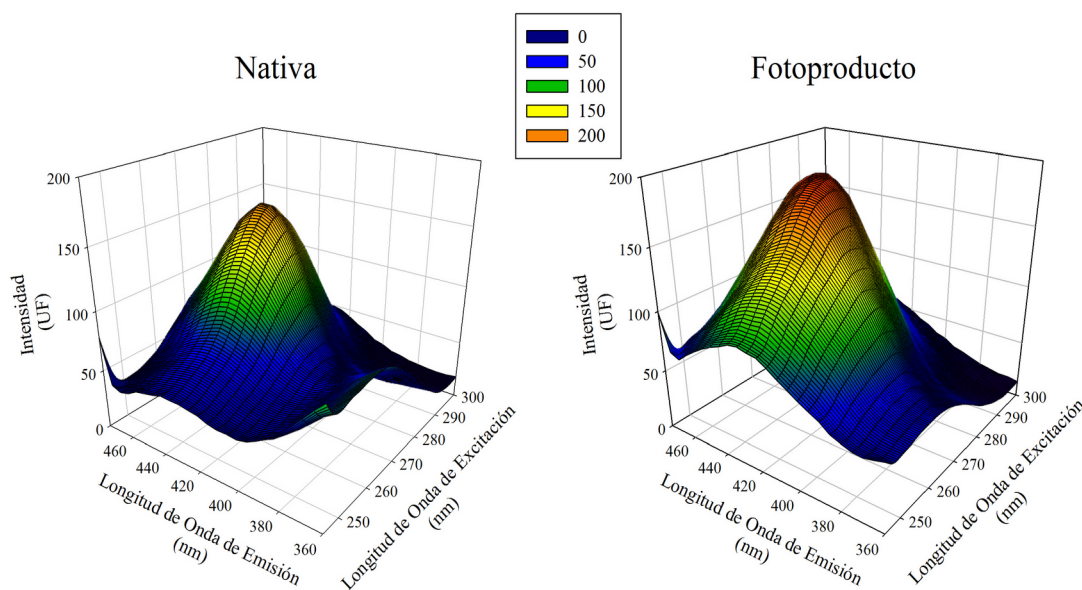


Figura 16: Gráficos en tres dimensiones de dos MEEFs obtenidas a partir de una misma muestra de validación.

Tanto en el caso del análisis de las MEEFs de validación por MEEF-MEEFP-MCR-ALS como en el de MEEFP-PARAFAC, se llegó a los mejores resultados utilizando cinco componentes para el modelado de los datos, es decir, un componente por cada analito. Sin embargo, en el caso del análisis por MEEF-PARAFAC se arribó a los mejores resultados empleando sólo cuatro componentes para el modelado de los datos, esto se debe a la baja intensidad de fluorescencia que presenta la forma nativa de la enoxacina.

En la **Tabla 6** presentan las concentraciones nominales y predichas mediante los tres métodos empleados para las muestras de validación. La enoxacina no se determinó por fluorescencia nativa debido a su baja intensidad de fluorescencia.

En la **Figura 17** se ilustran las curvas de concentración predicha en función de la concentración nominal para los tres métodos de análisis de datos y, además, se presentan las respectivas pruebas de la región elíptica de confianza conjunta (EJCR).³⁸ Estas pruebas consisten en graficar la región elíptica de confianza conjunta (al 95% de confianza) entre la pendiente y la ordenada al origen obtenidas en las regresiones nominal vs predicho, y comprobar si el punto ideal (pendiente=1 y ordenada al origen=0) queda incluido dentro de dicha región. Se concluye que un método analítico es exacto si dicho punto se encuentra

dentro de la elipse. Por otro lado, el tamaño de la elipse depende del desvío estándar de la regresión, por lo cual da una idea de la precisión del método analítico que se evalúa.

	V1	V2	V3	V4	V5	V6	V7	V8	V9	V10
Danofloxacin										
Nominal	16,4	18,0	2,4	18,4	12,8	2,0	5,6	10,8	16,0	5,2
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	15,0	15,7	2,5	19,0	13,7	2,3	5,6	11,3	16,3	6,7
MEEF-PARAFAC	15,1	15,2	2,4	14,4	15,7	3,2	10,3	12,2	21,7	7,5
MEEFP-PARAFAC	17,3	14,0	3,0	27,9	15,4	0,0	8,3	6,1	19,5	2,0
Ofloxacin										
Nominal	96,0	62,4	16,0	96,8	24,8	48,8	80,0	14,4	95,2	34,4
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	89,8	61,3	15,9	103,8	25,6	49,8	93,4	13,7	99,1	41,9
MEEF-PARAFAC	88,0	52,3	19,1	72,9	33,6	58,9	104,9	15,5	117,4	43,9
MEEFP-PARAFAC	102,7	64,2	15,1	82,2	31,0	46,9	90,7	17,3	120,9	49,0
Sarafloxacin										
Nominal	21,0	27,0	40,0	96,0	33,0	12,0	43,0	47,0	84,0	75,0
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	20,8	28,2	37,5	94,6	54,8	12,5	54,8	44,0	84,2	67,3
MEEF-PARAFAC	22,1	46,0	25,6	117,9	57,2	7,1	66,6	55,4	105,7	64,6
MEEFP-PARAFAC	57,3	42,6	21,3	74,2	40,6	15,7	36,1	28,0	89,9	46,8
Enoxacin										
Nominal	27,2	38,4	34,4	15,2	36,0	7,2	20,8	9,6	32,0	6,4
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	27,7	32,5	36,5	15,2	37,2	6,4	20,4	15,7	28,2	12,5
MEEF-PARAFAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MEEFP-PARAFAC	26,8	33,2	28,5	12,3	30,2	6,1	16,8	9,2	31,7	7,2
Naproxeno										
Nominal	23,0	25,0	18,0	13,0	32,0	38,0	36,0	8,0	28,0	6,0
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	23,7	25,6	18,6	15,2	30,8	37,2	39,4	7,3	34,7	8,8
MEEF-PARAFAC	18,9	25,1	15,8	11,0	35,3	39,6	37,8	5,1	32,7	3,7
MEEFP-PARAFAC	23,3	25,9	18,9	10,7	34,1	37,2	34,0	3,7	34,3	2,1

Tabla 6: concentraciones nominales y predichas ($\mu\text{g L}^{-1}$) por los tres métodos de fluorescencia tratados para las muestras de validación

En la **Figura 17** se puede observar que el punto ideal en la prueba EJCRC se encuentra dentro de la región de confianza para los tres modelos empleados, esto implica que los tres modelos producen predicciones apropiadas con respecto a la exactitud. No obstante, los tamaños de estas elipses muestran que el método de fusión de datos es más preciso que los restantes.

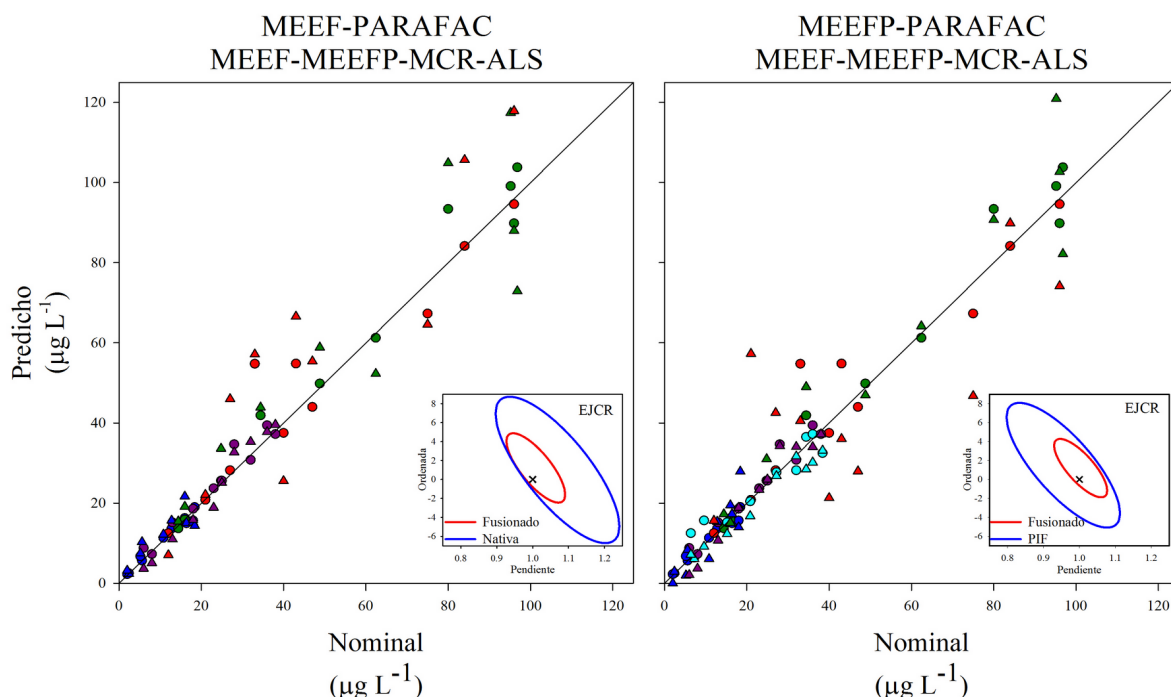


Figura 17: Curvas de concentración predicha en función de concentración nominal y pruebas EJCR para las muestras de validación analizadas por los tres métodos propuestos. Los círculos corresponden a valores predichos por análisis de los datos fusionados y los triángulos corresponden a valores predichos por análisis de los datos por separado. Las figuras azules corresponden a la danofloxacina, las verdes a la ofloxacina, las rojas a la sarafloxacina, las celestes a la enoxacina y las violetas al naproxeno.

Tanto PARAFAC como MCR-ALS permiten la obtención de los perfiles modelados de los componentes empleados en el ajuste de los datos al modelo. En la **Figura 18** se representan los espectros experimentales y modelados por PARAFAC y MCR-ALS de los analitos en su forma nativa, mientras que en la **Figura 19** se ilustran los correspondientes a las especies FP.

Como se mencionó anteriormente, no se asignó un componente a la enoxacina en el modelado por MEEF-PARAFAC. Consecuentemente, no se obtuvo un perfil modelado por PARAFAC para la forma nativa de la enoxacina, sin embargo sí se obtuvo un espectro modelado por MCR-ALS para esta especie, ya que la fusión de datos y la elevada intensidad de PIF de la enoxacina llevan a que se requieran al menos cinco componentes para un modelado correcto de los datos. Con motivo de facilitar la comparación entre los distintos gráficos, no se representan el espectro experimental y el modelado por MCR-ALS de la enoxacina en la **Figura 18**.

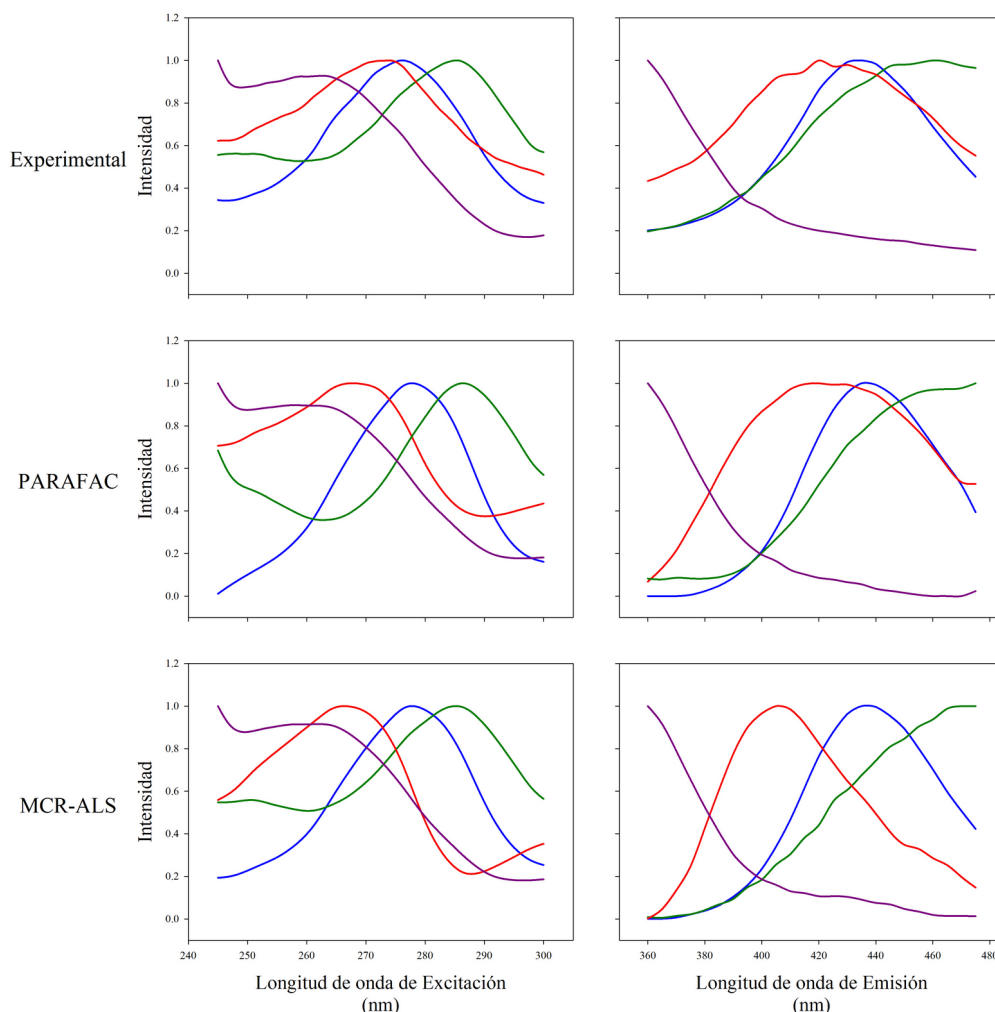


Figura 18: Espectros normalizados modelados y experimentales correspondientes a las especies nativas. Azul: danofloxacina. Verde: ofloxacina. Rojo: sarafloxacina. Violeta: naproxeno.

Como se mencionó anteriormente (*Sección 3.1*), debido a las condiciones experimentales empleadas en este trabajo, los espectros de emisión son más ruidosos que los de excitación. Además, como estimados iniciales en MCR-ALS se utilizaron espectros de excitación de los analitos, es decir que no se otorgó al algoritmo ningún tipo de información inicial respecto a los espectros de emisión de los analitos, lo cual contribuye a que el modelado por MCR de los espectros de emisión sea más dificultoso que el de los espectros de excitación.

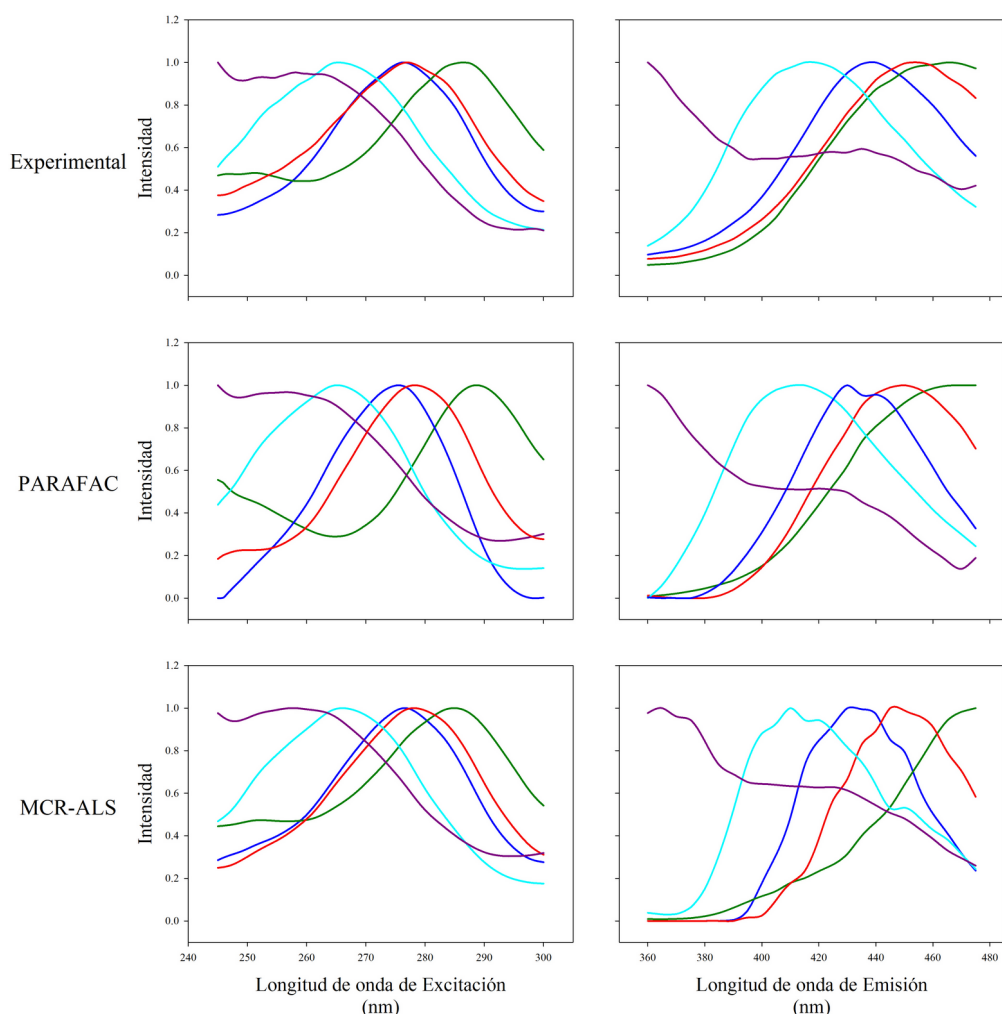


Figura 19: Espectros normalizados modelados y experimentales correspondientes a especies FP. Azul: danofloxacin. Verde: ofloxacin. Rojo: sarafloxacin. Celeste: enoxacin. Violeta: naproxeno.

PARAFAC es un algoritmo utilizado para el modelado de datos trilineales (*Sección 1.6*), como consecuencia el algoritmo devuelve espectros únicos para ambos modos instrumentales. Sin embargo, MCR-ALS, al poder ser utilizado tanto para datos trilineales como no trilineales, devuelve para cada componente tantos sub-perfiles del modo aumentado como muestras se hayan incluido en la matriz aumentada. Al tratarse de datos trilineales, los perfiles únicos del modo aumentado (modo de emisión) de cada analito se pudieron obtener realizando el promedio de los correspondientes sub-perfiles.

Existen dos parámetros regularmente utilizados para obtener una medida cuantitativa del grado de concordancia entre los valores nominales y predichos, estos son el error cuadrático

medio en la predicción, o RMSEP, y el error relativo de predicción, o REP.¹⁵ Estos parámetros se calculan de la siguiente manera:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{t=1}^T (\hat{y}_t - y_t)^2}{T}} \quad \text{Ec. 9}$$

Donde \hat{y}_t y y_t son los valores de concentración predicho y nominal, respectivamente, para un analito en la t-ésima muestra de *test* y T es el número total de muestras de *test*.

$$REP \% = 100 \frac{RMSEP}{\overline{y}_{cal}} \quad \text{Ec. 10}$$

Donde \overline{y}_{cal} es la concentración media de la curva de calibración del analito en cuestión.

En la **Tabla 7** se presenta los valores de REP para la cuantificación de los distintos analitos mediante los diferentes métodos tratados, observándose nuevamente que el método fusionado es significativamente más exacto que los otros dos métodos estudiados. Como se indicó anteriormente, la enoxacina no se determinó por análisis de MEEF-PARAFAC. Finalmente, cabe destacar que una comparación de otras cifras de mérito (LOD, LOQ, sensibilidad), si bien pertinente, no fue posible, por un lado porque de acuerdo al funcionamiento del método fusionado, no es aplicable la expresión actualmente aceptada de estos parámetros para MCR-ALS³⁹, y por otro lado, porque la validez de dichas expresiones en sistemas de alto grado de superposición espectral está actualmente siendo cuestionada.^{40,41}

Muestras de Validación	
	REP(%)
	Danofloxacina
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	8,1
MEEF-PARAFAC	24
MEEFP-PARAFAC	32
	Ofloxacina
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	10
MEEF-PARAFAC	26
MEEFP-PARAFAC	20
	Sarafloxacina
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	15
MEEF-PARAFAC	31
MEEFP-PARAFAC	35
	Enoxacina
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	15
MEEF-PARAFAC	-
MEEFP-PARAFAC	15
	Naproxeno
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	12
MEEF-PARAFAC	12
MEEFP-PARAFAC	13

Tabla 7: Valores de REP(%) correspondientes a las muestras de validación.

3.3. MUESTRAS REALES

3.3.1. ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA

Los métodos fluorescentes tratados fueron aplicados a la determinación de los analitos en muestras acuosas de origen ambiental. En la *Figura 20* se presentan las superficies de contorno obtenidas a partir de MEEFs correspondientes a una muestra de validación y a una real. En la *Figura 21* se muestran los gráficos tridimensionales correspondientes a estas

mismas muestras. En la muestra real se puede observar la presencia de potenciales señales interferentes en regiones de los espectros en las que se encuentran los máximos de intensidad de los analitos. La presencia de sustancias no tenidas en cuenta en la calibración se observó en todas las muestras reales. A pesar de esto, la cuantificación de los analitos fue posible gracias al uso de calibraciones de segundo orden.

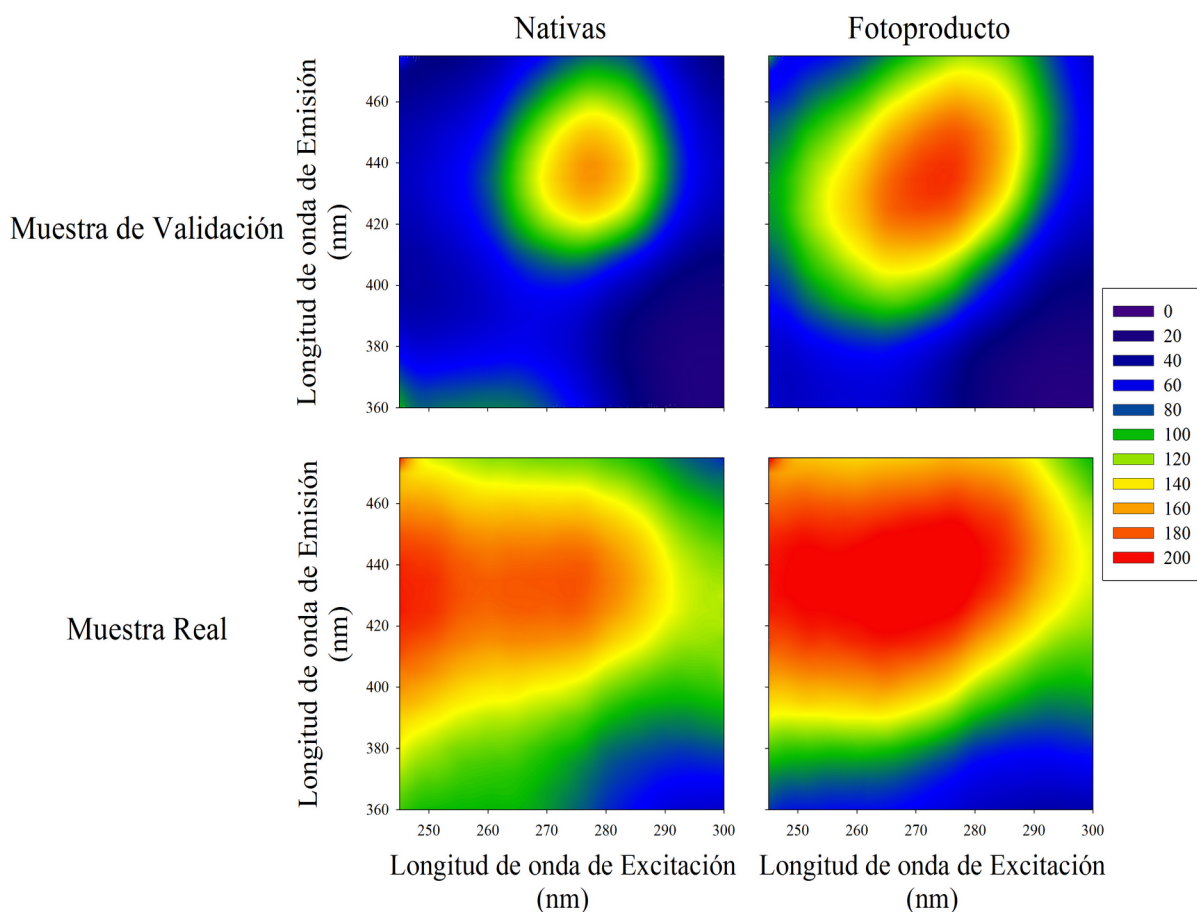


Figura 20: Superficies de contorno de MEEFs pertenecientes a una muestra de validación y a una muestra real.

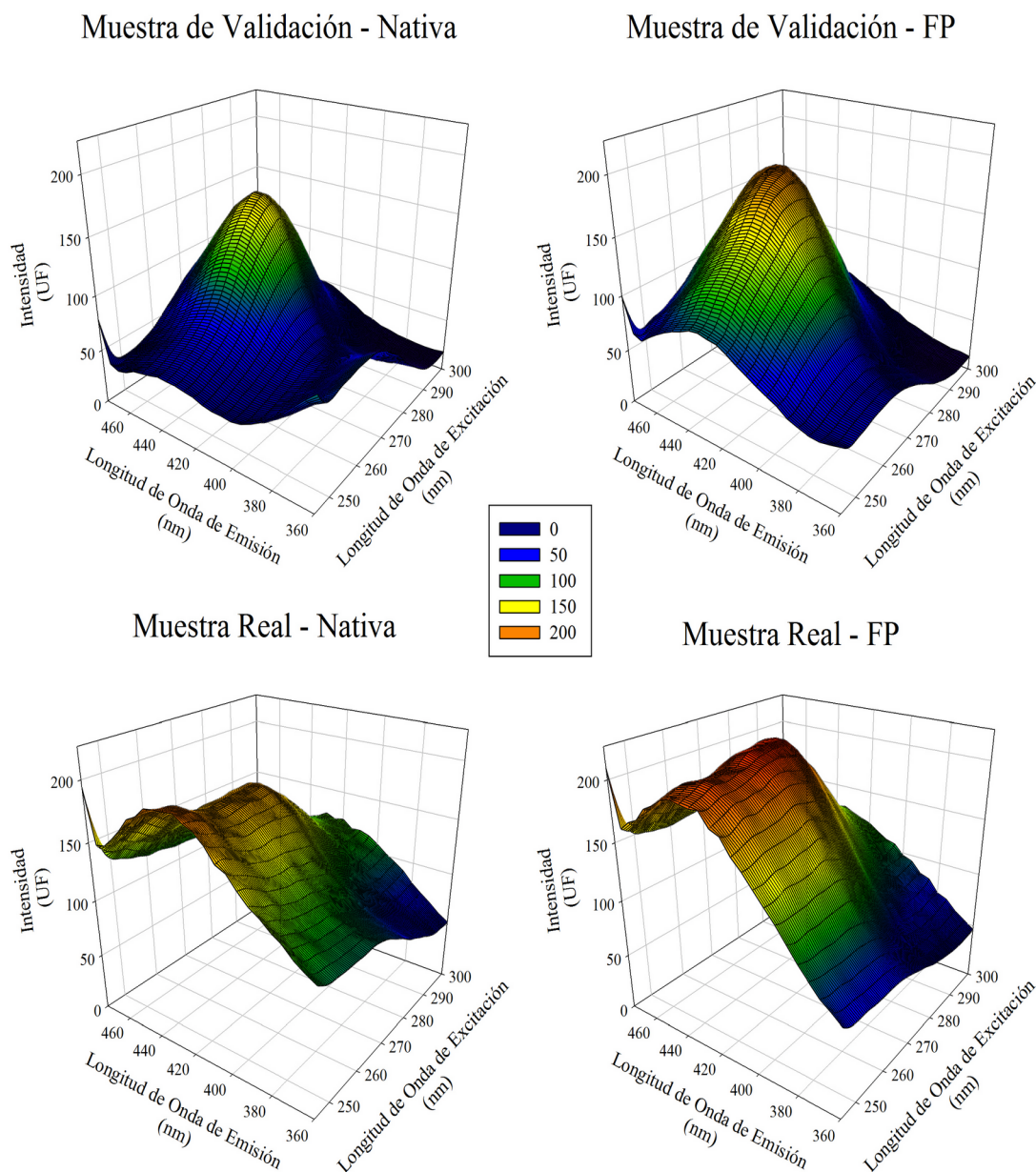


Figura 21: Comparación entre gráficos tridimensionales de MEEFs obtenidos a partir de una muestra de validación y una muestra real.

En los modelados de las muestras reales fue necesario emplear un componente más que en los correspondientes modelados de las muestra de validación. Esto quiere decir que tanto en el análisis por MEEFP-PARAFAC como por MEEF-MEEFP-MCR-ALS, se llegó a los mejores resultados utilizando seis componentes para el modelado de los datos, mientras que para el análisis por MEEF-PARAFAC se utilizaron cinco componentes. Nuevamente, el uso de una

componente de menos en el caso de las especies nativas se debe a la baja intensidad de fluorescencia de la forma nativa de la enoxacina. El uso de un componente extra respecto al caso de las muestras de validación se debe a la presencia de compuestos de la matriz compleja de las muestras reales.

Como se mencionó anteriormente, en el análisis de MCR-ALS se emplearon los verdaderos espectros como estimaciones iniciales para los analitos, mientras que para el interferente se obtuvieron los estimados iniciales por el algoritmo SIMPLISMA. En cuanto a las restricciones, se aplicaron las de no negatividad (en ambos modos instrumentales), de correspondencia de especies, trilinealidad y, a diferencia de las muestras de validación, la restricción de proporcionalidad de *scores* se empleó para danofloxacin, ofloxacin, sarafloxacin y naproxeno, pero no para enoxacina ni para el interferente. Para esta FQ no fue posible obtener resultados satisfactorios al aplicar la proporcionalidad de *scores* probablemente debido a la presencia de sustancias interferentes, ya que sí se lograron buenos resultados para este analito en las muestras de validación. Entonces, en la cuantificación de la enoxacina por MCR-ALS se emplearon los *scores* correspondientes a la especie FP para construir la curva de calibración pseudo-univariada. Por otro lado, aunque el interferente se modeló como un solo componente, esto no quiere decir que la interferencia sea causada por un único constituyente químico, por lo cual los perfiles de las muestras nativas no son necesariamente proporcionales a los de las muestras FP. Consecuentemente no tiene sentido físico la aplicación de la restricción de proporcionalidad de *scores* a los interferentes. Además, se desconoce si las condiciones en que se desarrollaron las fotorreacciones podrían causar una reacción completa de las especies no calibradas.

3.3.2. ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA EFICACIA

Las muestras reales fueron también analizadas por un método de referencia, HPLC-UVD. En este método los analitos fueron cuantificados utilizando una calibración univariada.

En la **Figura 22** se presenta el cromatograma correspondiente a una muestra real. Se puede observar que se logró la resolución de las bandas correspondientes a los analitos. Además, se evidencia la presencia de otros picos cromatográficos correspondientes a compuestos propios de las muestras complejas analizadas.

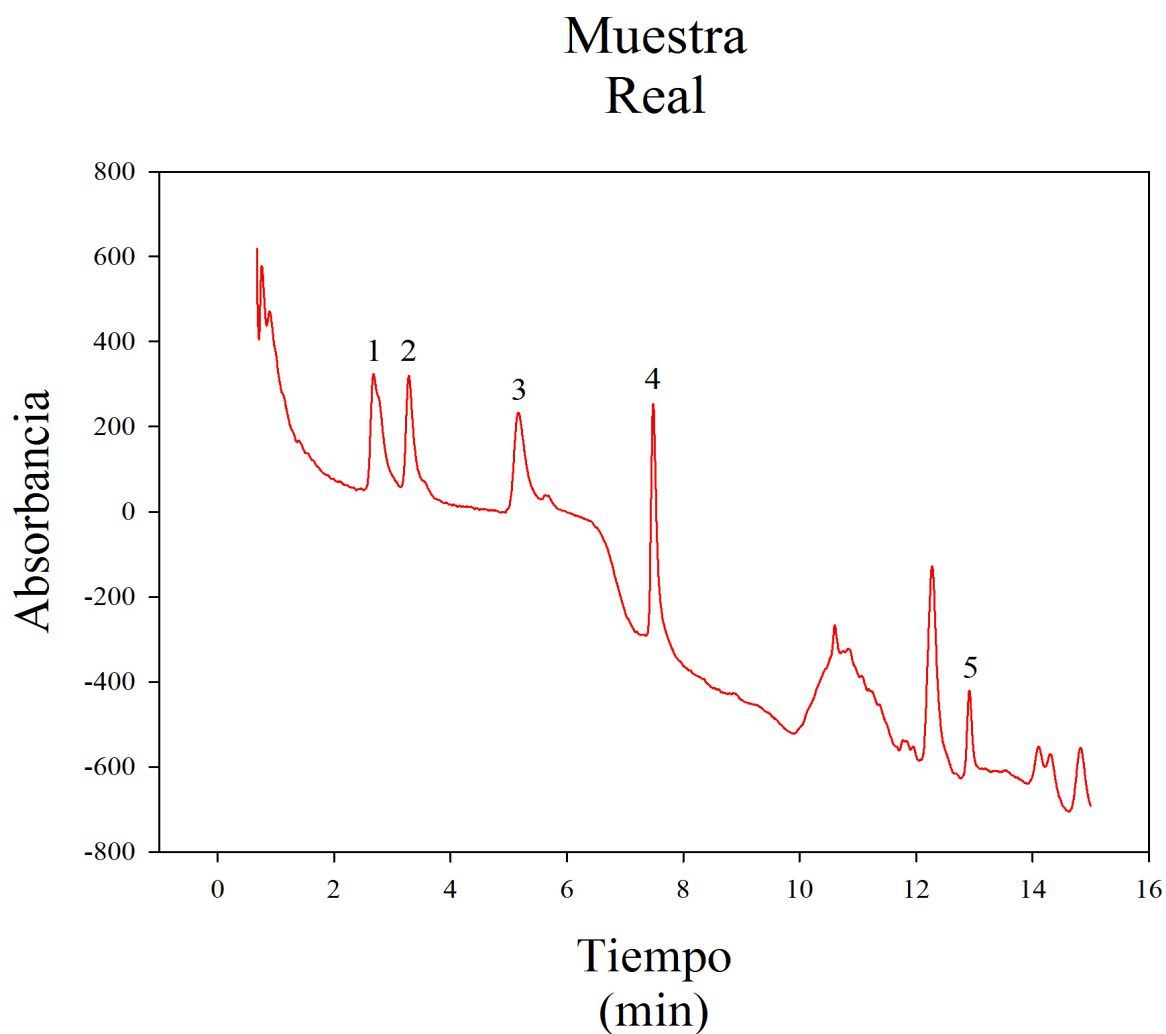


Figura 22: Cromatograma de una muestra real. 1: enoxacina. 2: ofloxacina. 3: danofloxacina. 4: sarafloxacina. 5: naproxeno.

Una vez realizadas las corridas cromatográficas para las muestras de calibración, se construyeron las respectivas curvas de calibración univariada para todos los analitos y se calcularon las correspondientes cifras de mérito, las cuales se presentan en la **Tabla 8**.

	γ	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Danofloxacina	0,496	6,7	16,7
Ofloxacina	0,428	7,4	18,3
Sarafloxacina	0,271	11,6	28,9
Enoxacina	0,468	7,1	17,6
Naproxeno	0,151	21,3	52,8

Tabla 8: Cifras de mérito del método de referencia. γ : Sensibilidad analítica; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

3.3.3. RESULTADOS

En **Tabla 9** la se muestran las concentraciones predichas para los analitos, usando los tres métodos de espectroscopía de fluorescencia y el de referencia.

Los resultados obtenidos por los métodos de espectroscopía de fluorescencia se compararon estadísticamente contra aquellos conseguidos por el método de referencia, usando una prueba T de Student de muestras apareadas. En todos los casos los valores para la T calculada fueron menores a la T crítica (3,18 para una significancia de 95%), lo cual indica que no hay una diferencia significativa entre los valores de referencia y los predichos por los métodos de fluorescencia propuestos. A su vez verifica que los resultados obtenidos no fueron sesgados.

En la **Figura 23** se presentan los perfiles de excitación de fluorescencia nativa y de fotoproducto recuperados por los algoritmos para una de las muestras reales. Al igual que en el caso de las muestras de validación, no se incluyó a la enoxacina en el método MEEF-PARAFAC, debido a esto no se representan el espectro experimental y el modelado por MEEF-MEEFP-MCR-ALS de la enoxacina.

	R1	R2	R3	R4
	Danofloxacin			
HPLC	33,4	28,8	21,8	18,0
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	31,4	30,8	12,8	11,1
MEEF-PARAFAC	31,0	21,1	22,9	8,4
MEEFP-PARAFAC	33,8	32,3	6,2	7,0
	Ofloxacin			
HPLC	101,0	123,0	70,2	33,7
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	65,5	144,6	91,9	37,5
MEEF-PARAFAC	212,3	203,5	76,6	53,9
MEEFP-PARAFAC	128,8	70,2	47,3	0,0
	Sarafloxacin			
HPLC	67,1	114,2	84,7	55,0
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	95,0	88,2	84,8	46,3
MEEF-PARAFAC	124,7	173,8	42,2	31,2
MEEFP-PARAFAC	116,5	119,5	62,9	27,5
	Enoxacin			
HPLC	41,1	41,0	77,2	63,4
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	32,7	38,5	86,3	57,4
MEEF-PARAFAC	-	-	-	-
MEEFP-PARAFAC	71,9	53,8	56,3	39,6
	Naproxeno			
HPLC	34,3	39,0	67,6	32,7
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	45,3	47,2	69,3	36,7
MEEF-PARAFAC	92,8	94,6	63,6	33,4
MEEFP-PARAFAC	149,6	27,5	46,2	13,2

Tabla 9: Concentraciones predichas de los analitos ($\mu\text{g L}^{-1}$) en muestras reales.

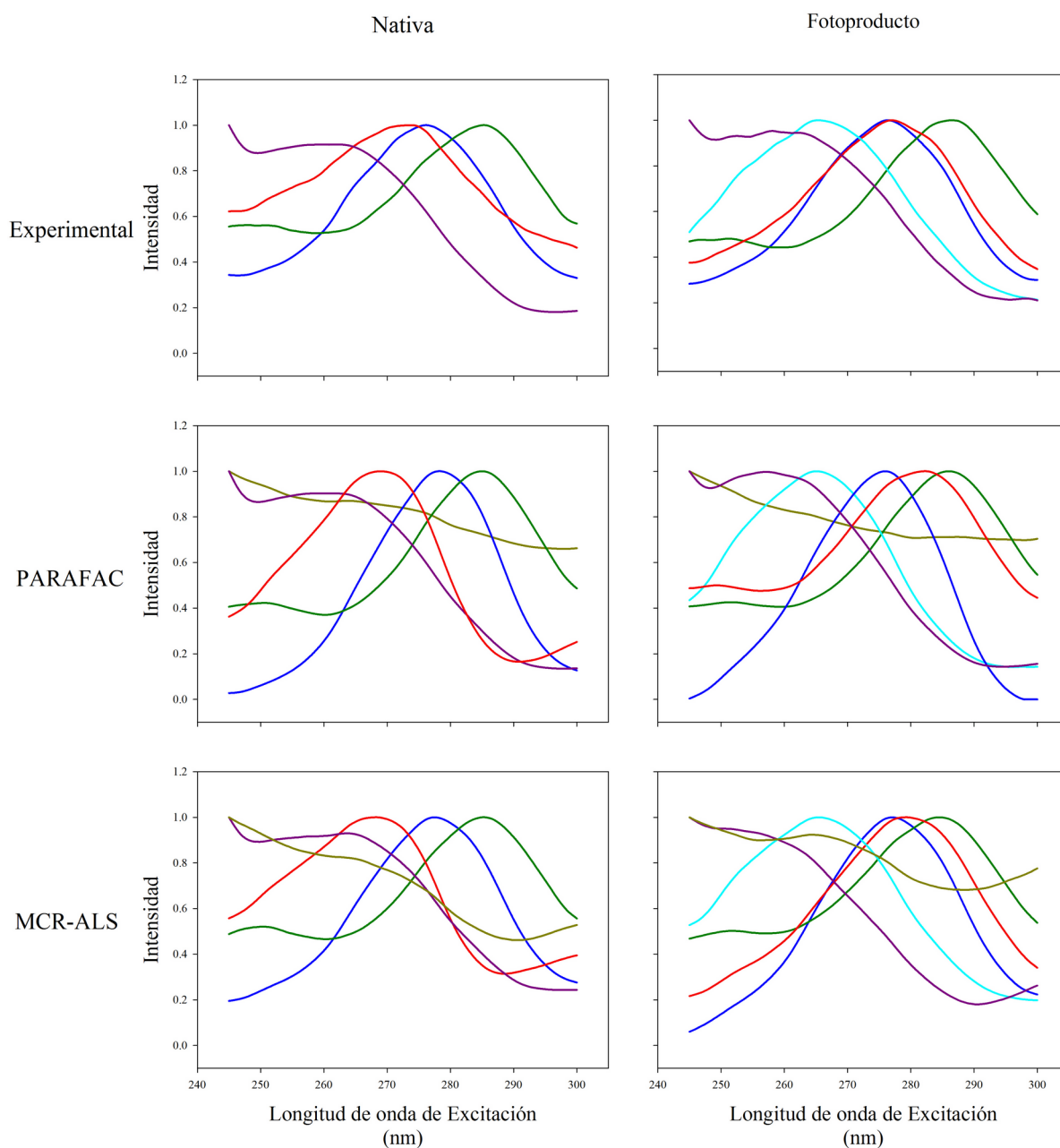


Figura 23: Espectros de excitación normalizados modelados y experimentales correspondientes a los analitos y al interferente. Azul: danofloxacina. Verde: ofloxacina. Rojo: sarafloxacina. Celeste: enoxacina. Violeta: naproxeno. Amarillo: interferente.

En la **Tabla 10** se muestran los valores de REP para los analitos cuantificados en muestras reales mediante los distintos métodos empleados. Se obtuvieron valores de REP significativamente menores para el método de MEEF-MEEFP-MCR-ALS. Esto indica que este modelo tiene una capacidad predictiva superadora respecto a los otros dos métodos fluorescentes ensayados. Además, en el método con fusión de datos se obtuvieron valores de

REP menores o iguales al 20%, esto es, valores aceptables para el caso de matrices complejas. Se observó que los valores de REP para muestras reales son mayores que los correspondientes valores para muestras de validación (*Tabla 7*), como resultado del alto grado de superposición espectral de los componentes de las matrices complejas con los analitos (ver *Figura 20*).

Muestras Reales	
	REP(%)
	Danofloxacin
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	20
MEEF-PARAFAC	22
MEEFP-PARAFAC	34
	Ofloxacin
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	19
MEEF-PARAFAC	56
MEEFP-PARAFAC	29
	Sarafloxacin
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	16
MEEF-PARAFAC	40
MEEFP-PARAFAC	25
	Enoxacin
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	13
MEEF-PARAFAC	-
MEEFP-PARAFAC	44
	Naproxeno
MEEF-MEEFP-MCR-ALS	17
MEEF-PARAFAC	83
MEEFP-PARAFAC	121

Tabla 10: Valores de REP(%) correspondientes a las muestras reales.

4. CONCLUSIONES

Se determinaron simultáneamente cinco contaminantes emergentes de origen farmacéutico (danofloxacina, ofloxacina, sarafloxacina, enoxacina y naproxeno) a nivel de partes por billón mediante el empleo de un método analítico basado en el acoplamiento espectroscopía de fluorescencia molecular y PIF a calibración de segundo orden con fusión de datos.

Se optimizaron las condiciones experimentales para la obtención de las MEEFs y MEEFPs de forma de maximizar la sensibilidad y selectividad de las señales fluorescentes para los analitos estudiados.

A partir de las condiciones experimentales optimizadas, se construyeron y validaron calibraciones de segundo orden empleando PARAFAC (MEEF y MEEFP independientemente). Estos modelos se compararon estadísticamente con el método de MCR-ALS fusionado propuesto, observando una mayor precisión y exactitud en el caso de los datos fusionados.

Los métodos fluorescentes desarrollados se aplicaron al análisis de muestras reales de origen ambiental, observándose resultados satisfactorios para el método fusionado ($REP \leq 20\%$), comprobando así su superior capacidad predictiva respecto de los modelos MEEF-PARAFAC y MEEFP-PARAFAC.

Por último, los resultados obtenidos con el método MEEF-MEEFP-MCR-ALS para las muestras reales se contrastaron con un método de referencia (HPLC-UVD), obteniendo resultados comparables estadísticamente.

5. BIBLIOGRAFÍA

(1) Richardson, S. D.; Ternes, T. A. Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues. *Analytical Chemistry* **2018**, *90* (1), 398–428. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b04577>.

(2) Tollefson, L.; Miller, M. A. Antibiotic Use in Food Animals: Controlling the Human Health Impact. *Journal of AOAC International* **2000**, *83*, 245–254. <https://doi.org/10.1093/jaoac/83.2.245>.

(3) Gigoso, P. G.; Revesado, P. R.; Cadahía, O.; Fente, C. A.; Vazquez, B. I.; Franco, C. M.; Cepeda, A. Determination of Quinolones in Animal Tissues and Eggs by High-Performance Liquid Chromatography with Photodiode-Array Detection. *Journal of Chromatography A* **2000**, *871*, 31–36. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)01048-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)01048-1).

(4) Jiménez-Díaz, I.; Hermo, M. P.; Ballesteros, O.; Zafra-Gómez, A.; Barrón, D.; Barbosa, J.; Navalón, A. Comparison of Three Analytical Methods for the Determination of Quinolones in Pig Muscle Samples. *Chromatographia* **2013**, *76*, 707–713. <https://doi.org/10.1007/s10337-013-2435-5>.

(5) Martins, M. T.; Barreto, F.; Hoff, R. B.; Jank, L.; Arsand, J. B.; Feijó, T. C.; Schapoval, E. E. S. Determination of Quinolones and Fluoroquinolones, Tetracyclines and Sulfonamides in Bovine, Swine and Poultry Liver Using LC-MS/MS. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment* **2015**, *32*, 333–341. <https://doi.org/10.1080/19440049.2015.1007091>.

(6) Wagil, M.; Kumirska, J.; Stolte, S.; Puckowski, A.; Maszkowska, J.; Stepnowski, P.; Białk-Bielińska, A. Development of Sensitive and Reliable LC-MS/MS Methods for the Determination of Three Fluoroquinolones in Water and Fish Tissue Samples and Preliminary Environmental Risk Assessment of Their Presence in Two Rivers in Northern Poland. *Science of the Total Environment* **2014**, *493*, 1006–1013. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.06.082>.

(7) Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz De La Peña, A.; González Gómez, D.; Salinas, F. HPLC Determination of Enoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin with Photoinduced Fluorimetric (PIF) Detection and Multiemission Scanning: Application to Urine

and Serum. *Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences* **2005**, 822, 185–193. <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2005.05.045>.

(8) Espinosa-Mansilla, A.; Muñoz De La Peña, A.; González Gómez, D.; Cañada-Cañada, F. Photoinduced-Fluorescence (PIF) Determination of Fluoroquinolones in Pharmaceuticals and Urine. *Chemia Analytyczna* **2007**, 52, 619–633.

(9) Vázquez, M. M. P.; Vázquez, P. P.; Galera, M. M.; García, M. D. G. Determination of Eight Fluoroquinolones in Groundwater Samples with Ultrasound-Assisted Ionic Liquid Dispersive Liquid–Liquid Microextraction Prior to High-Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection. *Analytica Chimica Acta* **2012**, 748, 20–27. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.08.042>.

(10) Zrnčić, M.; Babić, S.; Mutavdžić Pavlović, D. Determination of Thermodynamic pK_a Values of Pharmaceuticals from Five Different Groups Using Capillary Electrophoresis. *Journal of Separation Science* **2015**, 38 (7), 1232–1239. <https://doi.org/10.1002/jssc.201401057>.

(11) Hernández-Arteseros, J. .; Barbosa, J.; Compañó, R.; Prat, M. . Analysis of Quinolone Residues in Edible Animal Products. *Journal of Chromatography A* **2002**, 945 (1–2), 1–24. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)01505-9](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)01505-9).

(12) Aresta, A.; Palmisano, F.; Zambonin, C. G. Determination of Naproxen in Human Urine by Solid-Phase Microextraction Coupled to Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2005**, 39 (3–4), 643–647. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2005.04.017>.

(13) Tashtoush, B. M.; Al-Taani, B. M. HPLC Determination of Naproxen in Plasma. *Die Pharmazie* **2003**, 58 (9), 614–615.

(14) Arancibia, J. A.; Escandar, G. M. Determination of Naproxen in Pharmaceutical Preparations by Room-Temperature Phosphorescence. A Comparative Study of Several Organized Media. *The Analyst* **2001**, 126 (6), 917–922. <https://doi.org/10.1039/b100252j>.

(15) Olivieri, A. C.; Escandar, G. M. *Practical Three-Way Calibration*; Elsevier: Waltham, USA, 2014. <https://doi.org/10.1016/C2012-0-07419-4>.

(16) Skoog, D. A.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Principles of Instrumental Analysis*; Thomson Brooks/Cole: Belmont, USA, 2007. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

- (17) Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*; W. H. Freeman and Company: New York, USA, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf103070m>.
- (18) López-Malo, D.; Bueso-Bordils, J. I.; Duart, M. J.; Alemán-López, P. A.; Martín-Algarra, R. V.; Antón-Fos, G. M.; Lahuerta-Zamora, L.; Martínez-Calatayud, J. QSPR Studies on the Photoinduced-Fluorescence Behaviour of Pharmaceuticals and Pesticides. *SAR and QSAR in Environmental Research* **2017**, *28*, 609–620. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2017.1358212>.
- (19) Pellegrino Vidal, R. B.; Olivieri, A. C.; Ibanez, G. A.; Escandar, G. M. Online Third-Order Liquid Chromatographic Data with Native and Photoinduced Fluorescence Detection for the Quantitation of Organic Pollutants in Environmental Water. *ACS Omega* **2018**, *3*, 15771–15779. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02439>.
- (20) Lozano, V. A.; Escandar, G. M. Second-Order Advantage with Excitation-Emission Photoinduced Fluorimetry for the Determination of the Antiepileptic Carbamazepine in Environmental Waters. *Analytica Chimica Acta* **2013**, *782*, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2013.04.020>.
- (21) Icardo, M. C.; Calatayud, J. M. Photo-Induced Luminescence. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2008**, *38*, 118–130. <https://doi.org/10.1080/10408340802039609>.
- (22) Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Byudens, L. M. C.; De Jong, S.; Lewi, P. J.; Smeyers-Verbeke, J. *Handbook of Chemometrics and Quantometrics Part A and B*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 1997.
- (23) Bro, R. PARAFAC. Tutorial and Applications. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1997**, *38*, 149–171. [https://doi.org/10.1016/S0169-7439\(97\)00032-4](https://doi.org/10.1016/S0169-7439(97)00032-4).
- (24) Bro, R.; Kiers, H. A. L. A New Efficient Method for Determining the Number of Components in PARAFAC Models. *Journal of Chemometrics* **2003**, *17*, 274–286. <https://doi.org/10.1002/cem.801>.
- (25) Jaumot, J.; Gargallo, R.; De Juan, A.; Tauler, R. A Graphical User-Friendly Interface for MCR-ALS: A New Tool for Multivariate Curve Resolution in MATLAB. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2005**, *76*, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2004.12.007>.
- (26) Tauler, R. Multivariate Curve Resolution Applied to Second Order Data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1995**, *30*, 133–146. [https://doi.org/10.1016/0169-7439\(95\)00047-X](https://doi.org/10.1016/0169-7439(95)00047-X).

- (27) de Juan, A.; Casassas, E.; Tauler, R. Soft Modeling of Analytical Data. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, UK, 2000; pp 9800–9837. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5208>.
- (28) Windig, W.; Stephenson, D. A. Self-Modeling Mixture Analysis of Second-Derivative near-Infrared Spectral Data Using the SIMPLISMA Approach. *Analytical Chemistry* **1992**, *64* (22), 2735–2742. <https://doi.org/10.1021/ac00046a015>.
- (29) Windig, W.; Guilment, J. Interactive Self-Modeling Mixture Analysis. *Analytical Chemistry* **1991**, *63* (14), 1425–1432. <https://doi.org/10.1021/ac00014a016>.
- (30) Tauler, R.; Smilde, A.; Kowalski, B. Selectivity, Local Rank, Three-Way Data Analysis and Ambiguity in Multivariate Curve Resolution. *Journal of Chemometrics* **1995**, *9* (1), 31–58. <https://doi.org/10.1002/cem.1180090105>.
- (31) Tauler, R.; de Juan, A. Multivariate Curve Resolution for Quantitative Analysis. In *Fundamentals and Analytical Applications of Multiway Calibration*; Elsevier: Amsterdam, Netherlands, 2015; pp 247–292. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63527-3.00005-9>.
- (32) Borràs, E.; Ferré, J.; Boqué, R.; Mestres, M.; Aceña, L.; Busto, O. Data Fusion Methodologies for Food and Beverage Authentication and Quality Assessment - A Review. *Analytica Chimica Acta* **2015**, *891*, 1–14. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.04.042>.
- (33) Casale, M.; Oliveri, P.; Casolino, C.; Sinelli, N.; Zunin, P.; Armanino, C.; Forina, M.; Lanteri, S. Characterisation of PDO Olive Oil Chianti Classico by Non-Selective (UV-Visible, NIR and MIR Spectroscopy) and Selective (Fatty Acid Composition) Analytical Techniques. *Analytica Chimica Acta* **2012**, *712*, 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.11.015>.
- (34) Cozzolino, D.; Smyth, H. E.; Lattey, K. A.; Cynkar, W.; Janik, L.; Damberg, R. G.; Francis, I. L.; Gishen, M. Combining Mass Spectrometry Based Electronic Nose, Visible-near Infrared Spectroscopy and Chemometrics to Assess the Sensory Properties of Australian Riesling Wines. *Analytica Chimica Acta* **2006**, *563*, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.008>.
- (35) Martínez Bilesio, A. R.; Batistelli, M.; García-Reiriz, A. G. Fusing Data of Different Orders for Environmental Monitoring. *Analytica Chimica Acta* **2019**, *1085*, 48–60. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.08.005>.

- (36) Peré-Trepat, E.; Tauler, R. Analysis of Environmental Samples by Application of Multivariate Curve Resolution on Fused High-Performance Liquid Chromatography-Diode Array Detection Mass Spectrometry Data. *Journal of Chromatography A* **2006**, *1131*, 85–96. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.07.047>.
- (37) Anzardi, M. B.; Arancibia, J. A.; Olivieri, A. C. Using Chemometric Tools to Investigate the Quality of Three- and Four-Way Liquid Chromatographic Data Obtained with Two Different Fluorescence Detectors and Applied to the Determination of Quinolone Antibiotics in Animal Tissues. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **2020**, *199*, 103972. <https://doi.org/10.1016/j.chemolab.2020.103972>.
- (38) González, A. G.; Herrador, M. A.; Asuero, A. G. Intra-Laboratory Testing of Method Accuracy from Recovery Assays. *Talanta* **1999**, *48* (3), 729–736. [https://doi.org/10.1016/S0039-9140\(98\)00271-9](https://doi.org/10.1016/S0039-9140(98)00271-9).
- (39) Bauza, M. C.; Ibañez, G. A.; Tauler, R.; Olivieri, A. C. Sensitivity Equation for Quantitative Analysis with Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares: Theoretical and Experimental Approach. *Analytical Chemistry* **2012**, *84* (20), 8697–8706. <https://doi.org/10.1021/ac3019284>.
- (40) Pellegrino Vidal, R. B.; Allegrini, F.; Olivieri, A. C. The Effect of Constraints on the Analytical Figures of Merit Achieved by Extended Multivariate Curve Resolution-Alternating Least-Squares. *Analytica Chimica Acta* **2018**, *1003*, 10–15. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.008>.
- (41) Pellegrino Vidal, R. B.; Olivieri, A. C. A New Parameter for Measuring the Prediction Uncertainty Produced by Rotational Ambiguity in Second-Order Calibration with Multivariate Curve Resolution. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (13), 9118–9123. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.0c01395>.