

INDICE

SALUTACION

1. PREAMBULO

1.1. MAESTROS DIRECTOS

1.2. PREDECESOR

1.3. MAESTROS INDIRECTOS

2. ELECCION DEL TEMA

3. EVOLUCION HISTORICA DE LAS TECNICAS ANALITICAS

3.1. ANALISIS CLASICO

3.2. ANALISIS INSTRUMENTAL

3.3. INSTRUMENTACION ANALITICA EN LOS MUSEOS

4. METODOS LUMINISCENTES

4.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

4.2.1. Fundamento

4.2.2. Amortiguación de la fluorescencia (*quenching*)

4.2.3. Factores que afectan a la fluorescencia molecular

4.2.4. La espectrofluorimetría como técnica analítica cuantitativa

4.2.5. Componentes de los equipos instrumentales

4.2.6. Espectros de excitación y emisión

4.2.7. Aplicaciones de la fluorimetría en análisis farmacéutico

4.2.8. Marcadores fluorescentes

4.3. GRUPOS ESPECIALIZADOS

5. SENSORES Y BIOSENSORES BASADOS EN FIBRAS OPTICAS

5.1. INTRODUCCION

5.2. SENSORES OPTICOS

5.3. SENSORES DE FIBRAS OPTICAS

5.3.1. Clasificación de los sensores

5.3.2. Características analíticas

5.3.3. Aplicaciones

5.4. SENSORES FLUORIMETRICOS

5.5. SENSORES FOSFORIMETRICOS

6. BIBLIOGRAFIA

"EL LARGO CAMINO
DE LOS
METODOS LUMINISCENTES
EN
ANALISIS FARMACEUTICO"

*A la memoria de mis padres,
que crearon y conformaron
mi estilo farmacéutico.*

SALUTACION

Excelentísimo Señor Director,
Excelentísimas Señoras y Excelentísimos Señores Académicos,
Señoras y Señores:

El inicio de mi disertación es y debe ser de profundo agradecimiento y admiración hacia la Real Academia de Farmacia y a quienes habéis depositado en mí vuestra confianza al haberme acogido como Miembro de Número de esta noble corporación. Es altísimo el honor que me habéis otorgado y posiblemente sea difícil encontrar palabras para manifestar la satisfacción y responsabilidad que me rodea en estos instantes, donde tienen y han tenido intensa vida académica deslumbrantes científicos españoles y extranjeros.

Deseo significar mi especial gratitud a los profesores que tuvieron la gentileza y amabilidad de ser mis ponentes, avalando con su firma la presentación de mi candidatura a elección como miembro de esta institución, Excmos. Sres. D. Salvador Rivas Martínez, D. Vicente Vilas Sánchez y D. Manuel Ortega Mata. Ellos fueron profesores míos, hoy son amigos y compañeros. D. Manuel es también mi maestro. Ahora comprendo mejor el pensamiento agustiniano al afirmar que la amistad es más dulce que todos los placeres de la vida y que dejando su impronta en el alma, va obrando en ella sin que nos percatemos de su acción. Amigos, en el acuerdo y en el desacuerdo, siempre.

1. PREAMBULO

Generalmente no suelo dar mucho crédito ni peso al azar, ni a la suerte, ni al destino, aunque debo reconocer que, he sido muy afortunado en la vida. Si creyera en los maleficios hoy no estaría dirigiéndome a Uds. Un 18 de octubre de 1990 ingresaba como Académico Correspondiente, esa misma tarde, mi mejor amigo, mi padre, no me pudo acompañar por haber recibido el diagnóstico terrible de su cercano fin. Un 20 de enero de 1994, tras entregar el **Premio "Carlos del Castillo Leiva"** en esta Real Academia y haber sido propuesto como Miembro de Número de esta Institución, fallecía mi madre a las pocas horas.

Desde entonces, he sentido el desfallecimiento muchas veces, pero he sacado el coraje de mi estirpe para dobligar a las circunstancias adversas, adueñándome hoy de un espacio de este vetusto edificio que ellos dejaron vacante, pues entre estas paredes se hicieron farmacéuticos hace años.

En el presente solloza mi corazón. Vuestra comprensión sabrá, estoy seguro, aceptarlo. Deseo dejar constancia de la veneración por mi familia, en especial mis padres y abuelos, que supieron darme, en todo momento, su calor de hogar, educación austera, sentido de responsabilidad, amor al trabajo y formación moral y religiosa, durante mi infancia y juventud.

Quizás, como síntesis, hubiera de destacar en ellos, como en mis maestros, de escuela, bachiller y universidad, la intensidad con que elogiaron los valores de la verdad, la bondad, la belleza y la justicia, como ideales constituyentes de la existencia humana, sabiendo que toda la pasión por la verdad, por el bien y por la belleza es, en última instancia, búsqueda de Dios. Me moldearon al estilo de Castilla. Mi padre permitió que compartiera las tertulias con sus amigos, los poetas Manuel Macho y Josefina Bolinaga y mi madre me presentó a don Ramón Menéndez Pidal, antes de cumplir los quince años.

Tras descubrir la belleza de la Física en el primer curso Selectivo de Ciencias e ingresar, en segundo de Farmacia, como Alumno Interno de **Técnica Física** con el Dr. Portillo, de cuyo laboratorio no he salido en más de treinta años ininterrumpidos, tuve la fortuna de conocer a don Manuel Ortega. De su mano aprendí a saber estar en el laboratorio y conocer todas las técnicas entonces disponibles, a trabajar y leer allí y a estudiar luego en casa; así pues, mi fogueo fue precoz. Acabar la carrera, comenzar la tesis doctoral e incorporarme en la docencia teórica y práctica de la Física, Análisis Instrumental y Técnicas Instrumentales, fue todo uno. Dos años después, me casé en vacaciones de Navidad, para no abandonar las tareas docentes encomendadas, pues no había sustitutos. A don Manuel le debo sus enseñanzas técnicas, pero asimismo el amor al trabajo bien hecho, la constancia y el saber superar fracasos y sinsabores, sazonados de cariño a la Universidad y a la Farmacia.

1.1. MAESTROS DIRECTOS

Deseo recordar especialmente a doña Celerina Blanco, mi primera maestra de párvulos en Poza, don Gabriel Leret y don Angel Sedano, profesores de Matemáticas y Ciencias Naturales de bachiller en Madrid; de la Facultad de Ciencias Geológicas a los profesores Hernández Pacheco y Alférez Delgado y de mi Facultad de Farmacia a don Cándido Torres, don Salvador Rivas Goday y don Manuel Ortega, que con sus magníficas enseñanzas contribuyeron a engendrar en mí, el amor por el estudio, la naturaleza, la farmacia y en definitiva a forjar mi espíritu universitario, que espero me acompañe toda la vida.

1.2. PREDECESOR

"La muerte es un catafalco que llena de luto la estancia del alma", escribió Jorge Manrique.

El sillón vacante que voy a ocupar lo dejó vacío don Manuel Jáuregui González. Nació en Moral de Calatrava (Ciudad Real) el 24 de noviembre de 1901. Fue doctor en Farmacia y licenciado en Medicina y Cirugía, siendo nombrado Miembro de la Real Academia de Farmacia el 21 de enero de 1930, ocupando inicialmente la Presidencia de la Sección de Ciencias Biológicas y posteriormente la Tesorería.

Su vida académica fue amplia ya que ostentó la Vicepresidencia de la Real Academia de Doctores y tras ser premiado con la Medalla de Oro, la Real Academia de Medicina le distinguió con el título de Académico Correspondiente. Idénticos nombramientos también le confirieron las Academias de Farmacia de Brasil y Cuba.

Fue becario en el College of Pharmacy and Science de Filadelfia y pensionado del Bellevue Hospital and Medical College de Nueva York. Asimismo disfrutó de una estancia en Toronto con el Prof. Best, codescubridor de la insulina.

El Colegio de Alava, así como el Consejo General de Colegios Farmacéuticos le otorgaron los máximos honores y distinciones.

Le cupo el privilegio de organizar la primera Conferencia en España de la Industria Farmacéutica, así como ostentar la representación de este grupo en la Federación Internacional Farmacéutica (F.I.P.), no en vano fue el fundador y director de Laboratorios Españoles de Farmacología (LEFA), cuya magnífica biblioteca científica, cedió posteriormente a esta Real Academia de Farmacia. A lo largo de medio siglo fué representante de la Industria Farmacéutica

en la Comisión de Contingente y Compras del Ministerio de Industria y Comercio. También destacó como miembro de la Comisión Asesora Científica del Instituto Nacional de Previsión.

Su densa vida no estuvo alejada de la Universidad de Madrid, ya que participó como docente en cursos de doctorado de nuestra Facultad de Farmacia.

Entre las numerosas distinciones que atesoró deben destacarse la Encomienda con placa de la Orden Civil de Sanidad y la Medalla Carracido de Plata. La muerte le arrebató en 1992.

1.3. MAESTROS INDIRECTOS

Es preciso evocar ahora a aquellos maestros indirectos que han contribuido a mi formación científica, en la que también incluiré la humanística y profesional. Obdulio Fernández, catedrático de **Análisis de Medicamentos Orgánicos** y Decano de nuestra Facultad, amigo de mi abuelo Benito, y maestro de mi padre, a quien conocí fugazmente, sin embargo luego me adentré en su vida y obra, de la cual he escrito y hablado profusamente. Guillermo Folch, que sin percatarse me marcó pautas y me abrió los ojos para conocer la grandeza de nuestra universidad y de su disciplina. En Montpellier, Lucette Bardet, primera mujer doctora *honoris causa* de nuestra Facultad, que irradia ciencia, conciencia y bondad, con ella tengo una especial comunión. Anthony F. Fell, magnífico científico de la Universidad de Bradford, que ha sabido poner la espectroscopía y cromatografía modernas al servicio del análisis farmacéutico, estirpe que pregonaba con orgullo por los cuatro confines del mundo. Kazuhiro Imai, sabio farmacéutico, catedrático de **Química Analítica** de la Universidad de Tokio, descubridor de un sinnúmero de marcadores fluorescentes, ilustre bioquímico y farmacólogo de reconocido prestigio mundial. En el ámbito científico internacional, hablar de espectroscopías de luminiscencia es sinónimo de Willy R.G. Baeyens, también catedrático de **Análisis y Control de Medicamentos** de la Universidad de Gante; farmacéutico, flamenco y amigo donde los haya. No puedo olvidar las enseñanzas fluorimétricas, que a comienzos de la pasada década me dió, y continúa haciéndolo el Prof. Miller, gran químico analítico de la Universidad Tecnológica de Loughborough. Mucha fotofísica y química de ciclodextrinas hemos aprendido, mis colaboradores y yo, con Dan A. Lerner, profesor de la Escuela Nacional Superior de Química de Montpellier.

El legado que he recibido ha sido inmenso, así como la responsabilidad de tratar de mantenerme a su nivel intelectual; lo procuraré por todos los medios, para ello, estoy convencido que podré contar con todos vosotros, Sres. Académicos.

Quiero también demostrar públicamente mi agradecimiento a todos los compañeros, discípulos, colaboradores, paisanos, amigos y familiares que me honráis, hoy y aquí, con vuestra presencia.

A mi mujer y a mis hijos, os sigo pidiendo que entendáis mi trabajo. A todos quienes lo comparten conmigo, gracias.

2. ELECCION DEL TEMA

El discurso que voy a leer sobre **El largo camino de los métodos luminiscentes en análisis farmacéutico**, lo he dividido en varios apartados; para no cansaros me referiré en cada uno de ellos a los aspectos más significativos o amenos. En el discurso impreso se podrá hallar, por quien sienta más interés por el tema, una exposición más profunda y sistemática.

Si bien en estas circunstancias suele ser recomendable preparar alguno de carácter general, abandonando los excesivamente especializados o los de directa proyección personal del conferenciante, considero que se debe también procurar hacer una disertación que pueda atraer la atención de cuantos se congregan en este acto. En cualquier caso creo que es difícil separar esas tres vertientes, así que decidí de alguna manera tratar de yuxtaponerlas en un equilibrio lo más armónico posible. Tangencialmente es preciso que se llamen todas.

La elección la he basado en la creciente importancia de disponer de métodos de análisis cada día más sensibles, selectivos, precisos y exactos a la vez que sencillos y económicos, partiendo de la transcendencia de conocer o reconocer, en cualquier campo o faceta de la ciencia (y por tanto de la propia vida) la presencia, cualitativa y cuantitativa, de las distintas especies químicas que lo constituyen.

¿ Quién nos hubiera podido decir hace unos pocos años que se hacía necesario introducir nuevos prefijos, que indiquen por debajo del femto y el atto? Ya están surgiendo, para corroborarlo, nuevas medidas de magnitudes bajísimas. La evolución de la Química, y por ende de la Farmacia, ha discurrido pareja a la del Análisis Químico. Fundamentalmente a partir del Siglo de las Luces, esta realidad fue más patente y no ha cesado hasta la actualidad. El análisis, siempre me apasionó. Mi padre había sido colaborador de don Obdulio, Tello, Grau y Rius y Miró y auxiliar de Química Analítica en la Escuela Superior del Trabajo y en el Instituto Nacional de Higiene (Sección de Química) de Madrid, en los años treinta. Esta ascendencia y trayectoria personal me hicieron desembarcar en un laboratorio de métodos físicos de análisis, donde el Profesor Ortega Mata acababa de ganar la plaza de **Técnicas Instrumentales** de Madrid, decidiendo potenciar una línea de investigación en espectroscopía molecular de emisión, aplicada al análisis de fármacos. No en vano acudimos juntos a Barcelona, en 1973, al Primer Simposio Español de Fluorimetría. El como invitado de excepción a pronunciar la conferencia inaugural, y yo a presentar algunos resultados obtenidos sobre el análisis de ampicilinas. El tema de mi tesis doctoral sería **Análisis fluorimétrico de antibióticos**. En esa técnica y en ese tema fuimos pioneros en España. Mi compañero de curso, el Prof. Alvarez Builla, a su regreso a la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, tras haber trabajado en la Universidad de East Anglia, casualmente me hizo un "préstamo" de sales de quinolizinio que había sintetizado con gran rendimiento. A partir de esos instantes abrí una

línea propia, con mi colaboradora, la Dra. Martín, buscando y logrando la proyección analítica de estas moléculas, como marcadores fluorescentes de nucleófilos en general y de aminas en particular. A esta línea de trabajo prestamos una atención especial desde hace catorce años en el laboratorio de Técnicas Instrumentales, habiéndose potenciado considerablemente en el momento actual, contando con numerosas publicaciones en prestigiosas revistas, como **The Analyst**, **Analytica Chimica Acta**, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, **Talanta**, **Analytical Letters**, etc. Asimismo la presencia en nuestro laboratorio de un catedrático francés en régimen de sabático, de varios postgraduados extranjeros y otros más españoles en los últimos años, ha confirmado que la iniciativa tomada no iba descaminada.

La estancia ya finalizada de cinco colaboradores nuestros durante diferentes periodos de tiempo en las Universidades de Tokio, Gante y Montpellier, bajo la tutela de los profesores Imai, Baeyens y Lerner (los dos primeros miembros correspondientes extranjeros de esta Real Academia), así como nuestras excelentes relaciones con los grupos especializados de estas Universidades y las de Paris IX, Bradford, Loughborough y Coimbra, además de las inmejorables perspectivas analíticas de estas tecnologías, en cierto modo me hicieron decidir que el fundamento y título de este discurso fuera **El largo camino de los métodos luminescentes en análisis farmacéutico**, arriesgándome a hacer una apuesta por el futuro de estas metodologías y su incorporación creciente en las farmacopeas de prestigio.

3. EVOLUCION HISTORICA DE LAS TECNICAS ANALITICAS

En España hasta finales del siglo XVI, en la química incipiente, solo cabe citar a Lorenzo Cózar y Diego de Santiago como expertos destiladores.

Aunque se conocían una serie de procesos químicos, e iban tomando cuerpo otros, fundamentalmente gracias a los alquimistas, hasta el siglo XVIII, y debido al positivo influjo de Lavoisier, no se va a desarrollar esta ciencia en España. El avance de la Química va a caminar parejo a su presencia en las Farmacopeas, y consecuentemente la aceptación de la Farmacoquímica por los médicos.

Desde el Renacimiento, con Paracelso, hasta la etapa ilustrada de Carlos III, en la España barroca del Siglo XVII, sólo se atreven a mencionar la Química el burgalés Esteban de Villa, en sus obras **Examen de Boticarios** y **Libro de los Simples Incógnitos en la Medicina** y en cierto modo Jerónimo de la Fuente Piérola. También en 1622 Juan del Castillo escribe un capítulo muy general sobre la destilación.

Se debe destacar la figura de don Félix Palacios, que en 1701 tradujo y publicó el **Curso químico de Lemery** y en 1704 la **Palestra farmacéutica químico-galénica**.

Con la Ilustración comienza en Europa la Química moderna, su desarrollo se hizo posible gracias al Análisis Químico, que fue adquiriendo una progresiva importancia desde finales del siglo XVIII, pues sin análisis es imposible la síntesis. En los comienzos del siglo XIX, muchos farmacéuticos destacaron en Europa, como Scheele, Rose, Klaproth, Kipp, Fehling, etc.. Fresenius, en Wiesbaden, marcó un nuevo estilo de trabajar, enseñar y publicar todo tipo de análisis químico.

Según afirma Lora Tamayo, a mediados del siglo XVIII la Real Junta de Comercio del Principado de Barcelona y la Sociedad Vascongada de Amigos del País, fomentaron positivamente el desarrollo de la Química española. En la primera destacaremos a Mateo Orfila, como pensionado y a Francisco Carbonell como catedrático; en la Escuela de Vergara, enseñaron Proust y Chavaneau; indirectamente, gracias a este centro, los hermanos Elhuyar descubrieron el wolframio.

Fue Pedro Gutiérrez Bueno, Boticario Real y brillante catedrático de Química, el promotor, introductor y traductor de Lavoisier en España de su **Nueva Nomenclatura Química**. También publicó ocho libros sobre análisis de aguas y doce sobre Química y sus aplicaciones. Con él comienza a acrecentarse la especialización de los farmacéuticos en análisis de aguas, al igual que con Casto Ruiz del Cerro.

En España, los farmacéuticos del siglo XIX fueron reconocidos analistas. Así, Magín Bonet y Boufill, ha sido considerado como el creador de una importante escuela analítica española, de la que Juan Fagés y Virgili fue su más distinguido discípulo.

Magín Bonet, doctor en Farmacia, tras ganar la oposición de catedrático en Ciencias, solicitó la excedencia para ampliar estudios en el extranjero, donde tuvo el privilegio de recibir el positivo influjo de Berzelius, Fresenius, Bunsen, Dumas y Stass, y que a su regreso a nuestra patria prodigó el trasvase de sus conocimientos, acrecentando el ya importante prestigio de los analistas españoles.

Fagés (1862-1911), doctor en Farmacia y Ciencias, Ayudante y Auxiliar en nuestra Facultad de Farmacia y luego Catedrático de **Análisis Químico** de la Facultad de Ciencias de Madrid, escribía en 1909: *"En la primera mitad del siglo XVIII no se enseñaba en ninguna Facultad ni Escuela la Química, y apenas la Física"*. También Menéndez Pelayo apuntaba: *"Cuando en 1845 se inicia la restauración de la enseñanza, creándose las Facultades de Ciencias y la Academia, hubo que echar mano de los únicos elementos que existían, valiosísimos algunos, pero casi todos de ciencia aplicada. No había más químicos que los de la Facultad de Farmacia"*. Posiblemente don Marcelino exageraba algo.

El hilo conductor de la docencia superior de nuestras disciplinas en Farmacia debemos considerarlo iniciado con Antonio Moreno Ruiz (1796-1865), catedrático de **Química** del Colegio de San Fernando de Madrid, que cuando por decreto del 17 de septiembre de 1845 fue transformado en Facultad de Farmacia, hace ciento cincuenta años, asumió la docencia de la asignatura **Análisis química de alimentos, bebidas y aguas minerales y substancias venenosas, con las cuestiones a las que tiene relación este análisis**. Le sucede Juan María Pou y Camps (1801-1865) con la responsabilidad de la enseñanza del análisis químico. Fue un afamado analista de aguas minero-medicinales. Su docencia la continuó Manuel Rioz y Pedraja (1815-1887), que además de seguir con la tradición y especialización de su predecesor en la cátedra, ocupó los cargos de Decano de la Facultad de Farmacia y Rector de la Universidad Central de Madrid.

A Fausto Garagarza y Dugiols le cupo el honor y la responsabilidad de suceder a Rioz, sobre todo modernizando las enseñanzas y los laboratorios de los que era responsable, tratando de situarlos a nivel similar de los extranjeros.

Así pues, en 1884 y 1885, se introdujeron las disciplinas **Teoría y práctica de Física con aplicación a la Farmacia y Estudio de los instrumentos y aparatos de Física con aplicación a la Farmacia, con las prácticas correspondientes**. La denominación de esta última asignatura define perfectamente su contenido. Tenía su antecedente en la obra clásica de Henri Buignet **Manipulations de Physique**, que se estudiaba desde el año 1877 en la Escuela Superior de Farmacia de París, y en cuyo prólogo, como justificación de su presencia, se señala que el farmacéutico tendrá que usar una serie de aparatos de física en su ejercicio profesional, y que, por lo tanto, debe conocer su manejo y problemas con ellos relacionados, con más amplitud y detenimiento del que ordinariamente puede concederse en un curso de Física General.

Este concepto de la asignatura queda perfectamente reflejado en los programas del profesorado encargado de estas enseñanzas en nuestro país, como puede verse en la obra española del catedrático de la facultad madrileña Fausto Garagarza, publicada en 1892, **Instrumentos y aparatos de Física de aplicación a la Farmacia**, que durante años sería libro de texto de estudiantes y de consulta obligada para otros muchos profesionales. Fue director del Laboratorio Municipal de Madrid y Decano de nuestra Facultad.

Tras su jubilación forzosa en 1900, a los setenta años, también la asignatura cambia de denominación a **Técnica Física**, pero sin variar la orientación de la misma, y por ello no cabe confundirla con una Física General Aplicada, ni aún, aunque esté más próxima a ella, con una Física General Práctica.

Con el paso de los años y al hacerse patente la necesidad de incorporar los estudios correspondientes a la naciente **Físico-Química**, es la **Técnica Física** la que se encarga de ello, así pues, en 1928, evolucionan las denominaciones de estas asignaturas, surgiendo **Complementos de Física y Aplicaciones de Física y de Química-Física**, para de nuevo en 1931 tornar a **Técnica Física aplicada a la Farmacia**.

Uno de los más eminentes profesores de la Facultad de Farmacia, el Dr. Casares Gil, que durante tantos años regentó las cátedras de **Técnica Física** y **Análisis Químico**, fue el impulsor y renovador de estas disciplinas, en las que implantó una positiva metodología docente. Indicó que instrumentos físicos de uso cotidiano, como el polarímetro o el espectroscopio, entre otros, deben ser considerados básicos para el ejercicio profesional. Sus textos de **Análisis Químico** (diez ediciones) y **Técnica Física** (cuatro ediciones) han servido de base para la formación de generaciones de farmacéuticos. Sus discípulos, los doctores Casares López y Portillo Moya-Angeler le sucedieron respectivamente en las cátedras de **Análisis Químico** y **Técnica Física**.

En 1935, con la reorganización facultativa, surgen las **Técnicas de las medidas físicas y físico-químicas** para, de nuevo, retornar en 1944 a **Técnica Física**, con el Prof. R. Portillo, introductor en España de las técnicas polarográficas.

Posteriormente, en 1968, esta asignatura adquiere una visión totalmente renovadora, en el fondo y en la forma, con la denominación de **Técnicas Instrumentales**, gracias al entusiasmo y preparación científica del Prof. Manuel Ortega.

Es patente la rapidísima evolución de la tecnología en estos años, y si bien no ha variado el concepto, que pudiéramos denominar fundacional de la **Técnica Física**, su contenido si ha evolucionado de forma extraordinaria, tornándose decididamente instrumental.

Consecuentemente, la formación de un farmacéutico sería incompleta si no estuviera incluida la enseñanza de la ciencia de la instrumentación, al menos a un nivel suficiente para permitirle el conocimiento de los principios de la operación a realizar y las posibilidades y

limitaciones de cualquier instrumento científico con el que se va a encontrar en su ejercicio profesional.

Un considerable número de técnicas, actualmente comprendidas entre las instrumentales, ya fueron empleadas hace años con fines analíticos, como la valoración de azúcares con el polarímetro, la identificación de grasas y esencias mediante el refractómetro o la evaluación colorimétrica de hierro, nitritos o amonio en aguas, por no citar más que ejemplos bien conocidos.

En 1978, el Prof. Sanz y en 1982, quien les habla, se hacen cargo de esta disciplina, en asombrosa evolución. En la actualidad, posee una orientación fundamentalmente analítica, base de estudios de morfología y estructura molecular, análisis farmacológico, etc.

Así pues, ha llegado a ser práctica habitual del farmacéutico analista el uso de instrumentos tales como un espectrofotómetro UV-VIS, un potenciómetro para la determinación del pH y un cromatógrafo de gases o de líquidos.

Queda patente que, para el farmacéutico, el uso adecuado de los instrumentos científicos abarca una idea más amplia que la puramente analítica. Puede asegurarse que no existe ninguna etapa del desarrollo de un nuevo fármaco en que pueda prescindirse del uso de los mismos, ya que cada vez van adquiriendo mayor importancia en la preparación, caracterización, purificación y análisis de las más diversas sustancias, como puede comprobarse en todas las farmacopeas modernas.

Con una visión no muy retrospectiva podemos buscar las opiniones a este respecto de dos ilustres miembros de esta Real Institución.

Mi predecesor en el sillón académico, don Manuel Jaúregui González, en su discurso inaugural del curso 1973-74, **La revolución farmacéutica. 1874-1974** afirmaba como el farmacéutico español, con el cambio de siglo había pasado de preparador a analista.

Don Ricardo Montequi, en su discurso de ingreso **Médicos y farmacéuticos en la creación de la Química**, transmite su vinculación farmacéutica por la arrebatadora atracción de la química, argumentando posteriormente como la Farmacopea Española de 1908 ya poseía unas exigencias analíticas muy detalladas.

Esperemos que con nuestra pertenencia a la Unión Europea, y con la Farmacopea Europea en vigor, ganemos, en este aspecto analítico, el valioso tiempo desaprovechado, por diferentes causas.

Pero son quizá el uso adecuado y el conocimiento de los diversos equipos instrumentales, auténticas "herramientas" de cualquier profesional moderno, los que "marcan", tras su uso cotidiano y rutinario, el carácter científico del farmacéutico.

Hoy día los conocimientos sobre las bases teóricas, componentes, metodología y aplicaciones de los instrumentos científicos, se adquieren en la Facultad de Farmacia tras cursar la disciplina de **Técnicas Instrumentales**.

Aún cuando la actual denominación de esta asignatura es relativamente reciente, no estuvo nunca ausente en los planes de estudio precedentes, puesto que el análisis instrumental sólo es un nombre nuevo de una disciplina bien antigua.

En el plan actual de estudios de la Licenciatura de Farmacia de la U.C.M., vuelven a reunirse en feliz matrimonio, bajo el área de conocimiento de **Química Analítica**, el **Análisis Químico** y las **Técnicas Instrumentales**.

Comentar aunque sucintamente la evolución de las **Técnicas Analíticas** en las facultades de Farmacia de otras Universidades españolas, preñada de magníficos profesores, excedería en gran medida el objeto de este discurso.

3.1. ANALISIS CLASICO

Hoy día es un hecho probado, en cualquier laboratorio, que el análisis instrumental ha asumido con todo derecho un papel determinante, aunque por ello no ha desplazado, ni mucho menos, al análisis clásico, aún reconociendo sus limitaciones.

No se pone en duda la idoneidad del análisis instrumental para las determinaciones cuantitativas a niveles inferiores al 1%, sin embargo para concentraciones superiores, el análisis clásico aporta muchas veces gran precisión y exactitud.

La competencia entre ambos es absurda, pues es incuestionable que cada cual juega su papel, ya que el análisis clásico y el instrumental se complementan y de hecho se utilizan conjuntamente con evidente ventaja para el analista. Además, casi siempre se suele partir de análisis clásicos para establecer los patrones de calibración de los aparatos.

Está aceptado generalmente que en la década de los cuarenta se estableció el punto de inflexión entre el desarrollo y uso generalizado de los métodos clásicos y el comienzo del análisis instrumental, si bien en esos años ya era imparable el crecimiento de las técnicas instrumentales, debido fundamentalmente a su mayor sensibilidad, rapidez y hasta economía, en muchos casos. Tras la Segunda Guerra Mundial, con la difusión de los fotomultiplicadores y los transistores, la instrumentación analítica experimenta un inusitado avance, inimaginable pocos años antes, comenzando una veloz carrera hasta la actualidad, en que se hace difícil definir los niveles de rapidez y sensibilidad.

El conocimiento histórico de este desarrollo permitirá disponer de una perspectiva adecuada para evaluar las condiciones y necesidades actuales y prever las posibilidades futuras.

La gravimetría tiene por objeto la determinación de un elemento mediante la medida del peso (masa) de un producto insoluble originado en una reacción química determinada y relacionado con ese elemento. Los orígenes de la gravimetría son tan antiguos como los de la química y ésta al menos tan antigua como la historia escrita, aún cuando lo que hoy conocemos como química experimental no surgió hasta finales del siglo XVI.

Años más tarde, Robert Boyle, con la publicación de su libro **The Sceptical Chymisten** en 1661, inició el largo proceso que llevaría a establecer las bases científicas de la química. Boyle abandonó la teoría aristotélica de los cuatro elementos, fuego, aire, agua y tierra y los tres principios de Paracelso. Por el contrario, abogó por un enfoque experimental exhaustivo antes de postular teorías.

La Química se iba abriendo paso desde la Medicina y la Farmacia hacia la Mineralogía y la Metalurgia. Sin embargo, durante un siglo más la teoría del flogisto, debida a Johann Becher y divulgada por Georg Ernst Stahl, mantenía su influencia. Aún cuando esta teoría dificultaba los avances químicos, permitió el desarrollo del análisis químico y el mejor conocimiento de muchas reacciones sencillas.

De esta época destacaremos a Joseph Black, Henry Cavendish, Carl Scheele, Daniel Rutherford y Joseph Priestley.

Priestley fue uno de los últimos defensores de la teoría flogística, pero sus ideas comenzaron a evolucionar en 1774 cuando aisló un gas, tras calentar óxido de mercurio en un sistema cerrado. El oxígeno que en ese experimento había recogido, lo denominó "aire deflogisticado". Pocos años después, Rutherford y Cavendish descubrieron independientemente el nitrógeno, al que Rutherford denominó "aire flogisticado".

Al conocer Antoine Laurent Lavoisier los trabajos de Rutherford y Cavendish, fulminó la teoría del flogisto realizando experimentos cuantitativos con mercurio y aire en un sistema cerrado. Así, pudo explicar correctamente la combustión y demostrar que el aire era una mezcla de nitrógeno y oxígeno. Con el uso de la balanza, se convirtió Lavoisier en el precursor del análisis químico cuantitativo.

Simultáneamente el sueco Torbern Bergman sistematizó el análisis químico cualitativo y cuantitativo, describiendo numerosos reactivos, sin embargo fue partidario de la teoría flogística.

En Francia, las volumetrías se venían empleando desde comienzos del siglo XIX, sin embargo, la mayoría de los análisis se continuaban haciendo por gravimetría, siendo un ejemplo patente el método de S.A. Marggraf para la determinación de plata, al igual que el de T. Bergman en el análisis de minerales.

El tránsito del siglo XVIII al XIX también supuso un desarrollo de la gravimetría, si bien bajo una perspectiva un tanto empírica, ya que no se alcanzaba a comprender aún las leyes de la composición química.

En el ambiente químico de esa época se creía que las sustancias podían combinarse en proporciones definidas. J.B. Richter, ingeniero de minas de Silesia, que acuñó el término estequiometría, dió un paso importante, aunque con planteamientos erróneos, gracias a su sentido intuitivo de las leyes de la composición definida. Sin embargo el francés C.L. Berthollet se equivocó al considerar que la composición de un compuesto de dos elementos podía variar entre un máximo y un mínimo, en todas las proporciones. A él se opuso Joseph Louis Proust al aportar la evidencia experimental de que los metales forman óxidos y sulfuros de composición definida, no existiendo ningún producto de composición intermedia. Así se aproximó al descubrimiento de la ley de las proporciones múltiples.

John Dalton, en 1808, en la primera parte de su libro **New System of Chemical Philosophy**, propuso la idea (ya conocida por los griegos cuatro siglos antes de Cristo) de que la materia estaba compuesta por minúsculas partículas. Pero la teoría de Dalton abarcaba mucho más, ya que explicaba la ley de conservación de masas y las leyes de la composición definida y de las proporciones múltiples. Dalton se percató de que la composición de los compuestos químicos podía expresarse cuantitativamente, ya que éstos se forman al unirse los átomos de los diferentes elementos, con diferentes pesos relativos y que este hecho puede expresarse numéricamente. Elaboró una incipiente tabla de pesos atómicos, ya que no llegó a disponer de datos muy válidos, no siendo capaz de demostrar la sencilla relación que intuitivamente entendía que debía existir.

También en el año 1808 Joseph Louis Gay-Lussac publicó los resultados de sus experimentos acerca de la combinación de (volúmenes de) gases, en que observaba que los cocientes de los volúmenes en las reacciones gaseosas correspondían a números enteros pequeños. Estos resultados aparentemente parecían contradecir la teoría atómica de Dalton, ya que si un volumen de cloro y un volumen de hidrógeno daban dos volúmenes de ácido clorhídrico, entonces los "átomos" de Cl e H tendrían que dividirse, algo totalmente imposible, si la teoría atómica era cierta.

Amadeo Avogadro, en 1811, resolvió este dilema asumiendo que volúmenes iguales de gases, en las mismas condiciones, contienen el mismo número de partículas (que él llamó "moléculas"). Argumentó que estas moléculas gaseosas se dividen en "medias moléculas" en el momento de la reacción. De hecho supuso que los gases elementales contienen más de un átomo, si bien Avogadro nunca utilizó el término átomo.

Dalton nunca aceptó la ley de Gay-Lussac por lo que no llegó a captar la visión tan extraordinaria y revolucionaria que tuvo Avogadro.

Hoy sabemos que el razonamiento de Avogadro fue correcto, pero en su tiempo sus hipótesis se ignoraron o rechazaron. Los esfuerzos de André Marie Ampère y de Jean Baptiste Dumas para resucitar la hipótesis de Avogadro pasaron desapercibidos. Aún el mundo no estaba

preparado para las ideas de Avogadro. Desafortunadamente, tuvo que pasar medio siglo de confusión sobre los pesos atómicos, para que Stanislao Cannizzaro retomara con éxito las hipótesis de Avogadro.

Sin embargo, en este período de confusión, los analistas prácticos, con poco interés por los temas teóricos, realizaban análisis gravimétricos muy exactos de metales, minerales y agua, destacando entre ellos Richard Kerwan, sobre análisis de agua, Martin Heinrich Klaproth, que en sus análisis mineralógicos descubrió varios elementos y Louis Nicholas Vauquelin, bien conocido por sus reactivos.

En estos años, posiblemente la figura que más sobresalió fue Jöns Jakob Berzelius, que describió gran parte de los símbolos químicos y notaciones que hoy empleamos y que llegó a determinar el peso atómico de gran número de elementos.

Desafortunadamente, fue defensor de la teoría dualista, lo que le impidió acatar la hipótesis de Avogadro. No obstante su trabajo experimental analítico fue asombroso, siendo los valores de los pesos atómicos, de su célebre tabla, de gran parecido a la actual, si bien el valor para algún elemento fue el doble del correcto. Aunque Berzelius ha sido uno de los químicos más relevantes de la historia, posiblemente él no lo reconoció.

Este no fue el caso de Karl Remegius Fresenius, otro gran analista. Comenzó su vida científica como auxiliar de farmacia en Frankfurt, asistiendo luego a los cursos que se impartían en la Universidad de Bonn y trabajando en el laboratorio privado del farmacéutico Carl Marguart. Fresenius fue, en cierto modo, autodidacta, no olvidando nunca anotar sus observaciones experimentales. Al leerlas Marguart, quedó tan impresionado que le sugirió las publicase. Así lo hizo en 1841, siendo un éxito impresionante, ya que vio dieciséis ediciones su **Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse**. La decimoséptima edición fue supervisada por su hijo.

Fresenius, se trasladaría a la Universidad de Giessen, trabajando en el laboratorio de Liebig, y presentando como tesis doctoral, la segunda edición de su libro antes citado.

En 1845, fue nombrado profesor de Química, Física y Tecnología, en la Escuela de Agricultura de Wiesbaden. Al no recibir la ayuda económica institucional necesaria para disponer de un laboratorio de química, pidió dinero a su padre, con lo que adquirió y remodeló una casa, estableciendo en ella su laboratorio privado de análisis, comenzando sus enseñanzas en 1848 con cinco alumnos y un asistente, Emil Erlenmeyer. Aunque sólo contaba treinta años, ya era un reputado analista. Su casa, luego se convertiría en el famoso Instituto Fresenius, llegando a contar en 1885 con sesenta alumnos, gozando en Alemania, del reconocimiento de la industria y también del gobierno. En 1862 comenzó a publicar una revista científica de trascendencia mundial, **Zeitschrift für analytische Chemie**.

La industria de la primera mitad del siglo XIX necesitaba métodos rápidos de análisis, esta necesidad se hacía patente en Francia desde el siglo anterior, sin embargo, sólo se disponía de unos pocos indicadores de origen vegetal.

François A.H. Descroizilles fue el primero en aventurarse en la volumetría, al tratar de establecer en la industria textil, un método para la determinación de la fuerza blanqueadora del hipoclorito, añadiendo ácido sulfúrico y usando índigo como indicador.

Posteriormente Gay-Lussac sería el auténtico impulsor de la volumetría, gracias al encargo, en 1829, del gobierno francés para mejorar los métodos de valoración de la plata, estableciendo un método sencillo y rápido, con un error inferior al 0,05%, que sólo fue superado con la introducción de los métodos potenciométricos. Rápidamente los trabajos de Gay-Lussac se difundieron en Inglaterra y Alemania.

Por esos años Robert W. Bunsen publicó sus trabajos sobre iodometría. Sin embargo Berzelius y Fresenius aún no estaban plenamente convencidos de los métodos volumétricos. Tuvo que llegar Karl F. Mohr en 1830, tras hacerse cargo de la farmacia de su padre, para vencer las reticencias que mostraba la volumetría, con numerosas contribuciones prácticas, siendo un patrón reconocido la sal de Mohr (sulfato ferroso amónico) o pasar a la posteridad con el método de Mohr, para la determinación de cloruros, así como las buretas y pipetas calibradas que llevan su nombre. Sus métodos volumétricos de análisis fueron publicados en 1855 y 1856, gozando luego de reconocido prestigio en el ámbito científico.

En 1883 Johan G. Kjeldahl desarrolló su conocido método para la determinación de nitrógeno, con pocas variaciones hasta la actualidad.

L. Winkler en 1888 contribuyó a la popularización de los métodos volumétricos al lograr la determinación del oxígeno disuelto en el agua.

En el año 1859 no se podía disponer de una verdadera tabla de pesos atómicos; las tablas variaban de un país a otro, para tratar de superar este problema Friedrich A. Kekulé, junto con Charles A. Wurtz y Carl Weltzien, invitaron en 1860 a reunirse en Karlsruhe (Alemania) a más de un centenar de científicos de todo el mundo.

Un joven profesor de la Universidad de Génova, Cannizzaro, trató de convencer a sus compañeros de la utilidad de la hipótesis de Avogadro para resolver el problema de los pesos atómicos.

Tras concluir el congreso Julius L. Meyer leyó una copia de los trabajos de Cannizzaro, que le había entregado a Angelo Pavesi, de la Universidad de Pavía, que acabó de convencerle.

Gracias a las aportaciones de Cannizzaro, Meyer y Mendeléev, se pudo establecer en 1869 la Tabla Periódica.

El congreso de Karlsruhe, permitió en pocos años un avance importante de la gravimetría y volumetría, que acrecentó sus bases científicas, a finales del siglo XIX, con las aportaciones de la fisicoquímica.

El predominio europeo en este ámbito, también tiene como base a Justus Liebig y su laboratorio de la Universidad de Giessen.

Otro analista de gran prestigio científico en estos años fue William F. Hillebrand, nacido en Honolulu, que se doctoró en 1875 en la Universidad alemana de Heidelberg, bajo la dirección de Bunsen y Kirchhoff. A su regreso a Estados Unidos, prodigó sus conocimientos con actividad incansable, hasta alcanzar la jefatura de la Oficina Nacional de Patrones en 1909, tras haber publicado innumerables libros y artículos. Le sucedió su discípulo Gustaf E. Lundell, que completó su obra en el actual Programa de Patrones de Referencia, que permite hoy día cubrir un amplísimo intervalo de patrones de materiales de composición química y propiedades físicas establecidas perfectamente.

Una vez resuelto el problema de los pesos atómicos, tan necesarios tanto para la gravimetría como para la volumetría, iba a surgir la ayuda inestimable de la fisicoquímica, para que éstas alcanzaran la madurez.

La fisicoquímica no toma auténtica carta de naturaleza hasta que los noruegos Cato M. Guldberg y Peter Waage, entre 1864 y 1879, formularan la ley de acción de masas.

En 1884, Jacobus H. van't Hoff, con una visión termodinámica de esta ley, aportó claridad a la cinética y equilibrio de las reacciones.

Posteriormente, en 1887, Svante A. Arrhenius publicó su teoría de la disociación electrolítica, que explicaba el comportamiento de estas soluciones.

Fue Wilhelm Ostwald, quien recogió las aportaciones de Arrhenius y van't Hoff, situando a la fisicoquímica en un lugar de privilegio a finales del pasado siglo (1887), gracias a la fundación de la revista **Zeitschrift für physikalische Chemie**.

Ostwald, a partir de 1894, dió un impulso definitivo a la ley de acción de masas y a la teoría de Arrhenius, al introducir los conceptos de constantes de disociación y de solubilidad. A sus aportaciones se unieron las de Gibbs y Nernst y ya en el siglo XX las de Kolthoff.

En 1909, el danés Sorensen, introduce el concepto de pH y su compatriota Niels J. Bjerrum calcula la forma de las curvas de neutralización, lo que vuelve a animar a Kolthoff a desarrollar la interpretación teórica de los métodos volumétricos, en 1926.

Ya en el siglo pasado se habían comenzado a utilizar los reactivos orgánicos como agentes precipitantes en las determinaciones gravimétricas. También surgieron agentes quelantes, tales como la dimetilglioxima, para la determinación de níquel, con vigencia actual.

En el primer tercio de este siglo se conoció que determinados ácidos amino policarboxílicos formaban complejos estables con muchos metales, dando lugar a la posterior utilización del AEDT para la valoración de calcio y magnesio.

Paralelamente, en 1934 los ingleses B.A. Adams y E.L. Holmes hicieron una genial aportación al análisis clásico con la introducción de las resinas de intercambio iónico, que con la Segunda Guerra Mundial, propició que, en 1942, George E. Boyd usara estas resinas para separar plutonio de uranio y Frank H. Spedding las utilizara a gran escala con las tierras raras, aunque estos trabajos no fueran divulgados hasta la conclusión del conflicto bélico.

Mediante el intercambio iónico en columna se facilitó enormemente la separación de elementos tales como manganeso, hierro, cobalto, níquel, cobre y cinc, simplificando notablemente su valoración.

Aunque el análisis clásico, no se emplee en el presente tan profusamente como en décadas pasadas, seguirá siendo esencial, a pesar de la vertiginosa presencia del análisis instrumental, con lo que lleva consigo de rapidez y automatización.

Quizás el mayor peligro radique en la menor atención que se dedica en la moderna enseñanza universitaria y en la industria, en general, a los análisis clásicos. Ante esta circunstancia, a mediados de la década de los ochenta, Silve Kallmann, defendió el enfoque consciente y sistemático del uso conjunto del análisis clásico y del instrumental, argumentando que pueden revitalizarse métodos antiguos aunándolos con las determinaciones instrumentales.

Por otra parte, siempre se ha de considerar, en gravimetría, la pureza de los precipitados, a pesar de trabajar en las mejores condiciones; así pues se habrán de determinar en el precipitado los posibles contaminantes por análisis instrumental.

En otros casos, previa determinación gravimétrica, habrá que verificar el filtrado, teniendo presente que los precipitados no siempre son totalmente insolubles. En estos casos, sería conveniente el posterior análisis instrumental del filtrado.

El uso simultáneo y complementario de análisis instrumentales y clásicos, en muchas circunstancias, permitiría mejorar la precisión y exactitud de las determinaciones.

El análisis clásico está completando un ciclo poco frecuente, se vitaliza a finales del siglo XIX con limitadas bases científicas, hasta la mitad del siglo XX se aunan técnica y excelentes conocimientos científicos y al concluir el siglo actual se observa un retroceso, en muchos casos, por defecto de experiencia práctica. Sin embargo nunca llegará su ocaso.

Desde el punto de vista pedagógico, el análisis clásico siempre es formativo con visión de largo alcance, especialmente si se forma antes a los alumnos en fisicoquímica que en análisis químico cualitativo y cuantitativo, incluso les debieran preceder siempre las químicas inorgánica y orgánica. Un buen aprendizaje práctico clásico siempre será beneficioso para los alumnos.

3.2. ANALISIS INSTRUMENTAL

Es un hecho histórico incuestionable que el desarrollo científico de la química ha venido determinado en gran parte por su faceta analítica.

Textualmente citaré a Wilhelm Ostwald, quien en 1894 escribió: *"El arte de reconocer diferentes sustancias y determinar sus constituyentes, ha adquirido gran importancia en las aplicaciones de la ciencia, puesto que las preguntas que puede contestar surgen en cualquier lugar donde se empleen procesos químicos con fines científicos o técnicos. Su importancia hizo que se cultivara (el análisis) desde los albores de la historia de la química y sus resultados abarcan gran parte del trabajo realizado en el mundo científico"*.

Sin embargo, este mismo científico reconocerá la injusticia de considerar a los analistas como los servidores de los demás colegas de otras disciplinas, incluso despreciados. Hoy día algún osado nos califica de "servicios", a pesar de que la primera revista analítica científica, debida a Fresenius, data de 1862, en Alemania y que **The Analyst** comenzara a publicarse en Inglaterra en 1874.

Esencialmente, en la actualidad se sigue manteniendo válida la clásica definición de que el análisis químico cualitativo se ocupa de la detección e identificación de los componentes de una muestra problema, mientras que el cuantitativo considera la determinación de su cantidad. La palpitante novedad es la aportación de muchas técnicas instrumentales con fines analíticos, debido fundamentalmente a la imperiosa demanda de otras áreas científicas, especialmente biomédicas, industriales y medioambientales.

No obstante, I.M. Kolthoff afirmó, que tanto en Europa como en Estados Unidos el avance del análisis, a finales del siglo XIX y principios de éste, en gran medida se debió a J. W. Gibbs, cuando publicó, hace poco más de cien años, los clásicos estudios termodinámicos que determinan los equilibrios, a partir de los cuales la regla de las fases ha jugado un papel fundamental en las separaciones analíticas.

También debe recordarse que el primer libro dedicado enteramente a los aspectos analíticos de los indicadores ácido-base fué publicado en 1920 por Kolthoff, si bien fué Arthur A. Noyes quien, en 1910, aportó la primitiva interpretación de las valoraciones ácido-base. Kolthoff, sin embargo estableció la relación color-estructura.

Por otra parte Theodore W. Richards, de la Universidad de Harvard, enriqueció la literatura analítica con el desarrollo de métodos de análisis, altamente precisos y exactos, de pesos atómicos de diversos elementos. Con él hizo su tesis doctoral el no menos famoso H.H.

Willard. Eran los años siguientes a la Primera Guerra Mundial, y según nos recuerda Kolthoff, en el mundo químico reinaba una confusión enorme, ante la ausencia de autoridad de la IUPAC, hasta tal punto que existían dos tablas de pesos atómicos, la internacional y la alemana. En algunos casos, las diferencias entre ambas tablas eran muy significativas.

En 1907, Joel H. Hildebrand, discípulo de Edgar F. Smith, fué uno de los pioneros en la determinación electroanalítica de aniones. En 1913, el mismo Hildebrand, alcanza reconocimiento mundial con su publicación sobre las aplicaciones analíticas del electrodo de hidrógeno, si bien fue Kolthoff quien introdujo el término "potenciométricas".

Posteriormente, W. Mansfield Clark, en 1920, recopila en una genial publicación todos los métodos conocidos hasta esos días para la determinación del pH, conductividad, métodos cinéticos, etc.

En esos años L. Michaelis acuña los términos de "potencial redox" e "indicador redox", si bien se seguía insistiendo por algunos científicos en la conveniencia de no abreviar y escribir completo oxidación-reducción. Pero al margen de estos detalles de forma, si hay que reconocer que desde finales de la primera década de este siglo, el moderno electroanálisis se benefició del concepto de actividad iónica introducido en 1907 por G.N. Lewis.

Siguiendo las autorizadas enseñanzas de Kolthoff, podemos afirmar que en el primer tercio de este siglo la formación analítica de los futuros profesionales, se solía dividir, como también a veces lo solían hacer los libros clásicos (W. Böttger y J. Stieglitz), que incluían el análisis cualitativo como una parte de la Química General, para que el alumno se familiarizara con los fundamentos fisicoquímicos, y en particular las teorías de Arrhenius, Werner y Kossel. Por otra parte, en muchas universidades, el análisis cuantitativo, se impartía dentro de las Prácticas de Laboratorio, donde al estudiante se le iniciaba en las volumetrías y gravimetrías, así como con algunos análisis reales.

Hasta 1925, no comienza a aparecer con fuerza en los libros de texto de análisis, además del enfoque gravimétrico o volumétrico, los apartados dedicados a precisión y exactitud, determinaciones de masa y volumen, neutralización, producto de solubilidad, oxidación-reducción o determinación de gases.

En esos años destacaron brillantes analistas como S. Popoff, T.B. Smith, C.W. Foulk, N.H. Furman, V. Meloche, M.G. Mellon, E. Swift y por supuesto H.H. Willard, todos ellos precursores de los modernos métodos instrumentales de análisis.

Es preciso rendir un merecido homenaje a Kolthoff, y a sus más brillantes discípulos como J.J. Lingane, H.A. Laitinen y H.L. Sanders, aunque no sea más que porque gracias a él, tras una acalorada discusión con Linus Pauling y el presidente de la IUPAC, W.A. Noyes, se reorganizó la estructura de esta institución, permitiéndose, desde 1951, el establecimiento de la

división analítica, con varias comisiones, en el seno de la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada.

Los albores del moderno análisis instrumental debemos buscarlos en el último tercio del siglo XIX, casi siempre con especial dedicación analítico clínica y toxicológica, así como industrial, fundamentalmente siderometalúrgica. Lógicamente el desarrollo de los equipos llevaba pareja la continua aportación bibliográfica, no sólo de libros sino fundamentalmente de revistas especializadas.

Este ascenso imparable hace que en los años treinta sean relativamente frecuentes equipos y publicaciones ligados a valoraciones potenciométricas y conductimétricas, análisis espectroscópicos, o aplicaciones de las fotocélulas. La colorimetría va sustituyéndose por la espectrofotometría UV-VIS y la cromatografía prosigue su empuje.

No obstante quedan páginas entreabiertas, pues el infrarrojo tiene más proyección óptica que analítica, o bien la espectrometría de masas que aún necesitará unos años, muy pocos eso sí, para salir del dominio de los físicos. Sin embargo la ultracentrifugación, que le valió el premio Nobel de 1926 al sueco Svedberg, se decanta totalmente del lado analítico.

La década de los cuarenta estuvo marcada, en todos los sentidos, por la Segunda Guerra Mundial, que aunque es cierto que actuó como catalizador en muchas parcelas científicas; no obstante, los descubrimientos alcanzados frecuentemente eran clasificados como materia reservada en todos los países, con lo que mucha información no apareció en la literatura científica hasta bien asentada la postguerra. Sin embargo, no me sustraigo a citar tres publicaciones fundamentales debidas a Ralph Müller en 1939, 1940 y 1941, respectivamente sobre **Photoelectric Methods in Analytical Chemistry, American Apparatus, Instruments, and Instrumentation** e **Instrumental Methods of Chemical Analysis**. En esos años lógicamente los científicos se percataron de que, como consecuencia de la guerra, no sólo se desarrollaría el análisis, sino, que se transformaría toda la instrumentación analítica, no sólo de los equipos clásicos, sino también de aquellos derivados de la incorporación relativamente frecuente de transistores, tubos de rayos catódicos, detectores de ionización por llama y en general del análisis automático.

En esta década surgieron revistas analíticas de indudable prestigio, tales como **Annual Review of Analytical Chemistry**, **Analytica Chimica Acta**, **Applied Spectroscopy** y **Spectrochimica Acta**, así como la edición mensual de **Instrumentation in Analysis**, dentro de la revista **Analytical Chemistry**, que sumadas al texto clásico de Willard, Merritt y Dean, titulado **Instrumental Methods of Analysis**, van a constituir un hito en la modernización de la docencia y del sistema de concebir la instrumentación analítica.

La década de los cincuenta se caracterizó por ser un período de optimismo y de cambio, gracias al inicio de un desarrollo tecnológico increíble que ha permitido que hoy día la televisión

en color o los satélites artificiales sean si no vulgares, sí populares. El progreso científico era evidente, pero su tributo y sus raíces van asociados a un drama; en España y en el mundo se trataba de renacer y sobrevivir en la postguerra. Los avances científicos fueron evidentes, en análisis también. Sin embargo, existía un misterio no unamuniano, ya que imperaba el espionaje científico, pues muchos conocimientos no eran revelados por razones políticas, entre ellos lógicamente estaban las técnicas analíticas relacionadas con la química nuclear.

Prácticamente hasta la Segunda Guerra Mundial, el análisis era inorgánico fundamentalmente, incluso se seguía llamando "mineral", hasta tal punto que la bioquímica en general y el análisis orgánico en particular estaban respecto a aquel, como España y Portugal, como Casares y don Obdulio, en aquellos años, *ainda de costas*.

Sin embargo algunos científicos geniales, como Kolthoff, Willard y Furman, entre otros, decidieron ampliar las fronteras analíticas. Los horizontes se ensancharon tanto que Elving acuñó una nueva definición de las técnicas analíticas, que posee total vigencia en la actualidad. Las describió así: *"Todas las técnicas y métodos destinados a obtener información sobre la composición, identidad, pureza y constitución de las muestras de un material, en cuanto a su tipo, cantidad y agrupación de átomos y moléculas, así como de la determinación de aquellas propiedades físicas y comportamiento que puedan correlacionarse con estos objetivos"*.

Para el analista, los años cincuenta constituyen un periodo de desarrollo muy fructífero, que permitió afrontar con éxito los retos de la década siguiente con la eclosión de la electrónica.

Gracias a James N. Shoolery la espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) adquiere, como técnica, una mayor proyección química. La fosforimetría recibe un importante impulso tanto desde el punto de vista teórico como instrumental, facilitando su utilización en análisis orgánico, merced a las aportaciones de Kiers, Britt y Wentworth. En esta década de los cincuenta la fometría de llama dió un tirón importante con la comercialización industrial del equipo diseñado por Gilbert, Hawes y Beckman.

Ya en estos años las técnicas electroanalíticas clásicas estaban ampliamente generalizadas, si bien la voltametría de redisolución anódica o con electrodos sólidos no disponía de equipos instrumentales comercializados.

Auge y popularidad inusitada adquirieron en los años cincuenta los métodos de separación, gracias al desarrollo de la cromatografía en capa delgada, que a partir de los trabajos de Kirschner, Miller y Keller, utilizando láminas de vidrio recubiertas de sustancias adsorbentes, iban a permitir separar terpenos en cítricos. Por otra parte Marcel J.E. Golay continuó infatigable con sus estudios sobre las columnas cromatográficas, llegando a la demostración experimental y teórica del funcionamiento de las columnas capilares.

En aquella década ya se intuía la posibilidad futura de asociar un espectrómetro de masas con un cromatógrafo de gases, pues R.S. Gohlke utilizó un equipo con analizador de tiempo de vuelo y registro fotográfico, para analizar mezclas de compuestos volátiles.

Los laboratorios de análisis van a sufrir cambios profundos, y no porque se comercialicen los registradores de papel continuo, cada vez más difundidos, sino porque comienzan a ser también habituales los termistores y los transistores en los equipos instrumentales. También se popularizan los agitadores magnéticos y por supuesto se perfeccionan los detectores de radioactividad. Debemos recordar que en estos años comenzaban a abrirse paso en los laboratorios las balanzas monoplato, al igual que las resinas de intercambio iónico o las técnicas "semi-micro" analíticas. El radioinmunoanálisis también quería tímidamente ocupar un puesto en análisis.

Ante este abanico que iba desplegando nuevas perspectivas analíticas, estoy convencido que se planteaba a los profesores de nuestras disciplinas el dilema eterno que todos tenemos: ¿Cómo incorporar todas las novedades en nuestras clases y en nuestros textos, sin que los alumnos "fallezcan" en el tiempo acotado que tenemos asignado a nuestras asignaturas en los planes de estudio?. El problema no es nuevo.

Pues bien, a mediados de nuestro siglo se fue haciendo necesario incluir nuevos temas sobre instrumentación analítica, métodos cinéticos, de separación, diseño experimental, estadística y por supuesto análisis orgánico funcional. Esta novedosa situación seguro que obligó, y nos debería seguir siempre obligando a los profesores, a ser tremendamente selectivos en nuestra labor docente. Hay que saber soltar lastre para navegar mejor en determinados mares, pero antes es necesario saber descubrir nuevas rutas.

En aquellos años, concretamente en 1954, ya había espectrofotómetros UV-VIS con fotomultiplicadores, que cubrían el intervalo de 210 a 700 nm, equipos de haz doble con monocromadores y registro continuo de 215 a 750 nm y espectrómetros de masas, comercializados, aunque poco difundidos, por razones obvias.

La década de los sesenta, para mí y para muchos prodigiosa, trae a la memoria recuerdos de la música de Joan Baez y de los Beatles, el *op art*, los hippies, las minifaldas, la guerra del Vietnam, el "Che" Guevara, los movimientos por los derechos humanos y la conquista del espacio, que puso al hombre en la Luna. Fueron mis años de estudiante universitario.

En aquel entonces se produjo la transición, más bien diría vuelco, del análisis clásico hacia el análisis instrumental. En 1968 se crearon las primeras agregaduras de **Técnicas Instrumentales** en las facultades de Farmacia españolas, ocupando el Prof. Ortega la de Madrid; ya desde 1963 el Prof. Portillo había denominado a su libro de texto **Métodos Instrumentales Químico-analíticos**, y los estudiantes de Farmacia, en las prácticas, manejábamos el microscopio óptico, el polarímetro, el refractómetro y las cubetas de

electroforesis, que para aquellos años no era poco. Los alumnos internos teníamos acceso *de visu* al (en singular) fotómetro de llama, fluorómetro de filtros y polarógrafo.

En aquella Europa que tuve el privilegio de conocer, los semiconductores sustituían a los transistores, surgían los miniordenadores y comenzaban a aparecer los láseres de onda continua y pulsante. Avanzaba la instrumentación electrónica modular, que iba a permitir a los analistas desarrollar sus propios equipos instrumentales y ahondar más en los fundamentos de las determinaciones analíticas que llevaban a cabo.

Una de las técnicas más activas de estos tiempos fue la espectrofotometría de absorción atómica, que si bien fue ampliamente utilizada en los años cincuenta, sin embargo en esta década los esfuerzos de los científicos se dirigieron hacia el desarrollo de nuevas metodologías analíticas y aplicaciones de lo mas diversas. El empleo de llama de acetileno-óxido de nitrógeno mejoró la determinación de elementos tales como molibdeno o berilio, difíciles de analizar con llama acetileno-aire, previamente utilizada. La atomización con el horno de grafito, desarrollado por Boris L'vov a principios de los años sesenta, permitió rebajar los límites de detección para bastantes elementos, si bien la comercialización de estos equipos solo se divulgó a partir de 1970.

Las espectroscopías de emisión atómica tuvieron un extraordinario impulso con el uso de plasmas de acoplamiento inductivo, como sistema de excitación. Esta importante innovación fue introducida por S. Greenfield en 1964 y V. Fassel en 1965.

Las espectroscopías de luminiscencia comienzan su rápido ascenso. Trabajando sobre la hipótesis de C.T.J. Alkemade (1963), el grupo de J.D. Winefordner, de la Universidad de Florida, desarrolló, a mediados de los años sesenta la espectroscopía de fluorescencia atómica como herramienta analítica. Las espectroscopías de fluorescencia y fosforescencia molecular aportan también en estos años brillantes trabajos de investigación.

Las otras espectroscopías moleculares, UV-VIS, IR y Raman van dando luz sobre nuevas aplicaciones, si bien hasta la década siguiente, con la incorporación de las transformadas de Fourier y Hadamard, no se logró el mayor realce de estas técnicas tradicionales.

Aunque su auge y desarrollo se producirá en la década siguiente, debemos apuntar aquí un tímido nacimiento de la quimiometría, pues la publicación de Abraham Savitsky y Marcel Golay, de Perkin Elmer, describiendo en 1964 un algoritmo para reducir el ruido aleatorio, permitió reconocer mejor las características espectrales y disminuir las interferencias.

Los pujantes métodos electroquímicos de los años cuarenta y cincuenta, continúan desarrollandose en la década de los sesenta. Así pues fueron notorios los progresos en potenciometría con electrodos selectivos de iones y en polarografía. Tras el trabajo, ya clásico de Nicholson y Shain, en 1964, en el que utilizando técnicas voltamétricas de barrido lineal y cíclico, desarrollan criterios de diagnóstico, que permiten caracterizar las distintas reacciones

que tienen lugar en la superficie del electrodo, marcando una nueva época dentro de las técnicas voltamétricas.

La potenciometría con electrodos selectivos de iones tuvo un auge decisivo gracias a las investigaciones de Martin Frant, James Ross, Garry Rechnitz, Enro Pungor, George G. Guilbault y Richard Buck. Así las ideas de los dos citados primeramente y el apoyo de la firma Orion, dió lugar al electrodo de fluoruros, pionero de otros de brillante porvenir.

Por otra parte la cronopotenciometría gracias a los trabajos de Fred Anson en 1963 y de Charles Reilley en 1965, experimentó un notable impulso.

La cromatografía, descubierta a principios de este siglo, redescubierta en los años treinta, ampliamente desarrollada, en su vertiente gaseosa, en la década de los cincuenta, continuó su vertiginoso crecimiento en los años sesenta, dando lugar a múltiples aplicaciones analíticas.

El impresionante esfuerzo realizado por J. Calvin Giddings, John Knox, R.P.W. Scott y George Guiochon, entre otros, permitió un mejor conocimiento de los procesos que tienen lugar en las separaciones cromatográficas. El desarrollo de nuevos detectores, debido en especial a J.E. Lovelock y a S.R. Lipsky, en general permitió incrementar la sensibilidad y selectividad de los métodos cromatográficos.

La cromatografía de gases con columna capilar, descrita a finales de los años cincuenta por Marcel Golay, tuvo una lenta progresión en la década siguiente, logrando su mayor reconocimiento en la década de los setenta, gracias a la solución de los problemas inherentes a la inyección de la muestra así como a la tecnología de la columna.

Las primeras referencias al uso de fluidos supercríticos en cromatografía, datan de 1962, sin embargo esta técnica no encontró su verdadera utilidad analítica hasta las aportaciones que, en 1968 hiciera Karayannis.

El acoplamiento de técnicas tiene en la década de los sesenta un hito importante. Los primeros sistemas CG-IR fueron descritos independientemente por Wilkds y Brown, por una parte y por Bartz y Ruhl poco antes.

La ya próxima y deslumbrante proyección analítica de la espectrometría de masas, estaba naciendo gracias a los esfuerzos de Fred McLafferty, Klaus Biemann, Maurice Bursey y John Beydon así como a George Morrison.

Por otra parte, la entrada de los miniordenadores en los laboratorios, iba a comenzar a permitir el manejo de grandes cantidades de datos.

Especial mención debemos hacer aquí a los métodos cinéticos de análisis y a los métodos clínicos automatizados; estos últimos deben su auge a los grupos de trabajo dirigidos por Howard Malmstadt, Harry Pardue, Charles Reilley y George Guilbault.

Si bien la biotecnología, una de las orientaciones del nuevo plan de estudios de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid (1993), no despertó el interés

actual hasta los años ochenta, los fundamentos del proyecto del genoma humano y de la ingeniería genética se establecieron en 1966, cuando Bruce Merrifield, de la Universidad Rockefeller puso a punto un equipo instrumental para la síntesis automatizada de péptidos. Este trabajo, origen de investigaciones posteriores, le llevaría a alcanzar el premio Nobel en Química en 1984.

A veces la visión que la sociedad tiene de la Universidad y también de otras instituciones científicas, es sesgada y egoísta. En los años setenta, muchos sólo pensaban que allí radicaban focos de protesta estudiantil y descontento generalizado, en vez de atisbar que en realidad no sólo se generaban foros de debate, libre expresión y pensamiento, sino que a nivel mundial se estaban desarrollando equipos instrumentales y técnicas que tendrían relación directa con la exploración del espacio y de las profundidades marinas, la calidad del aire que respiramos o el diagnóstico, prevención y tratamiento de ciertas enfermedades.

Si bien en toda la primera mitad de este siglo se fue acentuando el problema de la contaminación ambiental, no surgió una firme llamada de atención hasta que en 1962 Rachel Carson escribió **Silent Spring** que no sólo los países industrializados, sino que la Humanidad entera corría peligro. En 1970 con la declaración del primer "Día de la Tierra", se adquirió un importante compromiso para la defensa del medio ambiente. A partir de ese año, en las legislaciones de todos los países, surgen normas y criterios que reflejan esta inquietud.

Es obvio que paralelamente a estas corrientes mundiales, surjan las herramientas analíticas que permitan centrar los problemas para luego encontrar soluciones.

De acuerdo con Bruce Kowalski, en esta década incide totalmente la informática en el análisis, aprovechándose de la estadística y del cálculo para potenciar una nueva especialidad, la quimiometría, que permitirá sacar el máximo partido de los datos obtenidos en los procesos de medida, gracias a la planificación y diseño de experimentos basados en modelos matemáticos, con el consiguiente ahorro de tiempo y reactivos. Además, el diseño de experimentos permitirá la predicción de las zonas óptimas de trabajo, sin que éstas ni siquiera hayan sido exploradas.

El empleo de la convolución, deconvolución, correlación y correlación cruzada, permitirá aumentar la resolución en análisis espectral.

Uno de los aspectos más positivos de esta década lo constituyó el éxito de la aplicación de la transformada de Fourier a las espectroscopías de RMN e IR.

Fueron decisivas las aportaciones de Gary Horlick para lograr los espectros finales de emisión atómica con transformada de Fourier. El aumento de la sensibilidad, se debió, en gran medida a la modelización, con el apoyo de programas de ordenador, que permitió un exhaustivo estudio de los espectros.

Si bien el efecto optoacústico o fotoacústico era conocido desde finales del siglo XIX, hasta principios de los años setenta del siglo en curso no se desarrolló como técnica la

espectroscopía fotoacústica, orientándose fundamentalmente hacia el estudio de materiales metálicos, semiconductores y aislantes, análisis de superficie y también para sistemas biológicos.

Aunque los láseres sintonizables se desarrollaron en los años sesenta, destaca su aplicación, en la década siguiente, a técnicas tales como la espectroscopía de fluorescencia atómica, empleándose como fuente de radiación un láser, técnica magistralmente descrita por J.D. Winefordner y L.M. Fraser. También se desarrolló entonces la espectroscopía Raman, fundamentalmente orientada hacia el análisis medioambiental.

En la determinación analítica de trazas destacaron en estos años los trabajos de Joseph M. Jaklevic mediante espectroscopía de fluorescencia de rayos X, empleando semiconductores como detectores y los de R. Cournoyer por espectrofotometría IR con transformada de Fourier.

En 1978, David Hercules, refiriéndose a las técnicas de superficie, llegó a escribir que *"cada tipo de espectroscopía de superficie tiene un acrónimo, un intento por parte de los científicos para competir"*. La espectroscopía fotoelectrónica de rayos X se empleó desde estos años para la determinación de las energías de enlace de compuestos de N, P, S y C, entre otros.

Aunque a finales de los años cincuenta se demostró que el análisis en flujo continuo requería la fragmentación de la corriente de flujo mediante aire, modificando esta técnica, al inyectar la muestra problema directamente en la corriente transportadora, Jaromir Ruzicka y Elo Hansent, estaban creando el análisis por inyección en flujo, propiciando numerosas aplicaciones entre las que destacaremos los análisis de muestras medioambientales, clínicas y de fármacos.

Horacio A. Mottola y V.V.S. Eswara Dutt describieron nuevos métodos analíticos basados en reacciones enzimáticas y acoplados a sistemas de flujo.

Durante esta década se desarrollaron los detectores electroquímicos en cromatografía líquida, permitiendo un espectacular auge de los análisis clínicos y farmacológicos, fundamentalmente dirigidos hacia catecolaminas y sus metabolitos, endorfinas, compuestos fenólicos y enzimas. Así pues, empleando métodos voltamétricos se pudo detectar *in vivo* la liberación de catecolaminas en cerebro.

En estos años, de forma similar a como se estaban modificando específicamente las fases estacionarias de las columnas cromatográficas, también se modificaron las superficies de los electrodos, con el fin de realizar unas determinaciones electroquímicas específicas, esfuerzo que inicialmente se debió a Royce W. Murray, que supuso un aporte importante para el posterior desarrollo de los electrodos químicamente modificados, de gran aplicación en los más variados campos.

Si bien en un principio se asignaba a la moderna cromatografía líquida (CL) un papel auxiliar de la cromatografía de gases (CG), especialmente útil donde ésta no llegaba, es decir en el análisis de compuestos no volátiles o termolábiles, pronto destacaron otras innumerables

ventajas de la CL, que permitieron extender de forma inimaginable este conjunto de técnicas, previa modificación de la temperatura de trabajo y de las fases móvil y estacionaria. Destacaremos en este tiempo el desarrollo de la CL de fase inversa, que comenzó a revolucionar el análisis bioquímico.

Puesto que cada vez se simplificaba más la recuperación de las fracciones separadas, pronto surgió en la literatura científica una eclosión de trabajos sobre CL preparativa.

Asimismo se fueron produciendo espectaculares avances en CG, referidos fundamentalmente a la tecnología de la columna, detectores y sistemas de inyección directa, que tuvo una singular proyección en análisis de muestras medioambientales y de muestras biológicas complejas.

Hamish Small empleó por primera vez columnas cromatográficas (re llenas de resinas) de intercambio iónico, acopladas a detectores conductimétricos, dando origen a la actualmente conocida cromatografía iónica. Para hacer viable este sistema introdujo las columnas supresoras, inmediatamente detrás de las columnas separadoras, con el objetivo de disminuir, incluso eliminar, los iones presentes en el eluyente.

En este apartado no podemos olvidar los trabajos de Takao Tsuda y Milos Novotny, empleando microcolumnas en CL que aportaron una nueva perspectiva analítica en las separaciones cromatográficas.

Podríamos dedicar a la espectrometría de masas (EM) el mismo preámbulo que antes, ya que P.G. Kistemaker demostró el potencial analítico de esta técnica para compuestos termolábiles y no volátiles, pero su más espectacular desarrollo, en esta década, se va a producir en el análisis de productos naturales y compuestos orgánicos, todo ello gracias a los avances introducidos en la instrumentación y el empleo de los métodos con transformada de Fourier, citados antes. La incorporación de la microsonda de iones, la ionización química y el analizador cuadrupolar en EM, se produce en estos años.

El uso del acoplamiento CG-EM no se detiene, puesto que todos los avances alcanzados en estos años van a permitir también la difusión del tándem CL-EM.

Me atrevería a resaltar, como colofón a la visión histórica de esta década de los setenta, que cuando regresó a la Tierra el Apolo XI con 22 kg de rocas lunares, los más de cien investigadores de todo el mundo que tuvieron el privilegio de estudiarlas, emplearon entre otras técnicas las espectrofotometrías de absorción atómica, de emisión y fluorescencia de rayos X, espectrometría de masas, análisis por activación neutrónica y cromatografía de gases, entre otras. Así está constatado.

Ya de cara al siglo XXI, es fácil percatarse que el progreso de las técnicas analíticas, así como la calidad de las publicaciones son casi insospechados. Hasta hace bien poco años han soplado buenos vientos económicos, que se han traducido en amplia demanda, pues incluso para

análisis rutinarios, se van usando equipos instrumentales en los más variados laboratorios, bien clínicos, farmacológicos, medioambientales y por supuesto de control de calidad industrial. Paralelamente se fueron incrementando las normas de calidad en todos los análisis. Así pues, esta exigencia dió lógicamente sus frutos positivos y los métodos analíticos se fueron haciendo cada vez más rápidos y sensibles. Hablar de especiación o de distribución espacial de los analitos, actualmente es frecuente y hasta imprescindible en muchos casos, al igual que las determinaciones directas en mezclas complejas. Desde hace quince años la química de superficies, la resolución temporal o la combinación de técnicas ya no sorprende a ningún analista moderno. En consecuencia, proliferan publicaciones sobre determinaciones de metales en niveles de concentración de ultratrazas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos son insistentemente analizados, en muestras medioambientales y alimentos, se escudriñan los metabolitos de los fármacos hasta niveles hace pocos años inalcanzables.

¿Cuál ha sido una de las más beneficiosas consecuencias de este desarrollo imparables?. Desde mi punto de vista la mayor transferencia de tecnología e información, así como la estrecha colaboración simbiótica muy beneficiosa, entre la industria, la farmacéutica en grado sumo, y los investigadores. En parte, este hecho singular, tiene muchas causas, pero es indudable que la "revolución de los ordenadores", tanto, los potentes microordenadores como los personales (PC) a precios asequibles, de continuo uso en los laboratorios de análisis ha dado sus frutos, desde el comienzo de los años ochenta.

A medida que avanzaba la década, con los ordenadores personales se abordaban las transformadas de Fourier y el análisis estadístico, gracias a programas comercialmente fáciles de disponer.

Si bien la industria de la telecomunicación fué pionera en el uso de las fibras ópticas, la espectroscopía y la microscopía pronto se beneficiaron de ellas. Otro tanto podríamos decir de la tecnología del *chip* de silicio. Los láseres sintonizables y los filtros sintonizables optoacústicos, permitieron aumentar la exactitud y rapidez para seleccionar la longitud de onda en los espectrofotómetros, así como incrementar la capacidad de realizar determinaciones simultáneas.

La miniaturización y fabricación de equipos portátiles fué posible también gracias al avance de la tecnología del silicio y de los semiconductores. Así pues, en menos de una década los analistas pasaron de hablar de mililitros a nanolitros y los niveles de detección a picomoles, femtomoles y attomoles.

La espectroscopía de infrarrojo cercano (NIR) cada vez va teniendo más importancia como técnica analítica, hasta convertirse en la actualidad en una de las favoritas de los laboratorios de análisis y control de la industria farmacéutica.

A mediados de la década de los ochenta se perfeccionan notablemente las espectroscopías de rayos X de alta sensibilidad y la espectroscopía Auger. Otro tanto puede apuntarse con la

espectroscopía de resonancia magnética nuclear. Finalmente reseñaremos los impresionantes avances surgidos en los equipos instrumentales de microscopía electrónica de barrido.

El año 1986 marcó el final de uno de los más brillantes espectroscopistas de los últimos tiempos, Thomas Hirschfeld, gran estusiasta de las técnicas acopladas, tales como CG-IR, y cómo no, de la espectroscopía Raman e infrarrojo cercano, a lo largo de más de doscientas publicaciones y patentes. Hoy su gloria la comparte el prestigioso premio que lleva su nombre.

Unos años más tarde, en 1993 otro pilar de la ciencia analítica se quebró con la muerte de I. M. Kolthoff, que si bien destacó en todos los campos, la mayor parte de sus más de novecientos artículos, compartidos con sus tres generaciones de discípulos, son de química electroanalítica. El mismo escribió: *"Cuando era estudiante de Farmacia, tuve la suerte de ser alumno de Nicolas Schoorl, quien a su vez fue discípulo de las famosas escuelas de van't Hoff, Schreinemaker y Lobry de Bruin, de Amsterdam"*. C.W. Foulk, que había trabajado en el laboratorio de Ostwald en Leipzig, le visitó en 1924 y según el propio Kolthoff en 1927, él sería responsable de su traslado definitivo a la Universidad de Minnesota. No fue un holandés errante y sí valiente y genial, cuando al poco tiempo de llegar a EE.UU., casi le cuesta el empleo al afirmar: *"No importa lo que enseñes siempre y cuando sepas enseñar"*, aunque, en cierta ocasión, un estudiante malencarado propuso a un tranviario que pagara "billete doble" por haberle dado una clase difícil de asimilar.

Pero sigamos con la electroquímica de estos últimos años. Proseguía pujante el desarrollo de los electrodos selectivos de iones, especialmente buscando las aplicaciones clínicas en la determinación de iones en sangre. Gaston Patriarche, Medalla de Oro, a título póstumo, de la Universidad Complutense de Madrid en 1991, había creado "escuela" en la Facultad de Farmacia de la Universidad Libre de Bruselas, dentro y fuera de Europa, no en vano más de treinta catedráticos consagrados de ocho países habían disfrutado sabáticos en su laboratorio. También impartió docencia en Harvard. Indirectamente él me indujo en 1982 a elegir la lección magistral para mi última oposición. Me honró con su amistad.

Los microelectrodos, desarrollados por Mark Wightman se combinaron con anticuerpos y enzimas para lograr biosensores. Allen Bard y Royce Engstrom los habían asociado, increíblemente a la microscopía electrónica de barrido.

En esta década de los ochenta, una mujer genial, Janet Osteryoung, introduce el detector voltamétrico de onda cuadrada en cromatografía líquida. Poco después nos lo presentó en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid.

Quizás la técnica de más vertiginoso desarrollo en estos últimos años sea la electroforesis capilar, realidad desde 1981, gracias a James Jorgenson. Shigeru Terabe describirá la separación electrocinética micelar en columnas capilares abiertas y Barry Karger, al añadir un gel de

poliacrilamida a la columna capilar fue capaz de separar oligonucleótidos de cadena larga. También se lograron separar electroforéticamente ADN y ARN de cadena larga.

La agencia espacial europea (ESA), lógicamente ha preseleccionado como experimento a desarrollar en un futuro inmediato, las separaciones en microgravedad mediante electroforesis capilar, en sus experimentos espaciales.

En el campo de la cromatografía líquida, debemos destacar la introducción de las fases quirales, merced al empuje de William Pirkle. La industria farmacéutica, nunca estuvo al margen de estas nuevas estrategias, ya que rápidamente se percató de que la separación quiral permitía disminuir la toxicidad y mejorar ostensiblemente la eficacia de los fármacos quirales.

Si bien la cromatografía de fluidos supercríticos puede considerarse que tuvo sus inicios en 1960, es a partir de 1980 cuando alcanza su máximo desarrollo gracias a los trabajos de Steven Hawthorne. Esta técnica logró éxitos importantes al permitir mejorar la recuperación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles en matrices complejas.

La poderosa técnica de la espectrometría de masas avanza desde 1980 tan rápidamente, que apenas los libros de texto pueden seguirla. La combinación EM-EM y diversos métodos de ionización suave han permitido, entre otros objetivos, la secuenciación de péptidos y ADN, los análisis estructurales más insospechados, así como la identificación de especies inestables intermedias en reacciones en fase gaseosa. Por otra parte se deben reseñar los métodos de selección de masas por radiofrecuencia, desarrollados por Alan Marshall, así como la sofisticación alcanzada en los analizadores de tiempo de vuelo. Igualmente destacaremos la asociación ICP-EM, singularmente útil para estudios de especiación. En esta línea de equipos tándem debemos asimismo sentirnos beneficiados por los avances en el acoplamiento de espectrómetros de masas con cromatógrafos de líquidos y equipos de electroforesis capilar.

Los avances en quimiometría especialmente, gracias a las aportaciones de James Callis, Bruce Kowalski y Sarah Rutan, están abriendo horizontes impensables hasta hace pocos años.

Las técnicas automatizadas de secuenciación de ADN tan empleadas actualmente en genética y análisis forenses, así como la potenciación de los métodos inmunoanalíticos, están permitiendo espectaculares logros en bioquímica. Solo desearía resaltar en este apartado los trabajos del premio Nobel, Kary Mullis.

3.3. INSTRUMENTACION ANALITICA EN LOS MUSEOS

Somos herederos de nuestros predecesores, no sólo en la vida sino en la ciencia, por eso deberíamos conocer mejor sus circunstancias. Debo referirme también al necesario estudio de la historia de las ciencias experimentales, por los científicos actuales y también por sus alumnos y discípulos, para conocer y amar el legado instrumental.

Es cierto que el interés por los equipos instrumentales antiguos está en auge, pero las colecciones de instrumentos no deben considerarse sólo como una parte de la Historia de la Ciencia, como material de estudio o de simple exposición museística, casi siempre con visión retrospectiva. Se ha de ahondar también en conocer la actividad cotidiana, de antaño, en los laboratorios de análisis; cómo eran los talleres donde se fabricaban los instrumentos, casi siempre por experimentados artesanos bajo la guía, más o menos distante, del profesor universitario. Me vienen a la imaginación Abbe y las fábricas de Jena. Siempre será aleccionador conocer cuáles fueron las políticas científicas, el comercio de instrumentos, con su burocracia y escasez económica, siempre compañeras, y cómo interpretar el grado de popularidad que pudieron alcanzar los científicos por cumplir con su cometido. Así se podrá incrementar el patrimonio científico español, según se vayan dando los pasos para lograr que los instrumentos antiguos también pasen a formar parte de la ciencia y de la cultura, como documentos especiales de importante información.

Seguro que comprenderemos mejor estas ideas si hicieramos un viaje, al menos en la imaginación, por centros dependientes de universidades o instituciones científicas, como el "Istituto e Museo de Storia de la Scienza" (Florencia), "Palais de la Decouverte" (París), "La Villette" (París), "Musé National de Techniques" (París), "Science Museum" (Londres), "Museum of History of Science" (Oxford), "Whipple Museum" (Cambridge), "Museum of Science and Technology" (Mánchester), "National Maritime Museum" (Greenwich), "Deutsches Museum" (Munich), "Teylers Museum" (Haarlem), "Booerhave Museum" (Leyden), "National Museum of Science and Technology" (Ottawa), "National Museum of American History" (Washington) y un largo etcétera, sin olvidar el "Museo de la Farmacia Hispana" de Madrid. Allí será más fácil comprender la presencia de los bellos y, más o menos sofisticados instrumentos científicos que a lo largo de los años, al haber quedado obsoletos, han ido enriqueciendo el patrimonio científico y artístico.

En nuestra Facultad de Farmacia de la UCM se dispone de un abundante conjunto de aparatos procedentes del Colegio de San Fernando o de otros Colegios de Farmacia de España (primer tercio del siglo XIX) que completan los procedentes de la propia facultad (finales del siglo XIX y XX).

Muchos tienen su origen en la cátedra de **Técnica Física**, otros proceden del laboratorio de Rodríguez Carracido; todos ellos han contribuido a engrandecer la Farmacia y el museo fundado por Folch Andreu, ennoblecido gracias al esfuerzo tesonero de Folch Jou.

Entre los equipos instrumentales más llamativos, o que destacan por su originalidad, usados por los farmacéuticos y que pueden verse en el "Museo de la Farmacia Hispana", mencionaremos diez microscopios; los más interesantes son uno de madera del siglo XVIII, otro muy similar de metal de principios del siglo XIX y un tercero de metal, que aunque incompleto,

está catalogado como de finales del siglo XVIII o principios del XIX. También poseen extraordinario valor histórico los sacarímetros de Soleil, polarímetros de Laurent, espectroscopios de Bunsen-Kirchoff, un goniómetro de Groth-Picart, un colorímetro de Duboscq, prismas ópticos, fuentes de rayos X, ultravioletas y visibles, así como un magnífico banco óptico, equipos eléctricos varios y diversas cajas de resistencia de palanca y manivela.

No debe olvidarse la presencia de otros aparatos científicos tales como cubas de mercurio, areómetros de Nicholson, Baumé y Pâquet, volumenómetros de Regnault, máquinas neumáticas, congeladores, higrómetros, eudiómetros, etc.

En este apartado no mencionaré las numerosas balanzas, de todo tipo, procedencia y edad, de indudable valor museístico, y que me atrevería a definir como auténticas joyas.

De los instrumentos científicos procedentes del laboratorio de Carracido, destacaré un puente de Wheastone, un medidor de radiactividad, una fuente de arco, diversos espectroscopios y colorímetros, etc.

Desearía plasmar en estas líneas no sólo la belleza estética de los instrumentos científicos arcaicos, sino también, la faceta educadora que dimana del estudio de la evolución lógica, desde aquellos "viejos" aparatos hasta los sofisticados y automatizados actuales.

Hace relativamente pocos años, cuando hubo el primer tímido intento de poner en marcha la especialidad farmacéutica no estrictamente hospitalaria de **Análisis y Control de Medicamentos y Drogas**, al amparo del R.D.2708/82, traté de argumentar mi presencia en la Comisión Promotora presentando mi *curriculum vitae*, en que subrayé, lógicamente con "rotulador fluorescente" (una de mis debilidades), qué aportaciones no eran analíticas. Hay muy pocas. Con ello deseo ratificar esta vocación específica. Pero a ella debo sumar dos aficiones, la Historia en general y los Museos de la Ciencia en particular.

Así pues me dispensareis que hable con pasión de los instrumentos científicos antiguos, con lo que de ingenio y belleza encierran.

Podemos echar a volar la imaginación también por los talleres de soplado de vidrio, seguro que pequeños e incómodos, así como por los de los fabricantes de instrumentos de los siglos XVIII y XIX, que hicieron cambiar el curso de la Humanidad. Por un momento dejaré en el olvido la Náutica y la Astronomía, para centrarme de nuevo en mis disciplinas.

El pasado septiembre, a la vuelta de un congreso de espectrofluorimetría, en Cambridge (Stokes flotaba en el ambiente), decidí como siempre que voy a Londres, volver a dedicar un día al "Science Museum", que hace feliz a cuatro millones de visitantes anuales, de la mano de la ciencia y la tecnología. Todas las áreas están representadas; destacaré la Física, Química, Medicina y Farmacia y más concretamente sus laboratorios y lógicamente su inseparable biblioteca.

4. METODOS LUMINISCENTES

4.1. ANTECEDENTES HISTORICOS

Los procesos de fotoluminiscencia molecular consisten fundamentalmente en la emisión de radiaciones electromagnéticas por moléculas electrónicamente excitadas. La existencia de moléculas en estado excitado implica una absorción previa de energía o bien que dichas moléculas, se generen en el curso de una reacción química, en cuyo caso el proceso se denomina "quimioluminiscencia". Cuando las reacciones quimioluminiscentes tienen lugar en los organismos vivos, entonces se adopta la denominación de "bioluminiscencia". En el resto de los procesos luminiscentes, es obvio que también se requiere una absorción de energía previa a la emisión. Su clasificación y denominación depende de la naturaleza de la fuente de energía excitadora, así "fotoluminiscencia", en general alude a radiaciones electromagnéticas, generalmente ultravioletas o visibles, "radioluminiscencia" a radiaciones más energéticas, por tanto de muy corta longitud de onda, por ejemplo rayos X, "triboluminiscencia" cuando la emisión luminosa acaece tras la aplicación de energía mecánica, fricción o pulverización, "electroluminiscencia" si está implicada la energía asociada a campos eléctricos o magnéticos, "sonoluminiscencia" cuando la excitación es por ondas sonoras, "catodoluminiscencia" emisión tras bombardeo con electrones acelerados, "termoluminiscencia" por acción de la energía calorífica, etc.

Trataré de centrar la atención en los procesos de fotoluminiscencia molecular (fluorescencia y fosforescencia), en análisis farmacéutico, en el contexto de la evolución de la **Química** y del **Análisis Instrumental** de manera que veamos la trayectoria seguida por dicho conjunto de técnicas espectroscópicas.

No llego a alcanzar qué tipo de energía excitadora podríamos imaginarnos, para poder explicar las poéticas primeras palabras del Génesis: *"Entonces dijo Dios: -Haya luz-, y hubo luz"*.

Quisiera comenzar haciendo algunas reflexiones, desde una perspectiva histórica, sobre los fenómenos luminiscentes, que han dado origen a un elegante y poderoso conjunto de técnicas instrumentales, como son las espectrofotometrías de fluorescencia molecular y de fosforescencia.

En la más remota antigüedad seguro que llamaron poderosamente la atención del hombre la luz de los relámpagos, las auroras boreales y como no, la existencia de seres vivos que en determinadas circunstancias emitían luz, como las luciérnagas o los infusorios de algunas regiones marinas, no olvidando a ciertas algas y hongos que hoy sabemos producen

luminiscencia. Sin duda, fueron observados algunos fenómenos, actualmente interpretados como bioluminiscentes.

Cuando Aristóteles, en su **Historia de los animales**, habla de lampiridas, es probable que se refiriese a los coleópteros cantaroides. Su discípulo Teofrasto, en el **Tratado de las piedras**, cita un carbúnculo luminoso que expuesto a la luz solar brilla profusamente.

Algunos siglos después Plinio "el Viejo" escribía, más poética que científicamente, que las piedras preciosas habían robado la luz a los astros, o que ciertos minerales tenían en su interior una llama "visible" en la oscuridad de la noche. Este autor también describe insectos capaces de emitir luz, que poseen un líquido que conserva esta característica, incluso después de haber sido extraído del animal. El poeta Aeliano, al describir las joyas de las mujeres de Tarento, también da su "brillante" opinión sobre este tipo de fenómenos.

Hubo muchas fábulas y leyendas del lejano y próximo Oriente sobre joyas maravillosas, que luego llegaron a la Europa Medieval. Los fenómenos fosforescentes fueron entonces quizá mejor interpretados en las piedras preciosas, aunque siempre con una visión muy literaria. Cellini fue probablemente el más agudo y sorprendido observador de la fosforescencia de ciertas gemas de una joyería de Ragusa. Ciertamente, debemos siempre plantearnos la pregunta de si estos observadores "precientíficos" interpretaban, en algún sentido, los fenómenos luminiscentes o solo dejaban volar su imaginación. Lo que sí queda patente es que incluso antes de la Edad Media se habían descrito algunas propiedades fotoluminiscentes de diversos minerales. Sin embargo, para observar estos fenómenos se requerían ciertos artificios; la fluorescencia, en el concepto científico que hoy se tiene, no podía ser conocida como tal.

Actualmente resulta fácil asegurar que algunos tipos de diamante y fluorita son luminiscentes, especialmente la variedad denominada clorofana, la cual muestra emisión verde tras haber sido expuesta a la luz ultravioleta. Se debe tener presente que hasta hace relativamente pocos años, no se dispuso de adecuadas fuentes artificiales de luz capaces de excitar a las muestras que luego emitirán fosforescencia. En la antigüedad, para observar estos fenómenos, los cristales tras ser expuestos a la luz solar debían ser inmediatamente introducidos en la oscuridad.

Probablemente, los fenómenos luminiscentes más fácilmente observados antaño en los minerales, fueron los de triboluminiscencia de algunos tipos de diamante, calcita y fluorita. Para ello debían ser aplastados, comprimidos o al menos friccionada drásticamente su superficie. Más difícil sería observar hace siglos la termoluminiscencia del diamante o de la fluorita.

Hoy día está perfectamente estudiada la emisión luminiscente de más de quinientos minerales. No solo hemos de fijarnos en piedras preciosas, tales como diamantes, rubíes, zafiros o granates (tan inmersos en la materia farmacéutica mineral de hace pocos siglos), sino también en otros más vulgares como la pesada baritina o nuestro simpár aragonito.

La historia del descubrimiento de la fosforescencia, hay que buscarla en 1603, con Vincenzo Casciarola, zapatero de Bolonia con aficción de alquimista, que en sus ratos libres recolectaba algunas "piedras pesadas", baratina sin duda, por los alrededores de su ciudad. Una vez en casa las calentó en el horno, con el ánimo de obtener oro o al menos plata. Su desilusión sería mayúscula, pero sí se percató de la capacidad que poseía la "petra luminifera" o "piedra de Bolonia" (sulfato bórico, probablemente con trazas de bismuto o manganeso, el cual calcinado en presencia de carbón como reductor produciría así monosulfuro de bario) para emitir una luz rojiza, durante un tiempo considerable. También se la designó como lucifer, esponja luminosa, etc.. Todos estos nombres son muy pintorescos y propios de la alquimia.

Esta emisión de luz llamó la atención de los científicos, así Galileo quedó tan fascinado por estos hechos que hizo una demostración en la Academia Lincei y envió muestras de estos minerales, a diversos centros europeos de prestigio. Lagalla, en 1612, describe en su libro de filosofía **De phenomenis in orbe lunae** las emisiones luminosas del "lapis solaris". Años más tarde, en 1640, Liceti, publica una monografía completa sobre los fenómenos observados en minerales, "lithephorous", capaces de emitir luz. El duque Leopoldo de Toscana, también aporta una bella descripción del fenómeno, indicando que la luz es concebida en el mineral y que la devuelve, al cabo de un cierto tiempo, como si de un parto se tratase.

Sin embargo, ya a mediados del siglo XVII se le llamó "phosphor" (que en griego significa portador de luz). Peter Poterius, en 1625, construyó figuritas de animales con materiales fosforescentes, sencillamente porque le resultaba agradable verlos lucir por la noche. De todas formas no debemos sonreirnos de aquellas gentes, que por vez primera observaban un fenómeno tan curioso como aquel, o que con mentalidad romántica suponían que la luna devolvía por la noche la luz que le fué prestada por el sol durante el día, aunque tuvieron que pasar dos siglos y medio para acertar a explicar científicamente el fenómeno de la fosforescencia.

Debido a lo inusual, y al mismo tiempo bello fenómeno observado, se suscita la atención, tanto de gentes vulgares como de científicos de la época, muchos de ellos de gran predicamento. Por ello no es de extrañar que algunos físicos, como Grimaldi, Boyle o Newton, dedicaran algún tiempo al estudio de la luminiscencia de soluciones y medios fluidos en general, para tratar de comprender estos fenómenos, aunque siempre interpretaban el proceso como reflexión o transmisión de la luz. Todavía no se percataban de la absorción y posterior emisión.

En 1663 Robert Boyle describió "de adamantis tenebris lucente", el diamante que tras ser frotado y calentado emite luz en la oscuridad. El descubrimiento del elemento fósforo (P) también parece ser que tiene un cierto aire alquimista. Brandt, buscando la "piedra filosofal" lo obtuvo de la orina. En 1769 Scheele y Gahn lo pudieron obtener en mayores cantidades. Ahora bien, este fósforo es quimioluminiscente, pues emite luz al ser oxidado al aire (recordemos los

fuegos fátuos). Unos años más tarde, en 1793, Homberg, describe por primera vez como el cloruro cálcico es capaz de emitir luz al recibir energía mecánica (triboluminiscencia).

Los estudios luminiscentes de Biot y Becquerel, en 1839, permitieron completar los datos del siglo anterior. Edward Becquerel fue sin duda quién realmente hizo el primer estudio científico de la fosforescencia, determinando la longitud de onda de las radiaciones excitadora y emitida, el tiempo de duración de la emisión y la influencia de la temperatura. Estudió la luminiscencia de sales de uranilo, fluorita, calcita, rubí, diamante, etc. El primer equipo instrumental para determinar la duración de la emisión fosforescente, tras suprimirse la excitación, fue el fosforoscopio diseñado en 1859 por Becquerel, al estudiar la fosforescencia de compuestos de uranio. En 1861, establece la ley exponencial que rige la caída de la intensidad de la emisión fosforescente. Estos estudios permitieron a Verneuil y Lenard, a finales del siglo XIX, establecer los "minerales fósforo", entre ellos ciertos óxidos, carbonatos, sulfuros y seleniuros, que deben su luminiscencia a la presencia de trazas de Mn, Cu o Ag. Sus contemporáneos Crooks y Goldstein fueron los pioneros en los estudios sobre la luminiscencia producida por rayos catódicos.

La interpretación, más o menos científica, de los citados fenómenos luminiscentes, fue relativamente fácil en comparación con la de la fluorescencia, pues esta emisión es casi instantánea (10^{-7} - 10^{-9} s), cesando prácticamente al suprimirse la radiación excitadora. Es fácil entender las dificultades instrumentales para disponer de medios capaces de distinguir independientemente la longitud de onda de la radiación excitadora de la emitida por fluorescencia y también el tiempo de vida de fluorescencia.

Según nuestro contemporáneo el Prof. George G. Guilbault, de la Universidad de Luisiana, uno de los grandes expertos en las técnicas de luminiscencia, se puede afirmar que ello no fué obstáculo para que la fluorescencia fuera observada antes que la fosforescencia por el botánico sevillano Nicolás Monardes, en 1574, al describir el "lignum nephriticum" en su obra **Primera y Segunda y Tercera partes de la historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en Medicina**. Se había percatado de la luz que se emitía al interponerlo en agua.

El leño nefrítico procede de la leguminosa *Pithecolobium unguis-cati* o *Guindalina moringa*. El apelativo nefrítico alude al uso, que en Méjico se hacía para disolver los cálculos renales. La nobleza europea se hizo fabricar cálices de madera de leño nefrítico, en los que bebían un agua con tintes azulados para evitar la litiasis. Así aparecen los aristócratas bellamente representados, copa de madera plebeya en mano, en muchas célebres pinacotecas centroeuropeas. Hoy en día está descartada esta actividad terapéutica, aunque parece que sí posee acción diurética y sudorífica. En las más distinguidas boticas del Viejo Mundo este leño, se presentaba en trozos privados de la corteza, de color rojizo, con paquetes de fibras

intercaladas con otros de color más claro, olor ligero, pero aromático por la calefacción y sabor muy ligeramente acre. Su infusión de color amarillo dorado, con el tiempo se torna oscura, mientras que mirada lateralmente es azul verdosa. La adición de ácidos hace desaparecer dicho fenómeno, pero si se neutraliza con álcalis, parece ser que, se refuerza dicho efecto.

Otros científicos también se percataron de la emisión fluorescente. No solo Boyle y Newton, sino también Hook, Herschel, e incluso Brewster, ya en el siglo XIX, eran de la opinión que el fenómeno por ellos observado consistía en una dispersión de la radiación inicial, designándole con nombres tan curiosos como "dispersión interna" o "dispersión epipólica". La principal dificultad para analizar y entender el proceso fluorescente residía en observar la radiación secundaria emitida y distinguirla de la excitadora primaria, mientras estaba siendo atravesada la muestra problema.

Brewster comunicó en 1833 a la Royal Society de Edimburgo el nuevo fenómeno por él descubierto y denominado "dispersión interna" que se producía en una solución verde de clorofila, obtenida a partir de hojas frescas, tras la irradiación y focalización, mediante un sistema de lentes, de la luz solar. Aparecía un cono rojo de luz emitida dentro de la solución verdosa, como consecuencia del paso de la luz incidente. Pensó que el color rojo observado era debido a partículas en suspensión.

En Inglaterra, el físico y matemático irlandés, Sir George G. Stokes (1819-1903), destacado profesor de Cambridge, en el Pembroke College, donde impartió su positiva docencia durante más de medio siglo, observando en su laboratorio, en una variedad de fluorita verde, la diferencia de color e intensidad de la luz incidente y "reflejada" al ser atravesado el mineral, llegó al convencimiento de que la absorción y reflexión "selectivas" no justificaban los cambios experimentados por la radiación emergente. Stokes había tenido muy presentes los trabajos de Haüy y Brewster.

Así, en su obra **On the Change of Refrangibility of Light**, publicada en Cambridge en 1852, dice que está decidido a acuñar una nueva palabra: FLUORESCENCIA, etimológicamente procedente de la fluorita o espató flúor, de forma análoga a la ya existente, opalescencia, para describir los fenómenos ópticos que se producen en el ópalo. Hoy día se considera que Stokes fué el primero en proponer la utilización de la fluorescencia con fines analíticos, allá en 1854, cuando estableció la relación existente entre la intensidad de la fluorescencia y la concentración de soluto, en disoluciones de sulfato de quinina. De esta forma surgió la **ley de Stokes**, según la cual la luz absorbida en la región ultravioleta o violeta del espectroelectromagnético, se emite en el azul o en el rojo, es decir a longitud de onda más larga, constituyendo su diferencia lo que se denomina **desplazamiento de Stokes**. Esta ley fue discutida durante varias décadas, y hubo que esperar a que Einstein, en 1917, diferenciara la emisión espontánea y la emisión estimulada, para ratificarla.

La gloria de la interpretación física fue para Stokes, pero no se debe restar mérito a Brewster (1833) o a Herschel (1845), cuando al observar el fenómeno lo consideraban como una dispersión interna, o a Monardes cuando por vez primera lo describió.

En las últimas décadas del siglo XIX se hizo cada vez más patente su utilidad como técnica analítica. En 1867, Goppelsröder propone el término "fluoreszenzanalyse" para la fluorimetría (espectroscopía de fluorescencia molecular).

En este año Berthelot sintetiza el fluoreno. Intimamente ligado con todos estos avances, también está la síntesis efectuada por Baeyer, en 1871, de un compuesto orgánico tan fluorescente que se le denominó fluoresceína. En 1877 se llevó a cabo una curiosa experiencia para demostrar la conexión subterránea entre el Danubio y el Rin. Se arrojaron en la cabecera del Danubio 10 kg de fluoresceína y setenta horas más tarde se pudo observar la característica fluorescencia de este compuesto en un riachuelo que aparentemente no tenía conexión con el Danubio, pero que vierte sus aguas al lago Constanza y, por tanto, al Rin. Así quedó demostrada inequívocamente que dos de los más importantes ríos europeos estaban unidos. Walter en 1888 estudió la amortiguación de la fluorescencia, por efecto de concentración, en las soluciones de fluoresceína. Nicols y Merrit, observaron en 1907, en soluciones de eosina, la simetría existente entre el espectro de absorción y el de fluorescencia. En 1910, Lyve y Engelhardt determinaron los rendimientos cuánticos de fluorescencia de diversos derivados del benceno, valores a los cuales aún se hacía referencia hasta hace pocos años. La fluorimetría también contribuyó indirectamente al descubrimiento de los rayos X y de la radioactividad.

La catodoluminiscencia permitió a Crooks (1883) y Boisbaudran (1885) descubrir y separar las tierras raras.

Wiedemann, en 1887, detalló la emisión fosforescente de diversos colorantes, anilinas, interpuestos en gelatina y James Dewar, en 1894, describe la fosforescencia de soluciones sobreenfriadas de compuestos orgánicos.

En 1895, también Wiedemann describió la luminiscencia del vapor de antraceno, y en 1910 Goldstein, continuó con el estudio de la emisión producida por compuestos aromáticos congelados.

A lo largo del siglo actual se han ido sucediendo "brillantes" descubrimientos debidos a otros científicos. No obstante, hubo de esperarse hasta 1935, cuando el polaco Jablonskii, propuso su famoso diagrama, aportando una más adecuada interpretación física de los fenómenos luminiscentes de fluorescencia y fosforescencia. El diagrama electrónico propuesto por él es actualmente la base de la interpretación de estos fenómenos, llevando en su honor, su nombre. Gracias a Jablonskii se puede aceptar que la fluorescencia y la fosforescencia, son dos procesos que coexisten y que además son competitivos entre sí. Durante siglos, los fenómenos luminescentes se entremezclaron y confundieron, sólo a partir del siglo pasado se consideran

independientes y obviamente sus aplicaciones analíticas, que si bien no son excluyentes en muchas ocasiones, se presentan generalmente en apartados diferentes.

Asimismo deben ser citadas las importantes aportaciones científicas realizadas en estos campos por Kautsky, Tiede, Lewis y Kasha, sin olvidar a Stern, Volmer, Vavilov, Kavanagh, Levshin, Gaviola y Perrin.

Desde las últimas décadas del siglo XIX, todas las técnicas luminiscentes comienzan a jugar un papel cada vez más importante en el análisis químico y, por supuesto, en el farmacéutico. Se puede afirmar que desde finales del siglo XIX y hasta los años 80 de éste, el devenir de las técnicas analíticas basadas en los fenómenos de luminiscencia, ha llevado rumbos muy dispares, ya que mientras la fluorimetría va a experimentar un espectacular desarrollo, por sus interesantes aplicaciones, sin embargo la fosforimetría, al deberse operar en condiciones especiales (normalmente en medios rígidos o soluciones vitrificadas a 77 K), quedó algo relegada, hasta su posterior expansión hace quince años. Actualmente una nueva era está surgiendo para las espectrometrías de luminiscencia, una vez sentadas las bases que explican los fenómenos implicados, establecida una terminología científica clara y aceptado, con algunas modificaciones complementarias, el diagrama de Jablonskii, con el apoyo de las teorías mecánico-cuánticas. Así pues, se dispone de unas utilísimas herramientas de trabajo, en muy diversos campos científicos, que han permitido el vertiginoso desarrollo de estas técnicas analíticas.

En las últimas tres décadas la espectroscopía de luminiscencia molecular, en dos de sus vertientes, tanto fluorimetría como fosforimetría, han pasado de ser rudimentarios métodos de trabajo, a importantes técnicas instrumentales utilizadas en el análisis y cuantificación, tanto de compuestos orgánicos como inorgánicos. Poco a poco han ido ganando terreno a las técnicas absorciométricas UV-VIS, utilizadas con anterioridad, y en los últimos años han logrado alcanzar gran notoriedad analítica. Esto ha sido posible gracias a las singulares características de sensibilidad y selectividad de estas técnicas, así como al elevado desarrollo integral alcanzado, que ha permitido la automatización de las mismas. Asimismo, con la reciente asociación de los modernos espectrofotómetros de luminiscencia, como detectores en cromatografía líquida de alta eficacia, su interés analítico se ha intensificado.

Finalmente debe destacarse que, en la actualidad los métodos fluoroimmunoanalíticos (FIA) aportan mayor sensibilidad que los radioimmunoanalíticos (RIA), con la ventaja añadida de no tener que operar con isótopos radiactivos, y por lo tanto sin el problema asociado que a veces representa su uso, tanto desde el punto de vista medioambiental como de seguridad en el laboratorio.

Una última faceta de gran importancia en la técnicas fluorimétricas, lo constituye la posibilidad de cinematografiar *in vivo* células marcadas y captar, por tanto, a escala de tiempo real las modificaciones que se producen.

4.2. ESPECTROSCOPIA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR

4.2.1. Fundamento

Al incidir radiaciones electromagnéticas de longitud de onda adecuada sobre las moléculas orgánicas, se puede producir una absorción de energía que origina una transición desde el estado electrónico fundamental hasta un estado electrónico excitado, generalmente el primero. Si bien en una solución a temperatura ambiente, la mayor parte de las moléculas suelen encontrarse en su nivel vibracional fundamental, tras la excitación radiante, pueden pasar a un nivel vibracional más elevado del primer estado electrónico excitado.

Los estados excitados son inestables; por tanto, existe en las moléculas una tendencia a retornar al estado electrónico fundamental.

La molécula, para perder el exceso de energía absorbida y volver al estado de mínima energía y por tanto el más estable, tiene varias posibilidades:

- a) **Desactivación no radiante:** pérdida del exceso de energía por colisiones con las moléculas de solvente que la rodean, disipación en forma de calor, etc.
- b) **Fluorescencia:** emisión de un fotón, sin cambio en la multiplicidad del espín.
- c) **Fosforescencia:** emisión de un fotón, acompañado de un cambio en la multiplicidad del espín.

Podríamos considerar que la emisión fluorescente resulta ser el proceso opuesto al de absorción. No obstante, tras comparar los aspectos de ambos procesos correspondientes a una misma molécula, observamos que no se superponen, sino que resultan más bien imágenes especulares, encontrándose el espectro de fluorescencia desplazado hacia longitudes de onda más largas.

La intensidad de la absorción está determinada por el grado de solapamiento de la función de onda del nivel vibracional más bajo del estado fundamental y las funciones de onda de los niveles vibracionales del primer estado singulete excitado.

Las radiaciones fluorescentes emitidas por los compuestos orgánicos suelen estar comprendidas en el intervalo de 300 a 650 nm. El mayor interés radica en las moléculas aromáticas y transiciones en las cuales se hallan implicados electrones π . Los procesos de absorción y emisión que tienen lugar, cuando una de estas moléculas adquiere una energía de

excitación adecuada, puede ser representada fácilmente mediante el diagrama de Jablonskii. Por S designaremos los estados singulete y por T los estados triplete. Cada nivel electrónico está constituido por diversos niveles vibracionales y rotacionales.

Cuando un fotón, con energía adecuada, es absorbido por la molécula, se promociona un electrón desde el nivel vibracional más bajo del estado singulete fundamental a cualquier nivel vibracional del primer estado singulete excitado. El tiempo transcurrido en la absorción de ese fotón es del orden de 10^{-15} s. Desde el primer estado singulete excitado existen dos opciones para retornar al estado singulete fundamental, devolviendo el exceso de energía: emitir un fotón desde el mismo nivel vibracional que se alcanzó al ser excitada la molécula, lo cual sólo resulta posible en gases a muy baja presión; o bien, si las moléculas se encuentran en disolución, pierden rápidamente el exceso de energía vibracional por transferencia a las moléculas del solvente. Así pues, la molécula ha retornado al nivel más bajo posible de energía vibracional, dentro del primer estado singulete excitado. Este proceso se denomina **relajación vibracional**, realizándose en un tiempo que oscila entre 10^{-11} y 10^{-13} segundos.

Si la molécula se encontrase en un estado electrónico superior al primero, es necesario un proceso previo de **conversión interna**, según el cual se pasa desde el nivel vibracional inferior del segundo estado electrónico excitado a un nivel vibracional elevado, ya dentro del primer estado electrónico excitado. Tras la conversión interna, la molécula pierde por relajación vibracional el exceso de energía, colisionando con las moléculas vecinas de solvente, retornando al nivel más bajo posible de energía vibracional del primer estado singulete excitado.

A partir de este estado, al cual se ha llegado, bien por relajación vibracional, o bien por conversión interna seguida de relajación vibracional, puede emitirse fluorescencia. La molécula, en estado singulete excitado, posee propiedades físicas y químicas bastante distintas a las que tiene la misma molécula en estado singulete fundamental, llegando en algunos casos a reaccionar de modo distinto.

Si centramos ahora nuestra atención en la molécula en el estado vibracional más bajo del primer singulete excitado, tiene varias posibilidades de retornar al estado fundamental:

1.- Emitiendo un fotón cuya longitud de onda de emisión es superior a la de excitación (ley de Stokes). Este proceso es la **fluorescencia**.

2.- También es posible un proceso de emisión no radiante. La desactivación de un estado electrónico excitado, generalmente implica una interacción y transferencia de energía entre la molécula excitada y el medio circundante, es decir, tanto con el solvente como con los otros solutos presentes en la disolución. Este conjunto de procesos suele denominarse **conversiones externas**, que frecuentemente encontramos al observar cómo se ve afectada la señal de fluorescencia, bien por efecto del solvente o bien cuando la modificación de las propiedades fisicoquímicas del medio (elevada viscosidad y/o baja temperatura) reduce el número de

colisiones entre las moléculas, lo cual generalmente ocasiona un incremento de la señal de fluorescencia.

3.- Hemos de tener en cuenta, en tercer lugar, los fenómenos de **predisociación** y **disociación**. El primero de ellos puede originarse tras una conversión interna, lo cual motiva una transición desde un estado electrónico superior hasta el nivel vibracional más alto de un estado electrónico inferior, en el que la energía vibracional cedida es lo suficientemente grande como para provocar la rotura de un enlace. En las moléculas orgánicas, al poseer un gran número de enlaces, la probabilidad de que existan enlaces con energía de enlace inferior a la energía de excitación electrónica de los cromóforos, es apreciable. Así pues, cabe la posibilidad de la ruptura de dichos enlaces tras la absorción de energía radiante por el cromóforo, seguida de una conversión interna de la energía electrónica, en energía vibracional asociada con un enlace poco energético.

En la disociación, la radiación absorbida provoca la excitación del electrón de un cromóforo, ocasionando la ruptura del enlace. No hay, pues, conversión interna. Obviamente, el proceso de disociación está en competencia con el de fluorescencia.

4.- A través de un estado triplete excitado, mediante un **cruce entre sistemas** ($S_1^* \rightarrow T_1^*$) en el cual los electrones desapareados cambian sus spines, tornándose paralelos, lo cual conlleva cambio de multiplicidad. Este hecho va a constituir el principio de la **emisión fosforescente**, con la cual compiten también otras transiciones no radiantes, al igual que en el caso de la fluorescencia. Así pues, pueden diferenciarse los procesos de emisión por fluorescencia o por fosforescencia, debido a que sus tiempos de duración son distintos: de 10^{-9} a 10^{-6} s para la primera y de 10^{-4} a 10^2 s para la segunda, mientras que la excitación solo precisó 10^{-15} s. Por tanto, la vida del estado triplete excitado es mayor que la del estado singulete excitado. Estos detalles son necesarios para diferenciar dichos fenómenos luminiscentes. En el plano práctico, la fosforescencia se ve favorecida por las bajas temperaturas, con lo que es posible retardar el paso de T_1^* a S_0 .

Así pues, tras la absorción de una radiación adecuada, sabemos que las moléculas pueden reemitir energía en forma de fluorescencia. La probabilidad de que se produzca una emisión espontánea desde un estado excitado, es directamente proporcional a la probabilidad de la absorción correspondiente. Por tanto, la probabilidad de que se produzca emisión, o probabilidad por unidad de tiempo, k_F , está en relación con la transición de un electrón desde el estado excitado al fundamental, lo cual puede deducirse a partir del espectro de absorción en función de que la longitud de onda característica del espectro de emisión sea conocida y se pueda establecer una relación de imagen especular, como dijimos antes, entre los espectros de absorción y emisión.

Si k_F es la probabilidad por unidad de tiempo de que el electrón retorne al estado fundamental, entonces, el intervalo medio que el electrón permanece en el estado excitado resultará igual al recíproco de k_F . Este tiempo ideal es conocido como **tiempo natural de vida de fluorescencia** (tiempo de vida intrínseco del estado excitado o tiempo natural de fluorescencia) que se representa por τ_0 , significando el tiempo de vida invertido si la emisión fluorescente fuera la única vía de retornar al estado fundamental, es decir en ausencia de cualquier otro proceso de desactivación.

Por tanto:

$$\tau_0 = \frac{1}{k_F} \quad (Ec.1)$$

Sin embargo, si no se tienen dichas condiciones ideales, se hablará de τ que es el **tiempo de vida de fluorescencia**, teniendo en cuenta los procesos que compiten con ella. Así pues:

$$\tau = \frac{1}{k} = \frac{1}{k_F + k_N} = \frac{1}{k_F + k_I + k_T + k_E[c] + k_{PD} + k_D} \quad (Ec.2)$$

donde se engloban en el denominador las constantes de velocidad de los diferentes procesos de desactivación, siendo k_F la constante de velocidad del proceso de emisión fluorescente y k_N es la suma de los parámetros no radiantes, esto es, conversión interna k_I , cruce entre sistemas k_T , conversión externa k_E (teniendo en cuenta la concentración de la molécula aceptora $[c]$, predisiociación k_{PD} y disociación k_D . Entonces la probabilidad total por unidad de tiempo para la transición $S_1^* \rightarrow S_0$ será $k_F + k_N$. Así pues, el tiempo de vida de fluorescencia vendrá dado por:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_N} \quad (Ec.3)$$

Al cesar la excitación, la intensidad de la fluorescencia decae exponencialmente con el tiempo, de acuerdo con la siguiente expresión:

$$F_t = F_0 e^{-(k_F + k_N)t} \quad (Ec.4)$$

por tanto:

$$\frac{F_t}{F_0} = e^{-\frac{t}{\tau}} = e^{-(k_F + k_N)t} \quad (Ec.5)$$

donde F_0 representa la intensidad inicial de la radiación fluorescente a un tiempo cero, tomado arbitrariamente y F_t es la intensidad al cabo de un tiempo t .

Así pues, la cuantificación del decrecimiento de la intensidad de fluorescencia con el tiempo, tras la excitación mediante un **pulso temporal** δ , representa el tiempo de vida de fluorescencia.

El **rendimiento cuántico de fluorescencia**, ϕ_F viene definido por el cociente entre el número de fotones emitidos por fluorescencia y el número de fotones absorbidos por la molécula, y se puede expresar como:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_N} = \frac{\tau}{\tau_0} \quad (Ec.6)$$

Así pues, en el caso ideal en que k_N fuera igual a cero, ϕ_F sería la unidad y entonces $\tau = \tau_0$.

La medida de ϕ_F y τ constituye el mejor modo de obtener información sobre los procesos de fluorescencia en moléculas orgánicas.

Un tratamiento teórico similar, aunque más complejo, permitirá determinar el rendimiento cuántico de fosforescencia ϕ_{fos} .

4.2.2. Amortiguación de la fluorescencia (*quenching*)

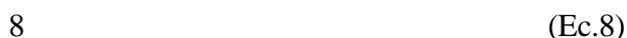
Cuando la molécula fluorescente (M) se encuentra en presencia de determinadas moléculas, es posible que la señal de fluorescencia que muestre sea inferior a la que presenta en ausencia de las mismas.

La presencia de estas moléculas ajenas provoca un fenómeno de amortiguación de la fluorescencia, debiendo eliminarse previamente la posibilidad de disminución de la señal de fluorescencia por efecto de filtro interno o autoabsorción.

En ausencia de moléculas amortiguadoras (A) al excitarse las moléculas fluorescentes (M) se verifica:



proceso equilibrado con la emisión fluorescente (Ec.8) y desactivaciones no radiantes (Ec.9).



La amortiguación de fluorescencia puede ser de varios tipos. Citaremos la colisional, la estática y la de Förster.

Amortiguación colisional. La interacción del amortiguador con la molécula excitada se produce después de haber experimentado la relajación vibracional ($V=0$ de S_1^*).

En presencia de un amortiguador (A), algunas moléculas excitadas (M^*) pueden reaccionar con él antes de emitir fluorescencia. La acción de A se traduce en una disminución de la señal de fluorescencia.

Se podrá establecer una relación entre la señal de fluorescencia y la concentración del amortiguador.

Consideremos que tan solo se produce una interacción (colisión) bimolecular entre M^* y A. La velocidad de formación de moléculas excitadas (M^*) por el proceso de la Ec.7 es constante, ya que la intensidad de la radiación excitadora lo es.

En ausencia de A, la velocidad total de desaparición de M^* en los procesos de las ecuaciones 8 y 9, que están en competencia entre sí, será:

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = [M^*](k_F + k_N) \quad 10 \quad (\text{Ec.10})$$

El tiempo de vida de fluorescencia de M^* es:

$$\tau = \frac{1}{k_F + k_N} \quad 11 \quad (\text{Ec.3})$$

y el rendimiento cuántico de fluorescencia es:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_N} \quad 12 \quad (\text{Ec.6})$$

En presencia del amortiguador A el proceso de fluorescencia también estará en competencia con los posibles siguientes procesos:



así como con el proceso de la Ec. 9.

Entonces la velocidad total de desaparición de M^* será:

$$-\frac{d[M^*]}{dt} = [M^*](k_F + k_N + k_A[A]) \quad 15 \quad (\text{Ec.13})$$

y el tiempo de vida:

$$\tau' = \frac{1}{k_F + k_N + k_A[A]} \quad 16 \quad (\text{Ec.14})$$

Entonces el rendimiento cuántico de fluorescencia vendrá expresado por:

$$\phi_{F'} = \frac{k_F}{k_F + k_N + k_A[A]} \quad 17 \quad (\text{Ec.15})$$

Puesto que la señal de fluorescencia es proporcional al rendimiento cuántico, la relación de señales de fluorescencia en ausencia (F) y en presencia (F') de amortiguador, a una concentración determinada, será igual a la relación de rendimientos cuánticos:

$$\frac{F}{F'} = \frac{\phi_F}{\phi_{F'}} = \frac{k_F + k_N + k_A[A]}{k_F + k_N} = 1 + \frac{k_A[A]}{k_F + k_N} \quad 18 \quad (\text{Ec.16})$$

relación que es conocida como ecuación de Stern-Volmer. Además, según la Ec. 3 resulta que:

$$\frac{F}{F'} = 1 + k_A \tau [A] \quad 19 \quad (\text{Ec.17})$$

Designando $k_A \tau = k$ obtendremos:

$$\frac{F}{F'} = 1 + k[A] \quad 20 \quad (\text{Ec.18})$$

por tanto:

$$k = \frac{k_A}{k_F + k_N} \quad 21 \quad (\text{Ec. 19})$$

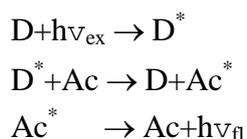
La ecuación de Stern-Volmer (Ec.16) permite determinar la constante de velocidad de la reacción de amortiguación k_A , a partir de la variación de la relación de señales de fluorescencia en función de la concentración de amortiguador.

La representación gráfica del cociente de señales de fluorescencia frente a la concentración del amortiguador debe ser lineal en este proceso.

Este tipo de amortiguación colisional lo presenta, por ejemplo, el sulfato de quinina en presencia de haluros.

Amortiguación estática. La interacción entre M y A se produce cuando M se encuentra en el estado singulete fundamental. Ejemplo típico de esta amortiguación es la producida por la cafeína sobre la riboflavina.

Amortiguación de Försted. Implica la transferencia de energía desde la molécula excitada D^* (dadora) a otra que se encuentra en estado fundamental Ac (aceptora). En el supuesto de que la molécula aceptora sea capaz de ser excitada, estará en condiciones de emitir fluorescencia.



4.2.3. Factores que afectan a la fluorescencia molecular

Existen miles de compuestos orgánicos, muchos de ellos farmacológicamente activos, que pueden ser analizados por fluorimetría. El que una determinada sustancia muestre emisión fluorescente y, por consiguiente, se pueda determinar mediante esta técnica, dependerá de varios factores. Entre ellos se pueden destacar los siguientes:

1.- **Presencia de grupos cromóforos.** La mayor fluorescencia de las moléculas está ligada entre otras causas con su capacidad absorbente de determinadas radiaciones, es decir, con su ϵ . De aquí que los compuestos fuertemente conjugados muestren frecuentemente fluorescencia nativa.

El mero hecho de que una sustancia sea fluorescente *per se*, nos da una información adicional, sirviendo de valiosa ayuda a la hora de interpretar los caracteres estructurales de las moléculas.

En principio, los métodos fluorimétricos son válidos para aquellos compuestos que poseen un sistema de dobles enlaces conjugados; sin embargo, la presencia de un "cromóforo" no es razón suficiente para esperar que, tras excitar con una R.E.M. adecuada, se emita fluorescencia nativa, puesto que en la práctica la eficacia cuántica de fluorescencia oscila entre 0 y 1, en función de la abundancia o escasez de procesos no radiantes de desactivación.

2.- **Estructura química.** No se pueden establecer correlaciones definitivas entre la estructura química y la fluorescencia; sin embargo, se han aportado algunas interesantes. Así se ha observado experimentalmente la notable influencia de la geometría molecular sobre los procesos luminiscentes.

Las características espectrales se modifican por introducción o desaparición de determinados sustituyentes, cambios en la simetría molecular, variaciones en la rigidez o planaridad de la molécula, traduciéndose en desplazamientos espectrales, incrementos en la intensidad de emisión fluorescente o desaparición completa de la misma, por favorecerse otros procesos que compiten con ella, al modificarse las condiciones experimentales y el entorno molecular.

Si los procesos que compiten con la fluorescencia se ven dificultados a causa de un cambio en la simetría, se incrementará el rendimiento cuántico de fluorescencia, como resultado de ser más favorecida la transición más probable.

La introducción o variación de los sustituyentes que afecten a la simetría del cromóforo, modifican la intensidad, polarización y energía de transición de la emisión fluorescente, a excepción de aquellos casos en los que el sustituyente quede aislado del cromóforo.

Se ha demostrado que los sustituyentes que no entran en conjugación o no interaccionan de alguna manera efectiva con el cromóforo, no tienen repercusión notoria en las características espectrales de fluorescencia.

3.- **Factores estéricos.** La magnitud del efecto de impedimento estérico sobre el espectro de fluorescencia dependerá del grado de proximidad existente. La introducción de grupos voluminosos inhibirá la resonancia total de la molécula, contribuyendo cada cromóforo de forma independiente al espectro.

Se puede generalizar que un sustituyente que no es coplanar con el resto de la molécula (del cromóforo) tiene un efecto mínimo sobre la posición de los máximos presentes en los espectros de absorción y de fluorescencia. Sin embargo, estas características de coplanaridad pueden afectar a otros parámetros.

Las moléculas planas y con elevado grado de simetría tienen espectros de absorción y emisión de fluorescencia muy netos. Normalmente dichos espectros son como dos imágenes especulares, lo que es indicativo de que no se produce cambio en la planaridad de la molécula al pasar de estado fundamental a excitado.

La rigidez molecular es uno de los factores a los cuales se atribuye la capacidad de algunas moléculas para emitir radiación fluorescente; esto es debido a una orientación constante de los componentes del cromóforo. Parece ser que la rigidez por sí misma no es un factor determinante, pero sí lo es el hecho de que por esta rigidez se mantenga una configuración planar en la molécula.

Al comparar el cis-estilbeno y el fenantreno, que podemos considerar como derivado suyo, por introducción de "un puente", al tener una mayor rigidez posee un rendimiento cuántico de fluorescencia mucho más elevado. Ejemplos análogos lo constituyen la fenolftaleína (no fluorescente) y la fluoresceína (fluorescente), que son similares, con la sola diferencia de "un puente" que cierra el anillo, dando mayor rigidez a la estructura.

La planaridad de las moléculas normalmente se determina por técnicas de rayos X, R.M.N. o cálculo de momentos dipolares. El estudio cualitativo de la fluorescencia de las moléculas puede ayudar a la determinación de la planaridad de las mismas, no sólo en estado fundamental sino también en estado excitado.

Se puede afirmar que la planaridad es un factor que afecta a los procesos de emisión, principalmente en tanto en cuanto afecta a la geometría y simetría molecular, ya que los procesos de emisión van acompañados por procesos de transferencia de carga, modificando la simetría molecular.

4.- Influencia de los sustituyentes. Parámetros tales como el rendimiento cuántico de fluorescencia y desplazamiento de Stokes ($\lambda_{fl} - \lambda_{ex}$) se ven afectados por la introducción de distintos sustituyentes en el anillo aromático.

El estudio de los espectros de fluorescencia, tras la modificación de la estructura base por introducción de distintos sustituyentes, puede dar información acerca de las características químicas del estado excitado.

Los efectos de los sustituyentes sobre la energía de emisión se hacen más pronunciados en la fluorescencia que en la fosforescencia. Esto es, los procesos de fluorescencia son mucho más sensibles a las modificaciones en el anillo por introducción de distintos sustituyentes.

En general, se puede afirmar que los sustituyentes que actúan como electrodonadores incrementan el rendimiento de luminiscencia del sistema aromático. La causa principal de este aumento de la luminiscencia es el incremento en la probabilidad de las transiciones radiantes, compitiendo la emisión de una forma más efectiva con las transiciones no radiantes.

La influencia de los sustituyentes halogenados sobre la luminiscencia de los hidrocarburos aromáticos requiere especial atención. De los estudios de luminiscencia de derivados halogenados en el naftaleno, se observa que para la serie F,Cl,Br,I, la relación $\varphi_{\text{fos}}/\varphi_{\text{F}}$ se incrementa de forma notable (siendo φ_{F} el rendimiento cuántico de fluorescencia y φ_{fos} el rendimiento cuántico de fosforescencia) y aumentando también el tiempo de vida de fosforescencia.

Se cree que los tiempos de vida del estado singulete excitado, no se ven alterados de forma significativa por la introducción de halógenos.

Los halógenos pesados favorecen el cruce entre sistemas $S_1^* \rightarrow T_1^*$ y los procesos no radiantes $T_1^* \rightarrow S_0$, llegando a amortiguar por completo la fluorescencia, si están unidos directamente al cromóforo; denominándose **efecto de átomo pesado interno**.

Otra circunstancia a considerar es el llamado **efecto del sustituyente**, que es objeto de estudios recientes. Se ha observado que la deuteración del hidrocarburo aromático tiene efecto apreciable sobre el tiempo de vida del estado triplete, no originando variaciones en los tiempos de vida y rendimientos cuánticos de fluorescencia.

La presencia de distintos sustituyentes puede hacer variar las características de luminiscencia, no sólo por el hecho en sí de introducir un determinado sustituyente, sino por los cambios que puede originar en el entorno estructural de la molécula, afectando a otros factores que influyen en los procesos de luminiscencia, pudiendo distinguirse isómeros por las diferentes características de sus espectros de fluorescencia. Así pues, neopina y codeína que muestran análogos espectros de absorción, presentan espectros de fluorescencia característicos.

Un fenómeno análogo se observa si comparamos morfina y heroína; la acetilación es causa de un desplazamiento hipsocrómico del máximo de fluorescencia, mostrando un descenso en la intensidad de emisión por favorecer el cruce entre sistemas.

4.2.4. La espectrofluorimetría como técnica analítica cuantitativa

Si el límite detectable de absorbancias con los modernos espectrofotómetros de absorción UV-VIS es del orden de 10^{-3} , como las moléculas orgánicas suelen presentar bandas de absorción cuyos valores de ϵ , van a alcanzar valores de 10^4 a 10^5 , tendremos una sensibilidad límite para estos espectrofotómetros de 10^{-7} a 10^{-8} M, que con instrumentos muy sofisticados podría extenderse hasta 10^{-10} M.

Ahora bien, si es alta la relación que representa el rendimiento cuántico entre fotones emitidos y fotones absorbidos y ambos procesos se producen a longitudes de onda convenientemente separadas, la espectrofluorimetría constituye un método más sensible que la espectrofotometría de absorción UV-VIS, pues se puede conseguir medir una señal de emisión fluorescente 10^7 veces menor que la excitadora absorbida. Los espectrofluorímetros serían, teóricamente, capaces de apreciar concentraciones de 10^{-15} a 10^{-17} M. Pero las limitaciones instrumentales, así como las operativas y de pureza de los solventes empleados, impiden alcanzar este límite. Aún así, podemos establecerlo entre 10^{-11} y 10^{-13} M. Es decir, que la espectrofluorimetría resulta ser mil veces más sensible que la espectrofotometría de absorción UV-VIS.

Pero no todas las moléculas, especialmente las orgánicas, tienen un elevado rendimiento cuántico; antes bien, la mayoría muestran baja fluorescencia. Debido a su complejidad, aparecen espectros de fluorescencia con bandas anchas y poco características.

Posiblemente en estos casos es menos selectivo, en principio, el espectro de fluorescencia que el espectro de absorción; sin embargo, sigue siendo más interesante el conocimiento de aquél, pues no sólo proporciona información de los grupo cromóforos activos frente a la radiación, sino también de los mecanismos que compiten en las transiciones desde el estado excitado al fundamental. Así pues, por necesidad se ha generalizado el empleo de sustancias marcadoras de fluorescencia.

Por todo ello, quizás el mejor panegírico del empleo de las técnicas de fluorescencia, lo viene a constituir el desmesurado incremento que se viene haciendo de las mismas durante los últimos años, plasmándose en el elevado número de trabajos científicos y monografías aparecidas.

La ventaja primordial de la fluorimetría es su gran sensibilidad, siendo posible detectar concentraciones de partes por billón, superando pues ampliamente a la mayoría de los métodos espectrofotométricos. También es destacable su especificidad, ya que debido a la aparición, tanto en los espectros de excitación como en los de emisión fluorescente, de máximos característicos para cada compuesto, permite con el uso de parámetros dobles (o múltiples), una diferenciación clara y precisa de compuestos en asociaciones complejas sin necesidad de separación previa.

Si la existencia de máximos de emisión es de una gran ventaja para diferenciar moléculas que podrían tener idénticos o parecidos máximos de absorción, haciendo uso de otros parámetros, tales como tiempo de vida de fluorescencia y rendimiento cuántico, resulta posible diferenciar las moléculas orgánicas afines que muestran fluorescencia nativa o inducida.

La proporcionalidad directa existente entre concentración e intensidad de fluorescencia permite realizar análisis cuantitativos, siempre que se opere en soluciones de baja concentración,

para evitar el **efecto de filtro interno**. Aún así, el intervalo de linearidad entre concentración y emisión fluorescente es muy amplio.

Si bien la sensibilidad de la fluorimetría es excepcionalmente alta, los compuestos orgánicos presentan la desventaja de mostrar espectros poco característicos, con bandas anchas. Para intentar mejorar el método, puede acudirse a una vaporización de la muestra, capaz así de ofrecer bandas estrechas y más definidas, pero dificultando evidentemente las técnica.

Otra restricción del método, es la difícil determinación cuantitativa simultánea de varios compuestos fluorescentes, cuando sus bandas de emisión se solapan ostensiblemente.

La base de los análisis cuantitativos por fluorimetría reside en el **ecuación de Kavanagh**:

$$F=k'(I_0-I) \quad (\text{Ec. 20})$$

donde F es la intensidad de la emisión fluorescente, k' una constante de proporcionalidad e I_0 e I las intensidades de la radiación electromagnética incidente y emergente, respectivamente.

Según la ley de Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = \varepsilon bc \ ; \ I = I_0 10^{-\varepsilon bc} = I_0 e^{-2,303\varepsilon bc} \quad 22$$

Por tanto, la señal de fluorescencia, resulta ser:

$$F=k'(I_0-I)=k'(I_0-I_0 e^{-2,303\varepsilon bc})=k'I_0(1-e^{-2,303\varepsilon bc}) \quad (\text{Ec.21})$$

Teniendo en cuenta que $e^{-2,303\varepsilon bc}$ equivale a una expresión del tipo e^{-x} , que puede desarrollarse en serie, resulta:

$$e^{-2,303\varepsilon bc} = 1 - 2,303\varepsilon bc + \frac{(2,303\varepsilon bc)^2}{2!} - \frac{(2,303\varepsilon bc)^3}{3!} + \dots \quad 23 \quad (\text{Ec.22})$$

De manera que en una aproximación razonablemente válida se podrán desprejar todos los términos a partir del tercero, siempre que $\varepsilon bc \leq 0,05$.

Así pues, la expresión correspondiente a la señal de fluorescencia será:

$$F=k'I_0[1-(1-2,303\varepsilon bc)]=k'I_0 2,303\varepsilon bc \quad (\text{Ec. 23})$$

y agrupando los términos constantes (para un mismo equipo instrumental y una determinación dada) resulta:

$$F = K''c \quad (\text{Ec. 24})$$

Según la cual, la señal de fluorescencia depende de la concentración c y de factores instrumentales (ángulo sólido visto por el detector, $f(\alpha)$; factor de conversión cuántico del detector, $f(\lambda)$; espesor o paso óptico de la cubeta, b, intensidad incidente de la radiación excitadora, I_0 , así como de otros parámetros relacionados con la propia sustancia (ε) y rendimiento cuántico de fluorescencia, φ_F , englobados todos ellos en K'' .

Es decir que:

$$F=f(\alpha)f'(\lambda)bI_0\varepsilon\varphi_{FC} \quad (\text{Ec. 25})$$

Y puesto que la Ec. 24 define la proporcionalidad lineal entre la señal de fluorescencia y la concentración, ésta es la base del aspecto cuantitativo de la espectrofluorimetría, siempre y cuando el producto εbc sea menor o igual a 0,05.

Por tanto, la linealidad entre F y c se cumple sólo para soluciones diluidas.

En efecto, si

$$\varepsilon bc \leq 0,05$$

$$\varepsilon bc_{\max} = 0,05$$

por consiguiente la concentración máxima a determinar será:

$$c_{\max} = \frac{0,05}{\varepsilon b} 24$$

Así pues, el análisis fluorimétrico cuantitativo de una muestra problema es muy simple. En primer lugar se prepara una gráfica de calibrado con soluciones patrones y a continuación se determina la señal de fluorescencia de la solución problema a fin de obtener su concentración. También, con relativa frecuencia, se suele emplear el método de la adición estándar.

Además de estas consideraciones, son precisas otras precauciones operativas al trabajar con sustancias fluorescentes. Es necesario, en todo caso, el contraste de cada reacción verificada, con una muestra en blanco. Por otra parte, los disolventes no pueden almacenarse en recipientes plásticos, pues las sustancias orgánicas de éstos podrían contaminar los líquidos. Tampoco se ha de lavar con detergentes los vasos, frascos y cubetas, ya que muchos de ellos son fluorescentes *per se*.

4.2.5. Componentes de los equipos instrumentales

La característica fundamental de los instrumentos para medidas fluorimétricas reside en la incorporación de dos selectores de radiaciones, situados antes y después de la cubeta portamuestras y dispuestos generalmente en ángulo de 90°.

Se distinguirá entre un fluorómetro (de filtros) y un espectrofluorímetro. El primero, como selectores de radiaciones, emplea filtros y generalmente no dispone de registrador. El espectrofluorímetro, además de llevar incorporado registrador, como **selectores** emplea habitualmente dos monocromadores (redes de difracción), uno de excitación o primario, antes de la cubeta portamuestras y otro de emisión o secundario, ubicado tras la cubeta.

Los distintos componentes, que integran estos equipos, son similares a los empleados en espectrofotometría de absorción UV-VIS, pues en definitiva las radiaciones excitadoras y fluorescentes involucradas pertenecen a esa región del espectro electromagnético.

Debido a las deseables características de intensidad, continuidad y estabilidad, la **fente de radiación** habitualmente utilizada en los modernos espectrofluorímetros es la lámpara de arco de vapor de xenon.

Es una lámpara de descarga con dos electrodos, con Xe a unas 20 atm en su interior; su potencia suele estar comprendida entre 100 y 400 watios, emitiendo espectro continuo entre 250 y 780 nm.

Los fluorómetros de filtro suelen disponer como fuente de radiación una lámpara de vapor de mercurio.

Cabe la posibilidad, cuando se trabaja con fluorescencia polarizada, de incorporar un **polarizador** y un **analizador** antes y después, respectivamente, de la cubeta.

Las **cubetas portamuestras** generalmente son de sílice fundida o cuarzo, debido a su alta transparencia, tanto en la región visible como ultravioleta. Su forma más frecuente es prismática tetragonal, aunque también existen microcubetas cilíndricas.

Si bien la disposición perpendicular (fuente de radiación-detector = 90°) es la más empleada (por ser máxima la sensibilidad); también existen la frontal (45°) y la rectilínea (180°). La elección de la situación a 90° es debida a que la dispersión Rayleigh originada no es homogénea en el espacio, siendo la intensidad de la luz dispersa a 180° mayor que a 90° .

Los **detectores** usados son casi exclusivamente tubos fotomultiplicadores.

En fluorimetría no es tan necesario como en absorciometría UV-VIS el empleo de equipos de doble haz, aunque actualmente se va generalizando su uso.

Los valores de señal de fluorescencia relativa obtenidos, bien con un indicador analógico (aguja) o registrados gráficamente, se expresan en unidades arbitrarias.

Es recomendable que el compartimento de las cubetas portamuestras esté termostatzado, pues los aumentos de la temperatura conllevan movimiento de las moléculas de la muestra, haciéndose más eficaz la desactivación no radiante por procesos de relajación.

4.2.6. Espectros de excitación y emisión

Con los espectrofluorímetros se pueden obtener dos tipos de espectros. El **espectro de excitación** es una representación del número de fotones absorbidos por la molécula en función de la longitud de onda.

Para registrar el espectro de excitación se fija el monocromador secundario de emisión a una longitud de onda determinada (la longitud de onda de fluorescencia máxima), y se hace un barrido exploratorio de longitudes de onda con el monocromador primario de excitación.

Las rendijas de excitación han de ser lo suficientemente estrechas como para permitir obtener el espectro bien resuelto.

El espectro de excitación, obtenido con un espectrofluorímetro, debiera ser similar al de absorción obtenido con un espectrofotómetro de absorción UV-VIS, pero esta concordancia sólo existe si el espectro de excitación es corregido.

El **espectro de emisión** se obtiene fijando el monocromador primario a la longitud de onda en la cual existe un máximo en el espectro de excitación, haciendo un barrido espectral con el monocromador secundario.

Al registrar un espectro de fluorescencia, las curvas obtenidas representan la variación de la corriente del fotomultiplicador en función de la longitud de onda de fluorescencia que incide sobre el fotomultiplicador, teniendo en cuenta que la magnitud de la corriente fotoeléctrica es proporcional a la intensidad de la señal de fluorescencia.

Los espectros de fluorescencia se encuentran a menudo acompañados por cuatro bandas indeseables que dificultan su estudio: dispersión Rayleigh, dispersión Raman, posible fluorescencia del solvente y de la cubeta y máximos de segundo orden, cuando se emplea como selector de radiaciones redes de difracción. Sin embargo, en la práctica resulta bastante sencillo distinguir estas cinco emisiones, y detectar la fluorescencia que será el objetivo propuesto.

El espectro de emisión de los compuestos fluorescentes es extraordinariamente sensible al entorno molecular. Por ello, el estudio de los factores ambientales que pueden afectar al proceso de fluorescencia es muy importante. Hay diversos factores, tales como disolventes, pH, concentración y temperatura, que producen cambios significativos en el espectro de fluorescencia, permitiendo un conocimiento de la influencia de los sustituyentes presentes en las moléculas así como estudios sobre equilibrios ácido-base, presencia de enlaces de hidrógeno y naturaleza de los estados excitados.

La mayoría de las medidas de fluorescencia se realizan en estado líquido, por ello es preciso conocer con detalle los efectos debidos a los solventes. Las distintas formas de interacción soluto-solvente pueden alterar los parámetros de fluorescencia, siendo diferentes los cambios producidos en el espectro de emisión fluorescente de los observados en el espectro de excitación para el mismo compuesto. La existencia de desplazamiento de los picos, tanto en el espectro de excitación como en el de emisión fluorescente de una molécula en solución, implica una interacción soluto-solvente, tanto en el estado fundamental de la molécula como en el excitado.

Cuando el espectro de emisión fluorescente es el único afectado por el cambio de solvente, es porque se ha producido una interacción entre el solvente y la molécula en estado excitado, pero no cuando se encuentra en su estado fundamental. Estos efectos son observados

por la existencia de desplazamientos de las longitudes de onda características, por una amortiguación de la fluorescencia o por la presencia de ambos efectos.

En general se observa que tanto el espectro de excitación como el de fluorescencia de moléculas en solución, se ven desplazados hacia energías más bajas tras ser comparados con el correspondiente espectro del mismo soluto en fase gaseosa.

La interpretación de los efectos del solvente suele ser complicada y en general la magnitud del desplazamiento va a depender de la naturaleza específica de las interacciones entre el soluto y el solvente.

La mayor parte de los espectros publicados en la bibliografía de fluorimetría eran no corregidos, razón por la que se debía especificar el tipo de fotomultiplicador empleado debido a que, como es sabido, su respuesta espectral no es lineal para todas las longitudes de onda.

Aunque las lámparas de arco de xenon son bastantes continuas (uniformidad de intensidad de radiación emitida), existen también rayas características más intensas.

Ambas ideas precedentes se han de tener en cuenta cuando se registran espectros, de excitación o de emisión fluorescente, puesto que las señales obtenidas no son "verdaderas", a no ser que se corrijan.

Los **espectros corregidos** van a ofrecer una mayor información teórica, además de permitir comparar los espectros obtenidos en instrumentos diferentes.

Para corregir el espectro de excitación, será pues necesario conocer previamente el espectro de emisión de la fuente de radiación (pues su intensidad, I_0 , no es constante para todas las longitudes de onda, es decir, el número de fotones emitidos varía a lo largo del espectro), mediante actinómetros químicos o termopares.

Generalmente se acude a compuestos tales como la rodamina B, que presenta una banda ancha de absorción, en cuyo intervalo de longitudes de onda la absorbancia permanece constante. Además presenta la singularidad de ser muy fluorescente y un elevado valor del rendimiento cuántico de fluorescencia, constante para el citado intervalo. Por tanto, en estas circunstancias el fotomultiplicador recibirá una señal constante, excepto por las posibles variaciones que pueda haber debidas a I_0 . Como éstas son conocidas, por disponer del espectro de emisión de la fuente de radiación, sólo restará corregir el espectro de excitación aparente, para cada longitud de onda, con respecto al de emisión de la fuente.

Para corregir el espectro de emisión (a longitud de onda de excitación fija), se ha de tener en cuenta el factor de conversión cuántico del detector, pues su respuesta dependerá de la de la molécula en cuestión. Por tanto, será necesario realizar una curva de calibrado para las diferentes respuestas del fotomultiplicador. Se estudiará pues, la variación de la señal de fluorescencia de una misma solución con lámparas distintas. Como se eligen estas lámparas "patrones", comparando las distintas respuestas del fotomultiplicador, habrá que sumar o restar a la señal de

fluorescencia de salida, la magnitud que corresponda; en definitiva, en esto consiste la operación de corrección.

En los modernos espectrofluorímetros de espectro corregido estas operaciones quedan automatizadas.

4.2.7. Aplicaciones de la fluorimetría en análisis farmacéutico

La fluorimetría es una técnica pujante y en continuo desarrollo, y lógicamente existen revistas específicas y numerosos libros dedicados exclusivamente a ella.

Sería imposible citar incluso una mínima parte de la variedad de aplicaciones anotadas en la moderna bibliografía farmacéutica. Al revisar las últimas ediciones de algunas farmacopeas de prestigio, es fácil percatarse de la aceptación que va teniendo la fluorimetría como técnica analítica para la determinación de diferentes compuestos farmacológicamente activos.

Las características de selectividad, sensibilidad y reproductibilidad que posee, la hacen indispensable en muchos análisis de fármacos o de sus metabolitos derivados.

Podemos agrupar, en tres apartados, los análisis de fármacos por fluorimetría: (a) Compuestos que muestran fluorescencia nativa previa disolución en un solvente adecuado, por ejemplo el sulfato de quinina. (b) Compuestos que desarrollan fluorescencia previo tratamiento fisicoquímico, así sucede, por ejemplo, con la ampicilina hidrolizada. (c) Compuestos no fluorescentes que emiten fluorescencia tras la adición de un determinado reactivo o tras acoplarse a un marcador adecuado; el número de ejemplos de este tipo es prácticamente ilimitado.

Entre los compuestos más estudiados por fluorimetría, desde hace años, están los alcaloides del cornezuelo de centeno y de la rauwolfia (reserpina, isoreserpina, rescinamina, deserpidina, renoxidina, etc., fluorescen en solución cloroformo-metanol). Asimismo hay descritos métodos para actinomicina A y griseofulvina que presentan fluorescencia *per se*. Las anfetaminas se han estudiado fluorimétricamente por condensación con formaldehído en medio sulfúrico y el pentobarbital en solución alcalina. Los barbitúricos pueden detectarse por la fluorescencia verdosa que producen cuando se calientan con resorcinol, produciéndose cambios característicos por la variación del pH del medio.

Morfina, heroína y LSD se diferencian fluorimétricamente con facilidad, lo cual es de extraordinaria utilidad en estudios toxicológicos.

Las dibenzodiazepinas también se pueden determinar fluorimétricamente, así como las sulfamidas, isoniazidas y 4-amino quinolinas.

Mellinger y Keller han publicado un interesante estudio acerca de las características fluorescentes de los compuestos fenotiazínicos. La tioridazina es el más representativo. Protipendilo, el clorprotixeno e imipramina también son fácilmente detectados.

Los salicilatos en tejidos y líquidos biológicos, así como la microdeterminación fluorimétrica de ácido acetilsalicílico y salicílico en sangre, son ejemplos sumamente elocuentes.

Jakovljevic ha revisado los muchos métodos fluorimétricos descritos para la determinación de glucósidos cardiotónicos, siendo muy llamativa la determinación simultánea de digitoxina y digoxina.

Udenfriend ha revisado las numerosas posibilidades de análisis fluorimétrico de vitaminas, discutiendo con detalle los procedimientos propuestos para vitamina A, tiamina, riboflavina y derivados, nicotinamida, piridoxina y compuestos relacionados, ácido ascórbico, vitamina D, ácido fólico, PABA, cianocobalamina, tocoferoles y vitamina K.

Las determinaciones fluorimétricas de tiamina y riboflavina constituyen los mejores ejemplos, ya clásicos, de la aplicación de la fluorimetría al análisis farmacéutico.

En la química de medio ambiente, destacar que pesticidas como CoRal, Malvin, Guthion, Benomyl, ácido tereftálico, Zinophos, etc., se determinan fácilmente por fluorimetría. Está indicada esta técnica para más de treinta pesticidas organofosforados y clorados.

En la atmósfera de las ciudades pueden encontrarse numerosos hidrocarburos aromáticos policíclicos y heterocíclicos, tachados de cancerígenos; son fácilmente analizables, tanto cualitativamente como cuantitativamente por espectrofluorimetría. Los carbazoles y acroleínas, a veces presentes en el aire de los núcleos urbanos industrializados, también es indicado cuantificarlos por fluorimetría.

En el campo del análisis bromatológico son innumerables los ejemplos propuestos, resultando interesante la determinación de malvidina en vinos híbridos y cúrcuma en harinas panificables. Finalmente, en análisis clínicos, hay numerosos métodos descritos, siendo clásicos la determinación de magnesio y calcio en líquidos biológicos, por no citar más que algunos ejemplos.

4.2.8. Marcadores fluorescentes

Un elevado número de compuestos orgánicos son fluorescentes, bien sea a temperatura ambiente o a la temperatura del nitrógeno líquido (-196 °C), por ello, los métodos fluorimétricos han encontrado un amplio campo de aplicación tanto en la biofísica y bioquímica molecular, como en análisis químico y en química farmacéutica y por supuesto en química clínica. La combinación de las técnicas de medida de polarización con resolución temporal y tiempo de vida, ha permitido profundizar en el conocimiento de la estructura de biomoléculas, así como de

complejos biosistemas. Las sondas fluorescentes externas aportan información, al mismo tiempo que causan perturbaciones en su entorno molecular, permitiendo un mejor conocimiento de las características estáticas y dinámicas del mismo.

Por otra parte, la determinación de compuestos farmacológicamente activos, a niveles de concentración terapéuticos y tóxicos, en medios biológicos, a menudo alcanza valores de nanogramo y picogramo. Por estas razones, la espectrofluorimetría se está utilizando ampliamente para el análisis de un creciente número de fármacos y de sus metabolitos.

Los métodos fluorimétricos, en análisis farmacéutico pueden ser agrupados, según que la medida de la fluorescencia buscada sea la fluorescencia nativa del propio fármaco o bien la fluorescencia inducida químicamente o bien la surgida por modificaciones del entorno del fármaco.

Los compuestos orgánicos de interés farmacéutico, que no poseen fluoróforos en su molécula, y en consecuencia no presentan fluorescencia nativa, pueden ser "derivatizados", "enlazados", "marcados", en definitiva modificados, para que den origen a productos fluorescentes.

Los marcadores en análisis fluorimétrico tienen gran importancia, tanto en su vertiente de reactivos fluorogénicos, muy útiles en reacciones de derivatización química, HPLC, fluoroinmunoanálisis, etc., como en el campo de la bioquímica y biofísica, en estudios de interacción de ciertos fármacos con proteínas, enzimología y química de polímeros en general, así como en estudios de caracterización de biomembranas y biopolímeros. Este vasto campo de aplicación de los métodos fluorimétricos, mediante el marcaje fluorescente, ya sea en su vertiente de reactivos fluorogénicos o bien como sondas fluorescentes, ha dado lugar a una gran ampliación de horizontes.

En los últimos años se ha incrementado notablemente el uso de reactivos fluorogénicos en HPLC, como lo demuestra el hecho de que dentro de una reunión internacional específica de la IUPAC que organizó el académico belga de esta Real Institución, el Dr. Baeyens (Internacional Symposium on Quantitative Luminiscence in Biomedical Sciences), se dedicó una sesión al tema que nos ocupa.

Por otra parte el uso de medios micelares, tanto para favorecer los procesos de emisión fluorescente y en consecuencia facilitar la cuantificación de las muestras, como en HPLC, lo que actualmente se viene denominando "cromatografía micelar", suscita gran interés.

Las modificaciones inducidas, que tienden a producir fluorescencia en moléculas o sistemas no fluorescentes, pueden ser de naturaleza química o fisicoquímica, según lo cual, clasificaremos los procesos en dos grupos:

a) Modificaciones de naturaleza fisicoquímica: que normalmente tienden, a mejorar el rendimiento cuántico de moléculas ya fluorescentes.

b) Modificaciones de naturaleza química: las cuales generalmente implican la formación de un enlace covalente entre el marcador fluorescente y el compuesto problema. Este tratamiento se suele conocer con el nombre de reacciones de "derivatización".

El empleo de marcadores fluorescentes, en reacciones de derivatización, presenta bastantes ventajas, pues aporta una mejora en la detectabilidad de los compuestos problema presentes en la muestra, a los niveles de concentración deseados. Para conseguir estos objetivos, en primer lugar se debe incrementar la sensibilidad, transformando el compuesto objeto de análisis en otro capaz de desarrollar una respuesta fluorescente más intensa. Para mejorar la selectividad del análisis, se modifican de algún modo, las características físicas o químicas del producto de partida.

Otra ventaja, es el papel que juegan en la estabilización de compuestos lábiles y volátiles. Finalmente también puede utilizarse con fines o propósitos confirmatorios.

Sin embargo, el tratamiento antedicho tiene ciertas limitaciones, pues, la derivatización implica un paso adicional en el análisis y además las variaciones en el valor del rendimiento cuántico de fluorescencia pueden conducir a errores.

La elección del marcador fluorescente adecuado o idóneo es fundamental a fin de optimizar el análisis a realizar, por ello el marcador fluorescente ideal deberá presentar las siguientes características:

Mostrar una emisión fluorescente diferenciable de la del medio de reacción, así como un elevado rendimiento cuántico de fluorescencia. La reacción deberá ser versátil, rápida y preferiblemente no drástica. Los productos de reacción deben ser estables en el medio de reacción. El marcador fluorescente deberá pues seleccionarse, en función de la naturaleza del grupo funcional característico del compuesto a analizar.

Consideraremos a continuación los distintos marcadores fluorescentes en el análisis de diversos **grupos funcionales**.

La ninhidrina se utiliza para la determinación fluorimétrica de **aminas** en general, y en particular de aminoácidos, aminoazúcares y péptidos, mediante una reacción típica de condensación. Los productos de reacción pueden detectarse en concentraciones del orden de nanomol, resultando la detección espectrofluorimétrica mucho más sensible que la espectrofotométrica UV-VIS, en el caso de los aminoácidos.

También es una reacción de condensación la que permite la determinación espectrofotométrica y espectrofluorimétrica de cicloserina.

La cicloserina posee un grupo amino primario, el cual reacciona con benzoquinona para dar una base de Schiff. Por ello, este método ha sido propuesto para la determinación de cicloserina en cápsulas.

Un reactivo más sensible y selectivo que la ninhidrina, es el OPA (ortoftalaldehído). El OPA reacciona con aminas primarias en medio alcalino y en presencia de agentes reductores (generalmente mercaptoetanol), los cuales estabilizan los productos de reacción y dan lugar a derivados de notable fluorescencia.

Este reactivo, específico de aminas primarias, puede sin embargo, utilizarse en la determinación de aminas secundarias previa conversión de las mismas en primarias, en presencia de hipoclorito o cloramina T.

La derivatización con OPA tiene gran utilidad en el análisis cromatográfico de pesticidas del tipo o-metil carbamoiloxima. Estos compuestos, así como sus productos de oxidación, pueden filtrarse a las aguas subterráneas de las zonas cultivadas y por tanto contaminar las aguas potables.

El OPA también se usa como reactivo revelador en TLC para la determinación de compuestos de interés bioquímico, tal es el caso del ácido indolacético y sus derivados. El incremento de los niveles de ácido indolacético en la excreta o en el líquido cefalorraquídeo, es indicativo de alteraciones en el metabolismo del triptófano y de la serotonina.

La cicloserina, como anteriormente se ha mencionado, es un antibiótico de amplio espectro, que inhibe la incorporación de alanina a la pared bacteriana. Por ello se usa en clínica, conjuntamente con otros antibióticos, en el tratamiento de algunas formas de tuberculosis, administrándose cicloserina y su profármaco, la acetiladenilcicloserina en forma de sal sódica hemihidratada. Su cuantificación, puede llevarse a cabo después de su separación por HPLC en fase inversa, detectándose fluorimétricamente la cicloserina después de su reacción con OPA, mientras que su profármaco, que no puede reaccionar con OPA, por no poseer grupos amino libres, se determina espectrofotométricamente.

Se ha propuesto un método cromatográfico (HPLC) para la determinación de baclofeno, previa derivatización precolumna con OPA, empleando agentes estabilizadores de tipo tiol, ópticamente activos, como por ejemplo la n-acetil cisteína, lo cual permite la separación efectiva de las mezclas racémicas de baclofeno.

El acetil-homotaurinato cálcico, es un compuesto de interés farmacológico y bioquímico, que se cree ejerce su acción sobre los receptores gabaminérgicos. El derivado desacetilado de este compuesto, contiene un grupo amino libre capaz de reaccionar con OPA.

De forma similar, el OPA se ha utilizado en la detección fluorimétrica post-columna de algunos compuestos liberados durante el metabolismo de las cadenas peptídicas de actina y miosina, después de la separación por HPLC por par-iónico. El método propuesto permite una mejor separación de la histidina de los otros aminoácidos interferentes, entre ellos el triptófano.

También citaremos la determinación de alcaloides derivados de ergotamina, así como antibióticos, tales como gentamicina en plasma y orina, kanamicina y diversas cefalosporinas, por reacción de derivatización con OPA.

El OPA, reacciona con amonio en presencia de mercaptoetanol, dando productos fluorescentes no bien caracterizados por el momento. La reacción tiene lugar a pH neutro, a diferencia de las condiciones en las que se desarrolla la reacción de las aminas con OPA, que tiene lugar a pH alcalino.

Entre los reactivos más frecuentemente empleados en la determinación de aminas, la fluorescamina es, conjuntamente con el OPA, uno de los más empleados. La fluorescamina es un compuesto no fluorescente que reacciona con aminas, para producir fluoróforos de notable fluorescencia.

Este compuesto fué propuesto como reactivo fluorogénico porque reacciona con aminas primarias, para dar compuestos de estructura tipo pirrolinona y con aminas secundarias, dando derivados no fluorescentes que presentan estructura de aminoenona.

Según esto, con la fluorescamina, solo podían analizarse fluorimétricamente aminas primarias. Sin embargo Nakamura ha propuesto la conversión de las aminoenonas, no fluorescentes, en pirrolinonas fluorescentes, por adición de una amina primaria al medio de reacción. La elección adecuada de la amina primaria, es esencial para el segundo paso de la reacción.

Tan y Beiser han desarrollado un método rápido y sensible para la determinación de procainamida, presente en diversos preparados farmacéuticos.

Algunos antibióticos del grupo de las cefalosporinas pueden cuantificarse después de su separación por TLC, seguida de reacción con fluorescamina a temperatura ambiente, cuando el cromatograma se nebuliza previamente con trietilamina.

Las nitrosaminas son compuestos cancerígenos que pueden estar presentes en los alimentos. Estas pueden determinarse por reacción con fluorescamina previa reducción de las mismas a aminas secundarias.

En la continua búsqueda de nuevos marcadores fluorescentes que presenten mejores cualidades, hemos de hacer mención de un análogo de la fluorescamina, la MPDF: 2 -metoxi-2,4 -difeníl- 3 (2H) -furanona. Este marcador presenta notables ventajas con respecto a la fluorescamina, principalmente una mayor sensibilidad.

Otro marcador fluorescente ampliamente utilizado en el análisis de aminas es el cloruro de dansilo. El DNS puede reaccionar tanto con aminas primarias como secundarias, para dar productos de elevada fluorescencia. En términos generales se puede considerar como un reactivo de compuestos con "hidrógenos activos".

Lawrence propone la determinación de pesticidas derivados de los metil-carbamatos mediante la reacción del cloruro de dansilo a través de los grupos hidroxilo y amino.

Para compuestos farmacológicamente activos cuyos niveles en sangre se monitorizan, debido a lo prolongado del tratamiento, como tocainida y barbitúricos, pueden determinarse fácilmente por reacción con DNS-Cl.

En comparación con el OPA, el DNS-Cl presenta la ventaja de que reacciona con aminoácidos del tipo prolina e hidroxiprolina, originando derivados más estables.

En este mismo campo, el DNS-Cl se emplea para el análisis de la glucosil-galactosil-hidroxilisina, obteniéndose los derivados mono y didansilados, los cuales corresponden a los grupos alfa y epsilon-amino de la lisina.

Los halógenoderivados del benzoxadiazol reaccionan con aminas primarias y secundarias alifáticas para producir derivados altamente fluorescentes.

La reacción tiene lugar por sustitución del halógeno por el grupo aminoatacante.

Con respecto a los halógenoderivados del nitrobenzoxadiazol (NBD-X), Imai ha demostrado que la sensibilidad, en la determinación de aminas, depende del halógeno sustituyente. Así pues, comparando la reactividad de los F, Cl y Br derivados de benzoxadiazol hacia prolina, los mejores límites de detección se obtienen con el fluoruro de NBD.

El cloro-derivado ha sido utilizado para la detección de aminoácidos y de aminas primarias y secundarias en muestras biológicas.

El análisis de aminas alifáticas, de bajo peso molecular tiene gran importancia, ya que éstas son contaminantes atmosféricos, dando lugar por reacción fotoquímica a óxidos de nitrógeno y nitrosaminas, las cuales son peligrosas para la salud. Este marcador, cloruro de NBD, se ha utilizado para la obtención de los derivados de las mencionadas aminas y su cuantificación.

También se puede analizar el baclofeno por reacción de derivatización con este mismo reactivo, permitiendo su cuantificación en comprimidos, pudiéndose determinar concentraciones inferiores, incluso a ng/ml.

Mi principal aportación en este campo ha sido la incorporación de diversas series de sales de quinolizino, de nueva síntesis, para la determinación de efedrina, benzocaína y catecolaminas, así como de otras aminas y nucleófilos de interés farmacéutico.

Con respecto a los marcadores fluorescentes empleados para el análisis de **compuestos carbonílicos**, diremos que los primeros reactivos que fueron utilizados con tal fin, poseían un grupo hidrazino en su estructura. Las hidrazinas reaccionan fácilmente con compuestos carbonílicos, originando hidrazonas.

Para mejorar las características de los reactivos fluorogénicos de compuestos carbonílicos, Nakamura propuso el cloruro de N-metilnicotinamida.

Este marcador es capaz de reaccionar con compuestos carbonílicos y el producto de reacción así originado, muestra una considerable fluorescencia.

En general, con este método pueden evaluarse, metilenoaldehídos, cetonas, cetoácidos, cetoazúcares y cetosteroides.

Aunque los epóxidos no son compuestos carbonílicos, mencionaremos aquí su determinación, ya que está basada en una serie de reacciones surgidas de su interacción con la nicotinamida, seguida de un tratamiento con compuestos carbonílicos. Los epóxidos inducen la N-alkilación de la nicotinamida; una vez que esta reacción se ha producido, el derivado de la N-alkilnicotinamida obtenido, es capaz de reaccionar con alfa-metilenocetonas o con alfa-metilenoaldehídos. La adición de uno de estos compuestos al medio de reacción conduce a la formación del fluoróforo.

Las oleandomicinas, son antibióticos que poseen en su estructura agrupamientos lactona y un característico grupo epoxi en posición 8. Este grupo epoxi es capaz de inducir la N-alkilación de la nicotinamida en presencia de álcalis, reaccionando con los compuestos carbonílicos.

Otro reactivo empleado en la determinación de compuestos carbonílicos es la orto-fenilendiamina, la cual reacciona con los alfa-dicarbonílicos para producir quinoxalinas sustituidas, que muestran una significativa fluorescencia.

La orto-fenilendiamina ha sido utilizada para cuantificar ácido ascórbico y dehidro-ascórbico, después de su separación por HPLC.

De forma similar, algunos autores han diseñado un marcador fluorescente análogo a la orto-fenilendiamina, que supone la formación de derivados con estructura de quinoxalina de considerable fluorescencia. Así pues la 2,3-dimetil-6-metoxiquinoxalina, se origina por reacción entre el biacetilo (el cual es un aromatizante natural presente en algunos alimentos y bebidas) y el 3,4-diamino-anisol, que en este caso se comporta como reactivo fluorogénico, permitiendo la cuantificación del biacetilo.

Otro reactivo fluorogénico interesante es el 4,5-dimetoxi-1,2-diaminobenceno; este marcador da lugar a productos con una elevada intensidad de fluorescencia, permitiendo la cuantificación del ácido fenilpirúvico, a los niveles que normalmente se encuentra en los fluidos biológicos.

A continuación, consideraremos las reacciones que tienen lugar entre las catecolaminas y la etilendiamina, actuando esta última como marcador fluorescente. La reacción con etilendiamina, es de condensación, similar a las previamente mencionadas. Esta reacción tiene lugar después de la oxidación de las catecolaminas (con agentes empleados a tal fin), produciéndose la condensación con la etilendiamina, proporcionando excelentes resultados.

La 1,2-difeniletilenodiamina (DPE) es útil para la determinación de compuestos tales como la noradrenalina y dopamina, isoproterenol, ácido 3,4-hidroximandélico e hidroxiestróna. Este reactivo (1,2-difeniletilenodiamina) se ha empleado con éxito en los estudios de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos. El procedimiento está basado en la reacción de la 1,2-difeniletilenodiamina con la dopamina, la cual se origina a partir de la DOPA, que es sustrato de la descarboxilasa.

La determinación de DOPA, originada en la hidrólisis de la L-tirosina, reviste utilidad para determinar la actividad enzimática de tiroxinahidroxilasa.

Es necesario mencionar igualmente los reactivos derivados del 1,2-diaminobenceno, los cuales reaccionan con alfa-cetoácidos, para producir también compuestos fluorescentes.

El 1,2-diamino-4,5-metilenodioxibenceno es el mejor y más sensible para la determinación de compuestos alfa-carbonílicos.

No son muchos los reactivos descritos para la determinación de aldehídos aromáticos, pero entre ellos sobresale el 1,2-diaminonaftaleno, cuya reacción de condensación con aldehídos aromáticos tiene lugar en medio ácido.

Un compuesto similar es el 2,2-ditio bis (1-aminonaftaleno), DTAN, que es extremadamente selectivo para la determinación de estos aldehídos. Así pues, el furfural y el aldehído cinámico (ambos aldehídos aromáticos) pueden determinarse, pero en presencia de agentes reductores. Este reactivo es útil para la determinación de la actividad enzimática de las monoxidasas A y B.

También, el 1,2-diamino-4,5-etil dioxibenceno se ha empleado como buen reactivo fluorogénico de aldehídos aromáticos, especialmente de benzaldehídos con grupo hidroxilo.

A continuación consideraremos los marcadores fluorescentes útiles en el análisis **ácidos carboxílicos**. Son quizá el grupo para el que existe una menor variedad de reactivos fluorogénicos. Sin embargo, numerosos ácidos monocarboxílicos monosustituídos, aparte de otros polisustituídos, reaccionan con la 4-bromometil-7-metoxicumarina para producir ésteres fluorescentes. Como ejemplo citaremos la determinación de los ácidos imidazolacético y N-metilimidolacético en orina, por reacción con la 4-bromometil-7-metoxicumarina (BrMmC).

Este mismo reactivo fluorogénico se ha empleado en reacciones de derivatización pre y postcolumna de tiouridina y tiouracilo, compuestos que tienen nitrógenos imídicos con carácter ácido. Por ello es útil para la determinación de 5-fluoro-2-deoxiuridina, agente empleado en quimioterapia para el tratamiento de una gran variedad de carcinomas. También se emplea para la determinación de los ácidos caprílico y valproico en plasma, mediante una reacción de derivatización precolumna, seguida de separación por HPLC.

Un reactivo análogo al previamente descrito es la 4-bromometil-7-acetoxi cumarina (BrMaC). Ácidos carboxílicos relevantes como el araquidónico y sus metabolitos, eicosanoides,

leucotrienos hidroxilados y ácidos grasos no esterificados, en general, puedan determinarse con sensibilidad semejante a la alcanzada por otros métodos, tales como espectrometría de masas y radioinmunoanálisis.

Posteriormente consideraremos los marcadores fluorescentes útiles para el análisis de **hidroderivados**.

Tan fácilmente como con las aminas, el cloruro de dansilo reacciona con los grupos hidroxifenólicos y aunque con mayor dificultad que con las aminas, también reacciona con los alcoholes alifáticos primarios.

Los diferentes compuestos obtenidos en la reacción de derivatización entre el cloruro de dansilo y diversos alcaloides, tales como morfina, cefalina y codeína, pueden ser cuantificados, tras la separación previa por TLC, gracias a la reacción producida a través de los grupos hidroxifenólicos.

Un análogo del DNS-Cl, con un mecanismo de reacción semejante, es el cloruro de 2-fluoreno sulfonilo. El fluoróforo es un hidrocarburo aromático policíclico de considerable fluorescencia intrínseca. Los diferentes derivados obtenidos, disueltos en el medio de reacción, se separan cromatográficamente y se detectan fluorimétricamente.

Este método permite la cuantificación de guayacol, cresol, diclorofenol, p-clorofenol y nitrofenol, entre otros.

Otro haluro de ácido, con estructura básica de cumarina es la 7 (clorocarbonil)metoxi-4 metilcumarina. Este reactivo ha sido propuesto recientemente para la determinación de hidroxiesteroides y prostaglandinas. La reacción de derivatización, seguida de separación cromatográfica, permite la detección de estos esteroides y de sus metabolitos.

También, entre los reactivos para el análisis de compuestos con grupos hidroxilo, mencionaremos el bromuro de panacilo, el cual ha sido propuesto para la determinación y cuantificación simultánea de prostaglandinas de tipo E y sus profármacos, ampliamente utilizados en el tratamiento de hemorragias intestinales.

Los ácidos biliares pueden asimismo cuantificarse por los productos de reacción que forman con el 9-antroilnitrilo.

Finalmente hablaremos de los reactivos fluorogénicos utilizados en análisis de **tiolderivados**.

Citaremos las dansilaziridinas y bimanos, y entre los ya mencionados para el análisis de otros grupos funcionales, encontramos el OPA y algunos de los halogenoderivados del benzoxadiazol.

Las dansilaziridinas son muy reactivas, pero presentan fluorescencia nativa, lo cual da lugar a considerables interferencias, por la coincidencia en la emisión fluorescente de los productos de reacción y del reactivo de partida.

Algunas maleimidias también poseen fluorescencia intrínseca y normalmente dan lugar a múltiples productos fluorescentes, debido a la hidrólisis de los fluoróforos inicialmente producidos. Sin embargo, los sistemas tándem de HPLC con detección fluorimétrica aportan una adecuada selectividad y sensibilidad para la determinación de tioles en fluidos biológicos. Con tal reactivo, pueden determinarse compuestos como glutatión reducido, cisteína, cisteamina, homocisteína, n-acetilcisteína y coenzima A, procedentes de hígado y riñón, así como de plasma y suero.

Los bimanos, y concretamente el monobromobimano, son reactivos de gran utilidad para la determinación de grupos sulfhidrilo. El monobromobimano es un compuesto no fluorescente que reacciona lentamente, de forma no enzimática, con grupos tioles, tal es el caso del glutatión, dando lugar a productos de reacción notablemente fluorescentes. El ya citado Dr. Baeyens, de la Facultad de Farmacia de Gante, ha determinado diversos tioles, entre los que podemos citar cisteína y N-acetilcisteína por HPLC con detección fluorescente, utilizando como marcador monobromobimano.

El Prof. Hulbert, de la Facultad de Farmacia de Bradford, observó que la glutatión-transferasa cataliza la reacción entre el monobromobimano y el glutatión, aumentando considerablemente la velocidad de reacción, dado que el monobromobimano es sustrato de la glutatión-transferasa. Así pues, este método se propone para la determinación de la actividad enzimática de la glutatión-transferasa.

Los citados compuestos con grupos tiol tales como glutatión, cisteína y ácido tioglicólico, poseen un fuerte carácter hidrófilo y forman parte de coenzimas y metalotioninas. Por ello, fué necesario desarrollar reacciones en medio hidrofílico para la determinación de dichos tioles, por tanto se ha propuesto el OPA como reactivo fluorogénico en reacciones de derivatización pre y postcolumna.

Basándose en esta misma reacción Jano y Takitahi proponen un método para la determinación de epóxidos, mediante la formación de derivados tiólicos, por tratamiento de aquellos con sulfito sódico.

Los ya mencionados halógeno-derivados de benzoxadiazol, empleados en la cuantificación de aminas, también se utilizan para la determinación de tioles en fluidos biológicos, así como de tioles de bajo peso molecular, presentes en la atmósfera, los cuales actúan como contaminantes.

Otros análogos del benzoxadiazol, también utilizados son el SBD-F, el CBD-F y el ABD-F.

El SBD-F es un reactivo empleado en reacciones de derivatización pre y postcolumnar, usándose en la determinación de glutatión y cisteína en sangre.

El CBD-F, es un reactivo bifuncional, sus grupos reactivos son los dos halógenos, el uno situado sobre el anillo aromático (flúor) y el otro incluido en el radical clorosulfonilo, actuando este grupo de forma semejante al cloruro de dansilo. Con este reactivo, Imai ha evaluado con éxito compuestos tales como glutatión, cisteína, coenzima A y el agente antihipertensivo captoprilo.

El ABD-F no solo es útil para la cuantificación de tioles, sino que además permite la detección específica y selectiva de residuos tiólicos en proteínas y péptidos.

Hoy en día, el uso de marcadores fluorescentes se extiende profusamente en el campo de las ciencias de la salud, por lo que la búsqueda e investigación de nuevos reactivos está en continuo desarrollo, de ahí su transcendencia en análisis farmacéutico.

4.3. GRUPOS ESPECIALIZADOS

El equipo encabezado por Turro, en las décadas de los años setenta y ochenta, abordó, desde las bases fotofísicas de la fluorescencia, el estudio de micelas, coloides y membranas de células vivas, valiéndose de las variaciones observadas en la intensidad de la emisión fluorescente de ciertas moléculas orgánicas, dependiendo de la polaridad del entorno.

El grupo de investigadores dirigido por Guilbault, en las últimas tres décadas, trabajó activamente tanto en los aspectos fundamentales y de instrumentación, como en aquellos otros más aplicados, utilizando la espectrofluorimetría como técnica de análisis bioquímico para estudio y caracterización de enzimas, así como la aplicación de las reacciones enzimáticas a la determinación de sustratos de interés bioquímico o bien en el prometedor ámbito del fluoroinmunoanálisis.

También Wehry y sus colaboradores, desde los setenta, han enfocado su quehacer en aspectos relevantes de la sensibilidad de fluorescencia con respecto al entorno (solventes), procesos de transferencia de protones en los estados excitados, equilibrios ácido-base en estado excitado, formación de complejos y dímeros por moléculas excitadas electrónicamente (excímeros y exciplex), etc.

En 1981 el inglés Miller, de la Universidad de Loughborough, en diversas publicaciones sobre patrones en espectroscopía de luminiscencia, establece las bases y los criterios para definir la sensibilidad de los fluorímetros, métodos para la corrección de espectros y medidas de rendimientos cuánticos.

El Prof. Lakowicz, actualmente editor de la prestigiosa revista **Journal of Fluorescence**, dedica su atención desde hace más de quince años a los fenómenos de amortiguación de fluorescencia (*quenching*) y su utilidad en el estudio de sistemas bioquímicos complejos, con especial énfasis en proteínas y membranas. Asimismo ha impulsado otras técnicas alternativas, como las

derivadas de las medidas de polarización de fluorescencia, y en la actualidad se ha especializado en las técnicas de resolución temporal.

Sería injusto no citar al Prof. Winefordner, de la Universidad de Florida, verdadero impulsor de los métodos espectroscópicos en química analítica, ya que ha destacado en numerosos campos y se han formado bajo su tutela, científicos de gran renombre, entre los que sobresale el Prof. Schulman (actualmente en la Universidad de Gainesville), dedicado al estudio de los equilibrios ácido-base de moléculas de interés biológico en estado excitado. También se formó con el Prof. Winefordner, Linda J. Cline Love, que si bien comenzó en 1981 trabajando en análisis espectrofluorimétrico de barbitúricos y otros fármacos, posteriormente se dedicó a la fosforimetría a temperatura ambiente.

En análisis de fármacos por espectrofluorimetría y cromatografía líquida con detección fluorimétrica, destaca desde hace años el Prof. Baeyens de la Universidad de Gante, con quien me une una intensa relación científica.

No podemos olvidar a nuestro compatriota el Prof. Arsenio Muñoz de la Peña, que durante largos años ha centrado su investigación en análisis espectrofluorimétrico de compuestos inorgánicos, ni al grupo de Karnes y O'Neal que se han especializado en el desarrollo de nuevos métodos fluoroinmunoanalíticos.

Ultimamente Otto S. Wolfbeis, ha aportado singulares avances a las técnicas espectrofluorimétricas, desde su faceta de profundo conocedor de la fluorescencia de productos naturales y ha abierto también una línea de gran futuro en el campo de los sensores con fibras ópticas y detección fluorimétrica.

Finalmente he de resaltar la creadora y fructífera labor del Prof. Imai, de la Universidad de Tokio, por haber aportado numerosos marcadores fluorescentes para la detección en cromatografía líquida, así como sus valiosos trabajos en el campo de la quimioluminiscencia, como técnica de análisis de catecolaminas, con la ayuda inestimable en los últimos cinco años, de nuestro becario postdoctoral Dr. Prados.

Nuestro equipo, inicialmente dirigido por el Prof. Ortega también ha aportado singulares trabajos en estos campos. No en vano el Prof. Portillo ya publicó su primer artículo en este ámbito en la década de los treinta, con un equipo que hoy consideraríamos como un rudimentario fluorómetro de filtros.

Entre los científicos españoles, dedicados a esta técnica dentro del campo de la química analítica, y con quien guardamos una estrecha colaboración, citaré a los profesores Valcárcel, Sanz Medel, Polo y Santana.

En el seno del CSIC, no podemos olvidar a uno de los pioneros en España del desarrollo científico de las espectroscopías de luminiscencia, el Prof. Ulises Acuña.

La fosforimetría quedó rezagada con respecto a la fluorimetría debido a la dificultad de empleo como método de análisis, ya que el uso de nitrógeno líquido para poder observar adecuadamente el fenómeno fosforescente, antaño hacía disminuir su precisión y exactitud, con respecto a la fluorimetría. Igualmente este hecho dificultó el estudio de las muestras de origen biológico. En consecuencia, los especialistas en esta técnica siguieron estudiando aspectos fundamentales, observando Sklar, en 1937, una débil absorción singulete-triplete en la molécula de benceno. Lewis y Kasha (1944) interpretan que el fenómeno de fosforescencia es debido a la desactivación del estado triplete excitado. Posteriormente McClure (1949) pone de manifiesto la influencia favorable de la presencia de átomos pesados en la emisión fosforescente, dando pie con ello a Evans (1955) para establecer la naturaleza paramagnética de las moléculas capaces de emitir fosforescencia.

El empleo de nitrógeno líquido en fosforimetría no fue obstáculo para que el equipo de Winefordner trabajase activamente entre 1960 y 1975 en LTP (Low Temperature Phosphorescence) para abordar problemas tan complejos como el análisis de fármacos en sangre. Es a finales de la década de los setenta, cuando los grupos de Miller y Schulman inician las determinaciones fosforimétricas a temperatura ambiente, inmovilizando los fosforóforos en matrices sólidas de celulosa y papel de filtro. Pero quien realmente impulsa la RTP es Cline Love, al poner de manifiesto que el empleo de medios organizados (micelas y ciclodextrinas) permite observar la fosforescencia en soluciones a temperatura ambiente, gracias al aislamiento y protección que ofrecen a los fosforóforos. Esta misma investigadora ha utilizado como técnica alternativa la "fosforescencia sensibilizada", valiéndose de la medida de la emisión nativa del biacetilo. Esta metodología supone un avance interesante como recurso para poder observar la fosforescencia en fluidos. En esta misma línea, los holandeses Velthorst y Frei, han empleado esta metodología para la detección fosforimétrica de diversos analitos en cromatografía líquida.

En 1983, el Prof. Hurtubise, uno de los colaboradores iniciales de Cline Love, propuso el empleo de papel de filtro tratado como medio soporte para observar y cuantificar la intensidad de fosforescencia emitida por los fosforóforos problema.

No cabe duda que todavía queda un largo camino por recorrer y que, a pesar de los muchos inconvenientes existentes, la investigación en este campo continúa; si se logra resolver definitivamente el problema que supone trabajar a bajas temperaturas, y la exactitud y precisión de la técnica alcanza los límites deseados, la fosforimetría podrá llegar a aventajar a la fluorimetría, puesto que las interferencias son menores, al poder medir tiempos de vida largos sin necesidad de irradiar la muestra constantemente.

Hasta la fecha de todas las alternativas propuestas, la que ha demostrado mejores perspectivas es la que emplea medios organizados. Debemos mencionar en este empeño al Prof. Lerner de la E.N.S.C. de Montpellier, con quien colaboramos activamente, empleando

soluciones micelares para observar, a temperatura ambiente, la luminiscencia de compuestos de gran significación biológica, como son el ácido retinoico y el retinal, cuya emisión hasta el momento solo se había descrito y caracterizado a bajas temperaturas.

5. SENSORES Y BIOSENSORES BASADOS EN FIBRAS OPTICAS

Prosiguiendo con la evolución histórica de las técnicas instrumentales analíticas, vamos a realizar una incursión en el mundo apasionante de las fibras ópticas, al que sin duda está ligado de una u otra forma nuestro futuro.

Se puede asegurar que a todos nos es familiar el término "fibras ópticas", aunque sólo sea por que muchas de las exploraciones médicas denominadas "endoscopias", permiten la introducción, de forma incruenta, de una fibra óptica en el organismo humano, como un sistema capaz de conducir la luz y enviar importante información al exterior.

Hoy en día, muchos especialistas médicos tienen estos dispositivos conectados a un sistema "inteligente" y, si lo deseamos, podemos ver "en pantalla" la mucosa de la laringe o del tracto gastrointestinal. Esta visualización, hace veinte años era prácticamente impensable y sin embargo en la actualidad, la tecnología disponible así lo permite. También es patente que la investigación en este campo requiere el concurso de especialistas de áreas muy distintas, en un terreno interdisciplinar, a la par que fascinante. La faceta que aquí abordaremos es quizá menos deslumbrante que la relacionada con los avances médicos, pero no por ello menos importante.

5.1. INTRODUCCION

Un sensor es un dispositivo capaz de responder de forma continua y reversible a la variación de un parámetro fisicoquímico o a la variación de la concentración de una determinada especie química. Numerosos ejemplos pueden ilustrar esta definición, tales como un termómetro de mercurio, que actúa como un sencillo sensor mecánico, que responde a la variación de temperatura y como consecuencia produce la dilatación del mercurio; un electrodo de vidrio sensible a protones, como sensor electroquímico, que responde a la variación de la concentración de protones y consecuentemente genera una respuesta eléctrica, que modifica la fuerza electromotriz de la pila o una tira indicadora de pH, como sensor óptico, respondiendo a una variación en la concentración de protones, que produce un cambio de color en el indicador ácido-base adsorbido en la tira de papel reactivo. En cualquiera de los tres ejemplos citados el sensor se introduce directamente en la muestra y el resultado se obtiene en un período de tiempo corto. No es necesario operaciones de muestreo, adición de reactivos, diluciones, etc.. Por tanto la principal característica de estos sensores, es que no introduce los errores propios de estas operaciones analíticas.

La búsqueda de nuevos sensores para compuestos de interés analítico es objeto de investigación constante, ya que el empleo de éstos, además de las ventajas citadas, supone un considerable ahorro, en tiempo de análisis y de personal, con respecto a los métodos clásicos. Así, incorporados a sistemas automatizados en los laboratorios de análisis químico o de alimentos, en aeronáutica o en centrales nucleares, se evitan riesgos, se gana tiempo y hay un menor costo económico, a largo plazo.

Ciertos dispositivos que no pueden actuar de forma completamente reversible también se denominan sensores; sin embargo es más correcto denominarlos "sondas" o "marcadores",

aunque en muchos casos no esté clara la frontera entre ambos conceptos. Es importante señalar también que existe un tipo de sensores, que están diseñados para ensayos acumulativos, denominados "dosímetros".

Existe una gran variedad de dispositivos capaces de responder a calor, luz, aniones, cationes, gases, transferencia de electrones o de masa, cambios en la conductividad eléctrica, despolarización de la luz, etc..

Entre todos éstos, los sensores basados en procesos y métodos electroquímicos, son los más avanzados y los más ampliamente difundidos. Ejemplos bien conocidos son los electrodos sensibles a pH o a gases (CO₂). Cambiando reversiblemente el pH de una solución de bicarbonato, se puede detectar el CO₂ a través de la variación del pH. Hay electrodos sensibles a protones que permiten detectar biomoléculas, en cuya transformación se generen o se consuman protones. Los electrodos selectivos han permitido ampliar el campo de aplicación de las potenciometrías, surgiendo así, lo que se ha venido en denominar "electrodos selectivos de segunda generación", que se pueden emplear para análisis directos *in vivo* de sodio, potasio, calcio, etc., en sangre. Los sensores amperométricos también se han aplicado a la determinación de oxígeno o de biomoléculas que participan en reacciones enzimáticas, en las que se consume o se genera oxígeno.

Otros prometedores campos en donde se emplean sensores, sin ser de naturaleza óptica, son aquellos basados en el efecto piezoeléctrico o en técnicas calorimétricas. Cada uno de ellos posee indudables ventajas y un prometedor campo de aplicación.

5.2. SENSORES OPTICOS

Los métodos ópticos han ocupado siempre un campo muy amplio dentro del análisis químico. Así, la colorimetría, la fotometría y los ensayos cualitativos con reactivos coloreados, han sido frecuentemente utilizados para determinar numerosos compuestos, tanto de interés químico como bioquímico.

Entre los sensores ópticos, quizás los mejor conocidos son las tiras indicadoras de pH. En la década de los treinta Kautsky e Hirsch diseñaron un sensor para detectar niveles bajos de oxígeno. Estos autores hallaron que el oxígeno molecular amortigua e incluso anula la señal de fosforescencia de colorantes como la tripaflavina y la fluoresceína. A presiones tan bajas como 0,0005 torr, la fosforescencia es todavía amortiguada por el O₂, sin embargo la eliminación del mismo, permite observar la fosforescencia de estos dos colorantes, adsorbidos sobre celulosa o gel de sílice, en el intervalo de 1 ó 2 segundos. Este efecto fue utilizado para la detección *in situ* de los bajos niveles de O₂ producidos en los complejos estudios de la fotosíntesis.

Bergman también se valió del efecto de amortiguación de la fluorescencia de los hidrocarburos aromáticos por el oxígeno molecular, para diseñar un dispositivo capaz de detectar, de forma continua, la variación en los niveles de O₂ por encima de 1 torr.

Lübbers y Opitz han empleado ácido pirenobutírico como sensor de O₂, de forma similar a la descrita por Bergman, introduciendo el primer sensor óptico para CO₂, consistente en un dispositivo indicador de la variación de pH, basado en un cambio óptico. Para ello, en una membrana de teflon de 6 μm se introduce una solución de 6-metilumbeliferona, disuelta en tampón bicarbonato 1 mM. El CO₂ gaseoso cambia el pH de la solución tampón y el indicador fluorescente acusa este cambio de pH.

Diversos autores han adoptado dos términos para definir estos dispositivos: **optodo**, en el sentido de camino óptico o paso óptico y **optrodo**, de electrodo óptico. Ambas expresiones nos dan idea de que la primera información obtenida es más óptica que eléctrica.

5.3. SENSORES DE FIBRAS OPTICAS

El avance más significativo, en el campo de los sensores, se ha producido cuando las técnicas convencionales de detección se han acoplado a las fibras ópticas. Estas se hallan en una fase de continuo desarrollo y utilización en el ámbito de la telecomunicación, ya que permiten transmitir señales luminosas a grandes distancias.

Las fibras ópticas se basan en el fenómeno de la **reflexión total interna**. En esencia, cualquier fibra óptica consta de un cuerpo central formado por un material de índice de refracción n_1 rodeado de una cubierta de material de índice de refracción (n_2) más bajo que el de la parte central. Este conjunto se halla recubierto por una "camisa" o envoltura inerte, que no tiene efecto alguno sobre la transmisión de la radiación electromagnética. La luz incidente es transmitida por el canal central de la fibra, siempre y cuando incida en la cubierta con un ángulo superior al ángulo crítico (θ_c); de esta manera, se produce un fenómeno de **reflexión total interna** en la interfaz que une el material de la parte central y el de la cubierta.

El conjunto de radiaciones que penetra en la fibra óptica, depende de la diferencia entre los índices de refracción del material de la parte central y del de la cubierta, así como también del índice de refracción (n_0) del medio externo. Así:

0

El intervalo de ángulos que son admitidos por la fibra, dando lugar al fenómeno de reflexión total, se denomina **apertura numérica** (AN), que se define según la siguiente expresión :

$$AN = n_0 \sin \theta_a$$

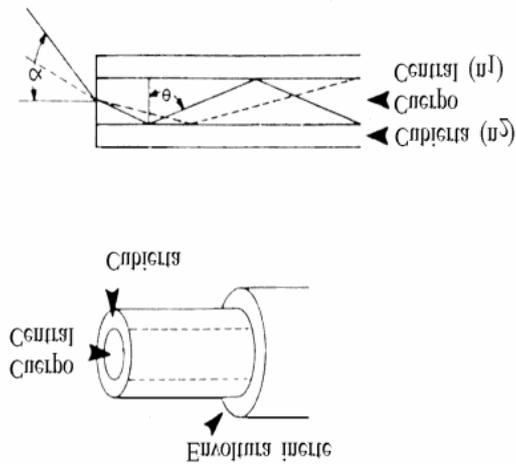
En general, las fibras ópticas más empleadas se suelen agrupar, en tres apartados:

- Fibras multimodales de índice discreto.
- Fibras multimodales de índice gradual.
- Fibras unimodales de índice discreto.

En la fig. 1 se representa la forma de propagación de la luz, en la que no se consideraron los fenómenos de interferencias; es una aproximación, ya que un tratamiento riguroso requiere la solución de las ecuaciones de Maxwell, sin embargo es válido, ya que la conclusión es que la luz se propaga de un modo discreto dentro de la fibra óptica. Así, cada haz corresponde a un único ángulo de incidencia, el cual tiene una distribución característica de los vectores campo eléctrico y campo magnético, de tal forma que un rayo no interfiere consigo mismo.

Sin embargo no todos los haces que penetran en la fibra óptica se propagan a igual velocidad. Aquellos cuyo ángulo de incidencia es mayor, se propagan más lentamente, debido a que tienen que recorrer una distancia mayor para alcanzar el final de la fibra óptica. Este efecto se denomina **dispersión modal** y el número posible de modos de transmisión (N_m), está relacionado con la apertura numérica (AN) y el diámetro (d) de la fibra, por la expresión:

$$N_m = 0,5(\pi d AN / \lambda)^2$$



0

Fig. 1.- Esquema de una fibra óptica y forma de propagación de la luz en la misma.

Además de la dispersión modal, también se produce **dispersión cromática** o **refractiva**, debido al descenso del índice de refracción al incrementarse la longitud de onda. Tanto la apertura numérica como la dispersión modal pueden reducirse, disminuyendo la diferencia entre los índices de refracción n_1 y n_2 y el diámetro de la fibra, y así en las fibras unimodales, el diámetro es tan pequeño (3 - 5 μm) que sólo se puede propagar un único modo. Una alternativa adecuada es el empleo de fibras multimodales de índice gradual.

En combinación con las fibras ópticas en si mismas, se requiere una amplia diversidad de accesorios para realizar los análisis. Así pues, se necesitan una serie de correctores entre la interfaz de la fibra y las fuentes de radiación, bien sean de tipo láser o de otro tipo. En cualquier caso, el objetivo de estos correctores es lograr que las pérdidas sean mínimas. Es muy frecuente el empleo de dispositivos no convencionales, que sean capaces de descomponer las distintas longitudes de onda que forman parte de un paquete de radiaciones, para actuar como si de un monocromador se tratase.

En la figura 2 se muestra un esquema de como actúa y los elementos que son necesarios en un sensor de fibras ópticas. En esencia, la radiación que proviene de la fuente, es transmitida a través de las fibras ópticas a las zonas donde se ha de explorar y muestrear; la radiación modificada o generada, retorna y es conducida por la fibra óptica hacia el desacoplador, siendo posteriormente filtrada y detectada.

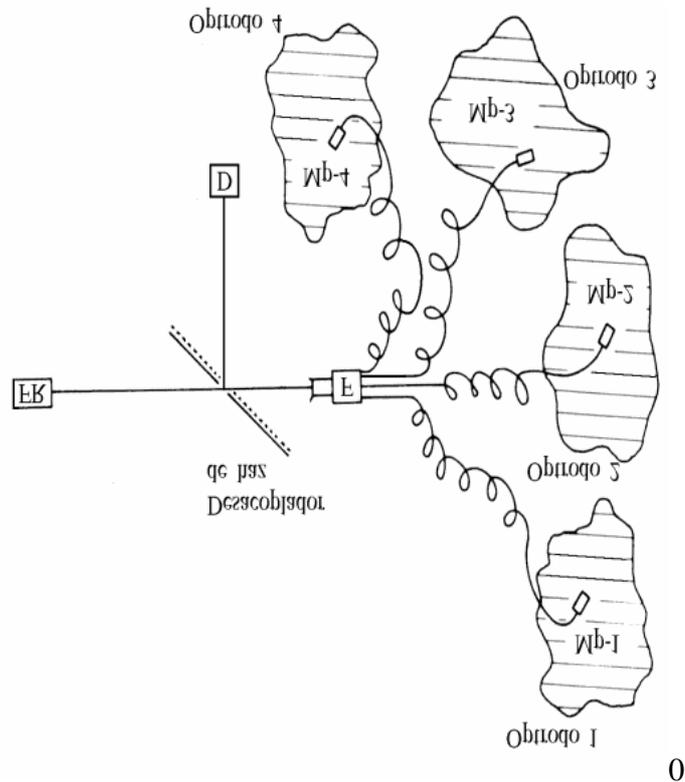


Fig. 2.- Disposición para análisis remoto de varias muestras. Fuente de radiación (FR), detector (D), filtro (F) y muestras problema (Mp).

Aunque las fibras ópticas se han popularizado desde hace relativamente poco tiempo, sin embargo han sido utilizadas como sensores invasivos, como una "pipa de luz" para explorar cavidades de indudable interés anatómico y fisiológico. Si bien más adelante comentaremos otros ejemplos, cabe citar en este momento que el proceso de oxigenación de la sangre se pudo estudiar midiendo la reflectancia de la hemoglobina y de la oxihemoglobina, con ayuda de fibras ópticas. Análogamente la velocidad de salida de la sangre del corazón también se pudo determinar estudiando la distribución de colorantes fluorescentes en la sangre.

Probablemente fue Hesse, en 1974, quien, basándose en fenómenos de *quenching* de fluorescencia, por primera vez describió el empleo de fibras ópticas como sensores de diversas especies químicas. Peterson y sus colaboradores describieron en 1980 la construcción y desarrollo de un sensor para la medida del pH *in situ*, mediante un catéter de este tipo en organismos vivos. Hirschfeld y su grupo, en el periodo comprendido entre 1980-1983, pusieron de manifiesto el gran potencial que podían representar las fibras ópticas aplicadas a la química y a la biomedicina.

Wolfbeis comenzó a destacar en este ámbito, en el año 1978, utilizando como sensores compuestos naturales, cuya fluorescencia es sensible al pH o a la amortiguación por el oxígeno molecular. En los últimos diez años, en paralelo al desarrollo de los sensores químicos de fibras ópticas, también se han desarrollado numerosos sensores de esta naturaleza, basados en la variación de determinadas propiedades físicas, tales como temperatura, presión, campos eléctricos y magnéticos, rotación óptica, etc.

5.3.1. Clasificación de los sensores

El primer sensor diseñado para recoger información a través de fibras ópticas, según Wolfbeis, se basó en la alteración específica de una propiedad física o química, que ocasiona una modificación en la señal transmitida por ellas. El campo de aplicación de las fibras ópticas en química analítica se incrementó cuando los métodos espectroscópicos clásicos se acoplaron a esta nueva tecnología, consecuentemente el cambio en la transmisión de la luz por las fibras ópticas y su utilidad analítica se extendió a compuestos orgánicos e inorgánicos de indudable interés clínico y biomédico. Estos compuestos a analizar pueden tener un color o fluorescencia intrínseca o bien se puede producir en ellos un cambio detectable en las propiedades ópticas de un indicador, para producir una respuesta que se transmita a través de las fibras ópticas. Estos dispositivos son conocidos como **sensores extrínsecos** y se pueden subdividir como de primera, segunda y tercera generación.

En los sensores de **primera generación**, la fibra óptica "simplemente" conduce la radiación electromagnética. De esta forma se pueden realizar, "a larga distancia", análisis espectrofotométricos de cualquier compuesto que sea capaz de absorber o emitir luz, siempre y cuando esta propiedad pueda distinguirse fácilmente del fondo. Así el compuesto a analizar proporciona la información analítica directamente (Fig. 3a). Este tipo de sensores se conocen también con el nombre de **sensores de fibra plana, sensores de fibra óptica descubierta u optrodos pasivos**. Un ejemplo del empleo de estos sensores es la determinación continua de ion cobre (II), midiendo su absorción a 800 nm en una pequeña célula de flujo, en la que el paso de luz queda ceñido entre los terminales de dos fibras ópticas. Otro aspecto lo constituye la detección de compuestos contaminantes en aguas superficiales y subterráneas, por ejemplo, midiendo la fluorescencia intrínseca del ion uranilo.

Sin embargo, hay una gran cantidad de especies químicas, cuyo análisis tiene gran importancia y que desafortunadamente no presentan una propiedad óptica definida, como absorción o emisión de luz, entre otros O_2 y H^+ ; en principio, estos compuestos no podrían ser analizados directamente con un sensor. Así pues, se han desarrollado sensores de fibras ópticas en los cuales la información analítica se genera teniendo como intermediario algún tipo de indicador químico (Fig. 3b). Estos sensores también se conocen como **sensores de segunda generación u optrodos activos**. Un ejemplo típico de éstos, son los sensores de pH, en que un indicador de pH clásico, se inmoviliza sobre el extremo terminal de la fibra óptica. Un subgrupo de los sensores de segunda generación son los llamados **sensores reservorio**, en que un compuesto puede generar color o fluorescencia, por adición de un reactivo adecuado; este tipo de sensores se construyen de forma que en el extremo terminal de la fibra óptica haya un espacio que permita la adición continua de un determinado reactivo. La reacción, entre el reactivo y el compuesto a analizar, produce un cambio en las propiedades ópticas de la solución reactiva contenida en el reservorio, siendo esta modificación recogida y transmitida por la fibra óptica.



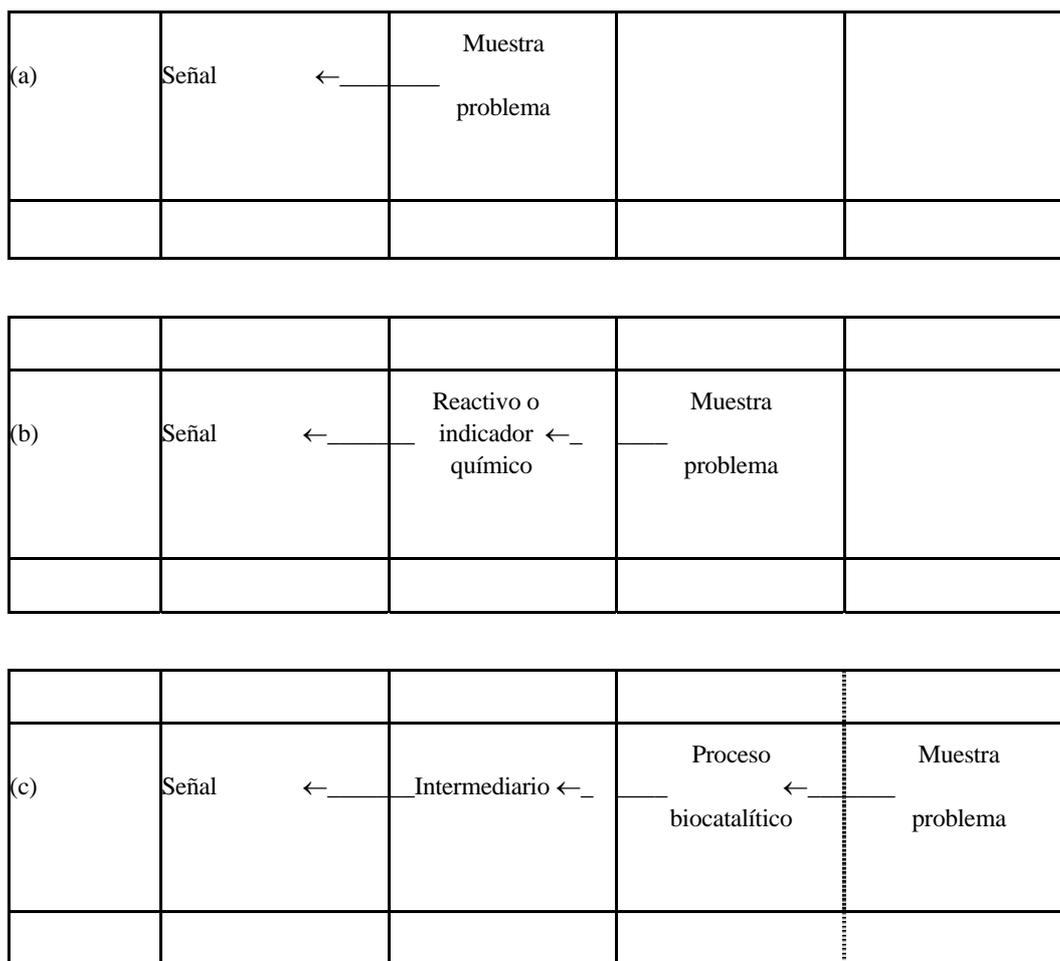
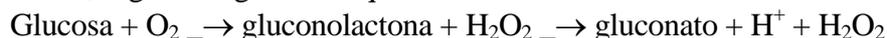


Fig. 3.- (a) Sensores de primera generación u optrodos pasivos. (b) Sensores de segunda generación u optrodos activos. (c) Sensores de tercera generación.

Desafortunadamente no son muchos los indicadores que al reaccionar con un analito produzcan cambios de color de forma reversible. Hay otros casos en que, para que se produzca este cambio en las propiedades ópticas del reactivo, es necesario el empleo de condiciones drásticas, lo cual no es deseable. En otros casos la respuesta no es todo lo específica que cabe desear. Con la intención de superar estas dificultades, y poder analizar también compuestos de interés biológico con la especificidad deseada, han surgido los llamados **sensores de tercera generación** (Fig. 3c). En estos sensores, generalmente se asocia un proceso biocatalítico, bien a un sensor plano o a un sensor con indicador químico. Un ejemplo del funcionamiento de este tipo de sensores, son los utilizados para la detección de glucosa, que la detectan mediante reacción enzimática, según el siguiente esquema:



La producción de H^+ o H_2O_2 o bien el consumo de O_2 puede seguirse mediante los cambios ópticos que se producen por la presencia o ausencia de estos compuestos.

De los ejemplos anteriormente expuestos se deduce que el tiempo de respuesta se incrementa con la complejidad del sensor.

Otra posible clasificación de los sensores de fibras ópticas está basada en la naturaleza

del proceso óptico que se evalúa. Así se puede diferenciar entre sensores de fibras ópticas que detectan variaciones de absorbancia, reflectancia, intensidad de luminiscencia, tiempo de vida de luminiscencia, índice de refracción, intensidad de la radiación dispersada (*scattering* o Raman), etc.. En general, todos los métodos espectroscópicos no destructivos pueden ser aplicados utilizando fibras ópticas. Las regiones del espectro electromagnético de mayor utilidad analítica son la ultravioleta, la visible, el infrarrojo próximo y el infrarrojo fundamental.

Se puede realizar otro tipo de clasificación atendiendo al campo de aplicación, en este caso distinguiremos **sensores químicos, biosensores basados en reacciones enzimáticas e inmunosensores**. El término biosensores se aplica, a veces, para designar a toda clase de sensores empleados en estudios de sistemas biológicos, como por ejemplo los optrodos empleados en la medida del pH y de la concentración de oxígeno, en fluidos biológicos. No obstante, según Wolfbeis, es más adecuado llamar biosensores a aquellos donde una enzima, coenzima o una proteína esté implicada en el desarrollo de la señal. Los inmunosensores constituyen un grupo en el cual la señal analítica es consecuencia de una reacción antígeno-anticuerpo y donde normalmente no está implicada una reacción química, sino una reacción inmunológica específica.

Para finalizar este apartado comentaremos dos aspectos relacionados con la fabricación de sensores de fibras ópticas. Está descrito un tipo de construcción en que, la fase química responsable de la reacción analítica se fabrica de forma separada de la fibra óptica; se inmoviliza el reactivo químico sobre vidrio, celulosa o plástico y el conjunto se une mecánicamente (normalmente se pega) a la fibra óptica que transportará la señal luminosa. En el otro tipo de construcción, el reactivo químico se une directamente a la fibra óptica y se recubre después; para que la sustancia química quede al descubierto, se ha de eliminar una parte de la cubierta de uno de los extremos de la fibra óptica. Este procedimiento tiene la ventaja de ser más reproducible y permite su fabricación en serie, seguido de un exhaustivo control de calidad. Sin embargo la fabricación del primer tipo de sistemas se utiliza más en investigación, ya que permite la reutilización de la fibra óptica en distintos tipos de análisis, con sólo intercambiar la superficie sensora o reactiva.

5.3.2. Características analíticas

Los optrodos no necesitan una señal de referencia como se requiere en potenciometría, donde se determina la diferencia entre dos valores absolutos de potencial. La necesidad de electrodos de referencia, en el caso de los sensores potenciométricos, los hace menos adecuados para ser utilizados como sondas portátiles.

La fácil miniaturización, permite el desarrollo de sensores de fibras ópticas de reducido tamaño, flexibles y que transmiten la luz eficazmente. Este punto tiene especial relevancia y utilidad para el caso de muestras, donde el volumen a analizar es extremadamente pequeño o bien en el diseño de catéteres invasivos para la determinación de parámetros y constantes de interés clínico. En la actualidad se dispone de cabezas de sensores de fibras ópticas, mecánicamente estables, de menor tamaño que cualquier sensor electroquímico.

Al ser muy bajas las pérdidas de luz que se producen, se permite la transmisión eficaz de señales ópticas a largas distancias (10 m - 1000 m); cuando se necesita transmitir a distancias más largas se han de emplear amplificadores, de los típicamente usados en telecomunicación óptica. De esta manera los "sensores remotos" permiten análisis en muestras difíciles de alcanzar, peligrosas, así como en instalaciones contaminadas o radiactivas. Empleando sensores

de fibras ópticas, puede decirse que "el instrumento se acerca a la muestra más que la muestra al instrumento".

Puesto que la señal generada es óptica, no habrá interferencias debidas a la electricidad estática del manipulador, ni tampoco a campos magnéticos intensos, ni a los potenciales de superficie originados en la cabeza del sensor. Por otra parte las fibras no presentan riesgo, ya que no hay conexiones eléctricas. Los análisis son bastante rápidos, puesto que no es necesario el muestreo.

Con un único instrumento de control, se pueden realizar análisis múltiples, ya que las distintas sondas pueden recoger las señales de diferentes muestras, las cuales se modulan mediante un *chopper* o desacoplador de haz. De esta forma, como la respuesta está centralizada en un solo instrumento, se asegura el calibrado y mantenimiento.

El acoplamiento de sensores para distintos compuestos a analizar, permite la producción de señales distintas para cada uno de ellos, de forma simultánea y sin interferencias mutuas.

En muchos casos la cabeza del sensor no consume el compuesto a analizar a una velocidad medible, como ocurre en los electrodos polarográficos. Este hecho es particularmente importante en el caso de volúmenes extremadamente pequeños.

Los sensores de fibras ópticas deben considerarse métodos analíticos no destructivos, excepto algunos optrodos de tipo "reservorio".

Los sensores de fibras ópticas que actualmente se fabrican, utilizan materiales de excelente estabilidad, aún estando en contacto permanente con las soluciones electrolíticas más diversas o sometidas a elevados niveles de radiación.

Hoy día se están desarrollando nuevos sensores para la detección de numerosos compuestos químicos para los que no se dispone de electrodos convencionales.

Un sensor de fibra óptica puede transmitir mucha más información que un conductor eléctrico, ya que las señales ópticas pueden diferenciarse bien por su longitud de onda, fase, tiempo de caída, polarización o modulación de la intensidad. Una única fibra óptica, en principio, puede conducir y guiar un gran número de señales simultáneamente. En la práctica una sola fibra óptica puede utilizarse para el análisis de varios compuestos a la vez, ya que diferentes indicadores pueden generar o responder a distintas señales analíticas. Así se ha diseñado, y de hecho se utiliza en clínica, un sensor capaz de responder a O_2 y CO_2 .

Si bien los optrodos de pH tienen un intervalo dinámico mucho más pequeño que el de los electrodos, los sensores de fibras ópticas basados en el *quenching* de fluorescencia tienen un intervalo dinámico mucho más amplio que los sensores electroquímicos, mostrando los (sensores de fibras ópticas) sensibles a O_2 mucha mejor precisión que el clásico electrodo de Clark, para valores de presión por encima de 200 torr.

Muchos sensores de fibras ópticas son de diseño sencillo y algunas de sus partes se pueden sustituir fácilmente, aunque la fabricación de la cabeza del sensor requiera una manipulación química relativamente complicada. Otra ventaja adicional es el costo, por lo que es probable que en el futuro se lleguen a emplear sensores de fibras ópticas portátiles de un solo uso. La mayoría de estos sensores pueden emplearse en intervalos amplios de temperatura, mientras que los electrodos clásicos presentan una notable dependencia de dicho parámetro. Muchos sensores para pH y O_2 se esterilizan fácilmente.

La posibilidad de empleo de fibras ópticas acopladas a sistemas fluoroinmunoanalíticos es notable y bien demostrada, aunque tengan muy reducida reversibilidad y deban considerarse más "sondas" que sensores.

En resumen los sensores de fibras ópticas, constituyen una potencial y atractiva

alternativa a otros métodos y ofrecen una gran variedad de nuevas posibilidades.

5.3.3. Aplicaciones

Se debe diferenciar entre las fibras ópticas planas, utilizadas como pipas de luz y los verdaderos optrodos. Las fibras ópticas planas se usan en todos los campos donde los métodos ópticos clásicos de análisis tienen utilidad, con la ventaja adicional de poder llevar a cabo los análisis a largas distancias. Así pues, existen diversas fábricas en EE.UU., Francia, Suecia y otros países, que ya han comercializado la instrumentación adecuada para la obtención y realización de estas medidas en la región UV-VIS. También se han diseñado diversos sistemas de detección de especies radiactivas, así como de muestras explosivas o peligrosas en general. Igualmente se emplean para análisis a distancia, en tanques de fermentación, en ciertos estudios de geología marina.

Los optrodos, como sensores con fase indicadora, ofrecen un mayor campo de aplicación y son potencialmente útiles para cualquier clase de problema analítico, incluyendo aquellas áreas en que los electrodos ya han sido utilizados con preferencia. Ejemplos típicos de su aplicación están en los laboratorios de control de calidad, estudios de contaminación ambiental, análisis de aguas, biotecnología, química clínica y técnicas biomédicas invasivas. Su capacidad para transmitir señales a larga distancia hace posible su utilización en análisis de muestras difícilmente accesibles a ciertos instrumentos.

A continuación comentaremos algunos ejemplos de las aplicaciones de estos sistemas.

- *Control de aguas subterráneas*

Dado que es necesario un control exhaustivo de las aguas de uso doméstico e industrial, cada día existe mayor interés por el control y análisis de las aguas subterráneas. Por ello se ha propuesto el empleo de sensores de fibras ópticas para determinar pH, cloruros, radiactividad, contaminantes orgánicos y diversos compuestos que se encuentren en ellas, incluso en cantidades traza. Muchas fibras ópticas pueden acoplarse a un espectrofotómetro de localización central situado a una distancia de 1 km, de esta manera podrían acoplarse hasta cincuenta terminales a un sistema central de análisis, realizando las medidas *in situ* a un precio relativamente razonable.

Cuanto más pequeño sea el diámetro de la fibra óptica más unidades se pueden aplicar a un sistema central, estando demostrado que este sistema, en plantas de análisis de centrales nucleares, permite un ahorro económico importante. Por otra parte, las muestras pueden ser analizadas *in situ*, en un tiempo corto, sin contaminación radiactiva alguna, salvo en la zona externa de la fibra óptica. Por tanto, en el control de las aguas residuales, en las instalaciones nucleares, los peligros asociados a la toma de muestras quedan reducidos de forma importante, ya que aunque la fibra óptica sea dañada por la radiación, resulta más fácil y económico reemplazarla por otra, en vez de tener que adquirir e incorporar todo el sistema completo de análisis.

Los principios del análisis de aguas subterráneas y estudios geológicos por medio de fibras ópticas, están actualmente en pleno desarrollo, habiéndose propuesto el empleo del marcador fluorescente rodamina 6 G para estudiar la variación del pH del agua, y determinación de analitos en concentraciones del orden de picomoles, empleando láseres como fuentes de excitación.

- *Análisis de contaminantes ambientales*

Este campo presenta facetas inexploradas y muy atractivas, ya que el empleo de fibras ópticas permite la determinación continua de compuestos en zonas alejadas del laboratorio de análisis, tal es el caso de hidrocarburos aromáticos policíclicos y de sus productos secundarios, producidos en numerosos procesos industriales de combustión. De forma análoga, pueden analizarse los vertidos de diverso origen en aguas marinas.

Está descrita la determinación de clorofila en el fitoplancton, que puede llevarse a cabo mediante un sensor de fibra óptica basado en la fluorescencia inducida por láser. Esta técnica permite realizar los llamados "mapas del agua", en zonas lejanas al laboratorio, tanto en océanos como en aguas continentales. Así se puede llegar a conocer la abundancia, distribución y actividad biológica de las aguas naturales en muy amplias zonas, simplemente con monitorizar y analizar el contenido de estas aguas a distintas profundidades.

Otro aspecto muy relevante de los estudios de contaminación ambiental se refiere al desarrollo de fibras ópticas sensibles a las variaciones de la concentración de contaminantes, presentes en el aire, que se van acumulando con el paso del tiempo (dosímetros). Así se han desarrollado sensores que responden a formaldehído, amoníaco, óxidos de nitrógeno, cloroformo, dióxido de azufre, ácido sulfhídrico y distintos hidrocarburos.

- *Control de calidad*

La producción eficaz y la calidad del producto terminado, son factores críticos en cualquier industria y ambos son dependientes de exhaustivos procesos de control de calidad. Con mayor frecuencia, los sensores en línea (*on line*) van sustituyendo a las técnicas clásicas de análisis, produciéndose un desplazamiento del laboratorio de control de calidad al de fabricación, para realizar el proceso de control de calidad simultáneamente con el de fabricación. En términos económicos, estos hechos se traducen en una menor inversión en reactivos.

Otro aspecto a tener en cuenta es que las fibras ópticas no presentan el menor riesgo de originar incendios, lo cual es una ventaja indiscutible cuando es necesario realizar análisis en ambientes donde hay riesgo de explosiones.

Por otra parte la mayoría de los sensores utilizados en los procesos de control continuo están recubiertos de materiales resistentes, especialmente para poder trabajar en condiciones extremas, con variaciones fuertes de temperatura, así como exposición larga a compuestos químicos agresivos, en que con un mínimo de mantenimiento son útiles durante largos periodos de tiempo. Además durante mucho tiempo no es necesario hacer recalibrados ni ajustes.

Cuando estas fibras ópticas se van a emplear en procesos de control de calidad, en laboratorios donde se trabaja con material biológico, se ha de prestar mayor atención a la facilidad de esterilización que a las características físicas y químicas de las mismas. Hay que reseñar que en este campo se ha producido un gran avance en los últimos años.

- *Análisis biomédicos*

La aplicación de los sensores de fibras ópticas en este campo, es amplia y atractiva, ya que se pueden analizar compuestos de indudable interés bioquímico y clínico, tales como gases en sangre, electrolitos, metabolitos, enzimas, coenzimas, inmunoproteínas, bacterias e inhibidores. Los optrodos están siendo profusamente utilizados en la monitorización, *in vivo* y

en continuo, de diversos compuestos en sangre, especialmente en estados patológicamente críticos. También se emplean en el análisis *in vitro* de los mismos.

La medida de algunos parámetros rutinarios, tales como pH, oxígeno, dióxido de carbono y presión sanguínea, está muy bien establecida y desarrollada en la actualidad, en cuanto a principios y práctica se refiere. No obstante, cabe esperar mejoras en cuanto a biocompatibilidad, estabilidad de las señales, sencillez de calibración y esterilización. Durante la pasada década, se han desarrollado numerosos métodos de análisis de electrolitos, proteínas totales, urea, glucosa, creatinina, colesterol y triglicéridos, de tal manera que con estos sensores es posible analizar y registrar directamente los resultados obtenidos. Además de estos analitos, que se encuentran a una concentración relativamente elevada, en la actualidad se tiende a la búsqueda de sensores e inmunosensores capaces del análisis de compuestos presentes a concentraciones mucho más bajas, tal es el caso de hormonas, esteroides, compuestos intermedios y metabolitos de la función tiroidea, así como compuestos de interés que aparecen en el transcurso del embarazo, que pueden ayudar a la detección precoz de ciertas enfermedades hereditarias.

La monitorización de fármacos es otro campo muy atractivo. El análisis de fármacos en sangre, en enfermedades crónicas, y el control de sus niveles se ha extendido notablemente en los últimos años. La mayoría de las técnicas empleadas en estos análisis están basadas en reacciones enzimáticas o inmunológicas, combinadas con un método óptico espectroscópico, que sea suficientemente sensible y selectivo, como la fluorimetría. Los biosensores basados en reacciones enzimáticas acopladas a sensores convencionales, para detectar variaciones de pH o bien concentraciones de oxígeno, son de gran utilidad en la determinación de compuestos de relativamente bajo peso molecular, mientras que los inmunosensores basados en reacciones antígeno-anticuerpo, se emplean con mayor éxito en la determinación de compuestos de peso molecular más elevado. La principal ventaja de los inmunosensores es la selectividad que impone la reacción antígeno-anticuerpo. Este campo ofrece numerosas posibilidades, estando descrita la determinación analítica de bilirrubina, esteroides, albúmina y enzimas, basándose en métodos de "enlace a anticuerpos".

No obstante, es en el campo de la química clínica, donde más claramente están en competencia, en la actualidad, los electrodos y los optrodos, en sus distintas modalidades (absorción, fluorescencia, NIR, FT - IR, etc.).

- Biotecnología

Se están llevando a cabo numerosos esfuerzos para el diseño y puesta a punto de sensores para oxígeno, pH, pCO₂, glucosa y glutamato en plantas de fermentación industrial, empleando electrodos clásicos y electrodos basados en biosensores. Sin embargo, la necesidad de esterilización y el hecho de que los biosensores estén cubiertos de proteínas y biomasa, sólo les permite ser útiles durante cortos periodos de tiempo, lo que hace que las condiciones de utilización de este tipo de sensores sean demasiado restringidas. Por ello, en la actualidad, se están diseñando fibras ópticas incorporadas a sistemas capaces de resistir temperaturas de esterilización comprendidas entre 115 y 130° C. La necesidad de esterilización es la mayor dificultad práctica, especialmente en aquellos sensores en que intervienen catalizadores. En estos casos, la alternativa es incorporar el biosensor a un sistema de análisis por inyección en flujo (FIA).

- Volumetrías

La bibliografía reciente demuestra que los optrodos pueden reemplazar a los electrodos en el seguimiento de numerosas reacciones ácido-base, de precipitación, bromometrías, iodometrías, redox y complejometrías. Generalmente hay dos formas de desarrollar la valoración. La primera consiste en incorporar un indicador y observar el cambio de color del mismo, lo cual es puesto de manifiesto a través de la fibra óptica. Este método tiene la ventaja de su economía, puesto que las fibras ópticas son mucho más baratas que los electrodos y los sistemas de detección óptica y electroquímica tienen un precio similar. En la segunda modalidad, el indicador específico del analito, está inmovilizado en el extremo de la fibra óptica, la cual se introduce en la solución durante la valoración. De esta forma se puede determinar el punto final de la valoración con la misma precisión que en los métodos electroanalíticos.

- Otras aplicaciones

Para finalizar comentaremos un aspecto menos atractivo, pero no menos útil que los anteriormente comentados con relación a las fibras ópticas; se trata de su empleo en aspectos relacionados con la defensa. Así, se pueden detectar y analizar sustancias que son transportadas por el viento, fundamentalmente utilizadas en la guerra biológica, que generen especies químicas que participan en algún tipo de reacción inmunoanalítica.

Asimismo ha de señalarse que también se pueden unir una serie de fibras ópticas para obtener imágenes *in situ* de los sistemas objeto de estudio y en este sentido se encaminan los últimos trabajos en este área, para establecer localizaciones estratégicas en entornos hostiles.

5.4. SENSORES FLUORIMETRICOS

Un sensor fluorimétrico será aquel dispositivo que incorpore un compuesto fluorescente capaz de monitorizar de forma continua y reversible los cambios en la concentración de analito o la variación de un parámetro físico o fisicoquímico, y en consecuencia originar una variación de sus características fluorescentes. La forma de monitorizar estas variaciones en la concentración, puede obedecer a cambios espectrales, incremento o descenso en la intensidad de emisión fluorescente y variaciones en el rendimiento cuántico de fluorescencia y tiempo de vida de fluorescencia.

- Sensores de polaridad

Los espectros de absorción UV-VIS y de fluorescencia contienen información sobre las posibles interacciones soluto-solvente. Los cambios y desplazamientos en los espectros de absorción, como consecuencia de este tipo de interacciones, se conocen con el nombre de "solvatocromismo" o "efecto solvatocrómico".

Kosower fue el pionero en utilizar el efecto solvatocrómico para efectuar la medida de la polaridad del solvente, empleando como sensor de polaridad el yoduro de 1-etil-4-carbometoxipiridinio. El parámetro "Z" de Kosower, indicativo de polaridad, se calcula según la expresión:

donde λ_{max} es la longitud de onda del máximo de absorción expresada en nm.

Otro parámetro indicativo de polaridad es E_T , que corresponde al valor de la energía de transición para el fenóxido de 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenilpiridinio), también conocido como betaína de Dimroth - Reichardt. El parámetro E_T se calcula de forma parecida a Z , apreciándose una buena correlación lineal entre los desplazamientos espectrales y Z . Para este sensor se produce un desplazamiento hipsocrómico al aumentar la polaridad del solvente.

Otros sensores de polaridad de interés son los nitróxidos, las merocianinas y algunas sales de amonio cuaternario, tales como las derivadas de 4-dialquilamino-4'-azaestilbeno, y algunos derivados de sales de quinolizinio.

- Sensores de pH

Se sabe que los indicadores fluorescentes de pH son más sensibles que los de absorción; se debe en parte a que la sensibilidad en las determinaciones espectrofluorimétricas, es mayor que en las absorciométricas. Por ello, aunque los indicadores fluorescentes aventajan a los absorciométricos, sin embargo su utilidad práctica es más limitada, debida a que un cambio de color se detecta de forma visual, mientras un cambio en la emisión fluorescente requiere un proceso de detección más sofisticado. Actualmente el desarrollo de sensores de fibra óptica ha permitido, con gran éxito, el empleo de los indicadores fluorescentes como sensores. Este tipo de sensores es capaz de detectar con gran sensibilidad y exactitud variaciones en el pH de 0,01 unidades. Así, se ha inmovilizado azul de bromotimol sobre una membrana porosa de tetrafluoroetileno, detectándose variaciones de pH en el intervalo de 8,5 - 10.

Un segundo sensor utilizado con gran éxito está basado en los cambios, en la fluorescencia, que experimenta el 1-hidroxipireno-3,6,8-trisulfonato, a partir del cual se forma su fenolato, en un intervalo de pH de 1 a 11, independientemente de que se utilice la radiación excitadora correspondiente a la forma fenol ($\lambda_{\text{ex}}=405$ nm) o a la forma fenóxido ($\lambda_{\text{ex}}=470$ nm). La relación de intensidades de fluorescencia, según se excite a 405 nm y a 470 nm, es empleada en el cálculo del pH.

Otros sensores fluorescentes de pH empleados son el ácido 7-hidroxycumarin-3-carboxílico y la 5-carboxifluoresceína.

En consecuencia este tipo de sensores fluorescentes pueden utilizarse en la determinación del pH de soluciones y en valoraciones ácido-base.

- Sensores para determinaciones de compuestos de interés general

En este apartado citaremos como ejemplos algunos compuestos cuya determinación reviste especial interés. Así el O_2 puede determinarse fácilmente mediante el *quenching* de fluorescencia que induce en compuestos tales como la tripaflavina o clorofila, los cuales actúan como indicadores fluorescentes. El método es muy sensible, pero desgraciadamente estos indicadores son fotolábiles, a la vez que presentan interferencias, si existen trazas de NH_3 o agua. Otros gases como H_2 , N_2 , CH_4 , o CO_2 , no interfieren en su determinación. El *quenching* de fosforescencia, de este mismo tipo de colorantes, se ha utilizado con el mismo fin, pudiéndose además aplicar en la determinación de O_2 en aguas.

Los vapores de amoníaco, mediante un optrodo con un colorante de oxazina sensible a

las variaciones de pH, pueden detectarse con una buena reproducibilidad a una concentración en NH₃ gaseoso de 60 ppm a 100 ppm. Otro indicador de NH₃ basado en el principio de variación del pH, es el p-nitrofenol.

Los sensores de vapor de agua poseen un indudable interés en la monitorización de forma continua de la humedad ambiental de aeropuertos y especialmente en las predicciones meteorológicas de nieblas y hielos. Para detectar vapor de agua se hace uso del efecto que éste ejerce sobre el rendimiento cuántico de fluoróforos adsorbidos en la fibra óptica, como la diimida del ácido perileno tetracarboxílico.

Algunos sensores de haluros están basados en la amortiguación de la fluorescencia de fluoróforos, como los cationes acridinio e isoquinolinio por la presencia de Cl, Br y I.

En el caso de los cationes, existe una gran variedad de reactivos quelantes, como el ANS (ácido-8-anilino-1-naftalenosulfónico), morina, ácido 8-hidroxiquinolin-5-sulfónico, los cuales inmovilizados de forma adecuada sobre la fibra óptica, pueden utilizarse para la cuantificación de Na(I), Be(II), Al(III), Mg(II), Zn(II), etc..

- Sensores para la determinación de compuestos de interés farmacéutico

Goldfinch ha descrito un sensor sensible a pH para determinar penicilina y antibióticos similares, en función de la concentración de protones producida en la reacción catalizada por una penicilinasas.

Para la determinación del anestésico halotano, se ha descrito un sensor basado en la amortiguación de fluorescencia del decaciclano por el halotano. Se han detectado interferencias debidas a la presencia del oxígeno molecular, pero que no comprometen la cuantificación del mencionado anestésico en las concentraciones fisiológicas, realizándose la determinación con una precisión adecuada.

Los fármacos que presentan fluorescencia nativa, como adriamicina, pueden determinarse de manera directa en sangre y líquido cefalorraquídeo, mediante un sensor de fibra óptica apropiado.

- Sensores para la determinación de compuestos de interés clínico

Los sensores para la determinación de O₂ ya comentados anteriormente, pueden aplicarse a la determinación de éste en fluidos biológicos, al igual que ocurre con los referidos para la determinación de pH, NH₃, Ca²⁺ y otros cationes de interés.

Con respecto al CO₂, ya nos hemos referido al diseño de un sensor basado en los cambios espectrales que se producen en el indicador fluorescente 4-metilumbeliferona, según la presión de CO₂. De forma similar se ha descrito para la cuantificación de glucosa en fluidos biológicos, basado en la determinación del O₂ consumido durante la oxidación enzimática de glucosa por acción de la glucosa oxidasa. El indicador fluorescente, que se soporta sobre una membrana de teflon, es un compuesto muy sensible a variaciones en las concentraciones de O₂, por ejemplo ácido pirenobutírico, en un solvente viscoso.

5.5. SENSORES FOSFORIMETRICOS

Los primeros sensores de fosforescencia a temperatura ambiente se basaron en la inmovilización de la tripaflavina adsorbida sobre gel de sílice. La fosforescencia de la tripafla-

vina es extremadamente sensible al *quenching* producido por el oxígeno molecular. Este método es especialmente útil para la determinación de O₂ generado en los procesos de fotosíntesis. Basándose en el mismo principio también se han diseñado otros fosforosensores empleando como indicadores fosforescentes hidroxipireno trisulfonato o umbeliferona. En general el problema que plantean todos estos indicadores es que el efecto de amortiguación es mucho menor una vez que están unidos a la matriz polimérica.

El bromonaftaleno y el bromofenantreno también se pueden emplear como sensores fosforescentes inmovilizándolos mediante la formación de complejos de inclusión con ciclodextrinas. Aún a pesar de la inclusión, se produce amortiguación de la fosforescencia por el oxígeno molecular, lo que permite determinar este último. Estos mismos sensores se han empleado en la determinación de anestésicos como el halotano, ya que ciertos bromoalcanos, muestran un incremento en su fosforescencia y un descenso en la fluorescencia, al ponerse en contacto con la matriz de bromonaftaleno/ciclodextrina. La relación de las intensidades de las bandas de emisión de fluorescencia y fosforescencia, permite determinar de forma muy precisa y exacta la concentración de halotano.

6. BIBLIOGRAFIA

Abbott, A. J., Amler, E., Ball, W. J. (1991): "Immunochemical and Spectroscopic Characterization of Two Fluorescein-5'-Isothiocyanate Labeling Sites on Na⁺, K⁺ ATPase". *J. Biochem.* **30**, 1692.

Abbott, D. (1984): *The Biographical Dictionary of Scientists: Physicists*. Blond Educational, Londres.

Acebes Pastrana, P. (1994): *La Química en Europa y América (Siglos XVIII y XIX)*. Universidad Autónoma Metropolitana, Méjico.

Albin, M., Weinberger R., Sapp, E., Mornig, S. (1991): "Fluorescence Detection in Capillary Electrophoresis: Evaluation of Derivatizing Reagents and Techniques". *Anal. Chem.* **63**, 417.

Alvarez-Coque, M. C. G. (1989): "Formation and Instability of *o*-Phthalaldehyde Derivatives of Amino Acids". *Anal. Biochem.* **178**, 1.

Alvarez-Roa, E. R., Prieto, N. E., Martin, C. R. (1984): "Luminescence Titrations of Polyelectrolytes". *Anal. Chem.* **56**, 1939.

Anderson, J. M. (1986): "Fluorescent Hydrazides for the High-Performance Liquid Chromatographic Determination of Biological Carbonyls". *Anal. Biochem.* **152**, 146.

Angelides, K. J., Nutter, T. J. (1983): "Preparation and Characterization of Fluorescent Scorpion Toxins from *Leiurus quinquestriatus* as Probes of the Sodium Channel of Excitable Cells". *J. Biol. Chem.* **258**, 1194.

Arnold, M. A. (1985): "Enzyme-Based Fiber Optic Sensor". *Anal. Chem.* **57**, 565.

Arribas Jimeno, S. (1985): *Introducción a la Historia de la Química Analítica en España*. Servicio de Publicaciones de la Universidad de Oviedo, Oviedo.

Asmus, P. A., Jorgenson, J. W., Novotny, M. (1976): "Fluorescence Enhancement. New Selective Detection Principle for Liquid Chromatography". *J. Chromatogr.* **126**, 317.

Badley, R. A. (1976): *Modern Fluorescence Spectroscopy*. Plenum, Nueva York.

Baeyens, W. R. G., Weken, G. V. D. (1987): "Rapid Thin Layer Chromatography of Homocysteine - Cysteine Mixtures as Their Thiolyte Derivatives". *Chromatographia* **23**, 717.

Baeyens, W. R. G., Imai, K., Ling, B. L. (1988): *Progress in Analytical Luminescence*. ASTM, Filadelfia.

Baeyens, W. R. G., Ling, B. L., Brinkman, U. A., Schulman, S. G. (1989): "Principles and Applications of Luminescence Spectrometry Coupled to Liquid Chromatographic Techniques": *J. Biolumin. Chemilumin.* **4**, 484.

Baeyens, W. R. G., Keukeleire, D., Korkidis, K. (Eds.) (1991): *Luminescence Techniques in Chemical and Biochemical Analysis*. Marcel Dekker, Nueva York.

Bailey, M. P., Rocks, B. F., Riley, C. (1987): "On the Use of Fluorescent Labels in Immunoassay". *J. Pharm. Biomed. Anal.* **5**, 649.

Barak, L. S., Webb, W. W. (1981): "Fluorescent Low Density Lipoprotein for Observation of Dynamics of Individual Receptor Complexes on Cultured Human Fibroblasts". *J. Cell Biol.* **90**, 595.

Barker, S. A., Monti, J. A., Christian, S. T., Benington, F., Morin, R. D. (1980): "9-Diazomethylanthracene as a New Fluorescence and Ultraviolet Label for the Spectrometric Detection of Picomole Quantities of Carboxylic Acid by High-Pressure Liquid Chromatography". *Anal. Biochem.* **107**, 116.

Baustert, J. H., Wolfbeis, O. S., Moser, R., Koller, E. (1988): "Fluorometric Continuous Kinetic Assay of α -Chymotrypsin Using New Protease Substrates Possessing Long-Wave Excitation and Emission Maxima". *Anal. Biochem.* **171**, 393.

Beale, S. C., Savage, J. C., Wiesler, D., Wietstock, S. M., Novotny, M. (1989): "3-Benzoyl-2-Quinolinecarboxaldehyde: a Novel Fluorogenic Reagent for the High-Sensitivity Chromatographic Analysis of Primary Amines". *Talanta* **36**, 321.

Becker, R. S. (1969): *Theory and Interpretation of Fluorescence and Phosphorescence*. John Wiley & Sons, Nueva York.

Benítez Trujillo, M. L. (1984): *Estudio Bibliográfico de Antonio Casares Rodríguez y José Casares Gil*. Facultad de Farmacia, Madrid.

Bernier, L., Gaudreault, R., Page, M., Joly, L. P. (1984): "Fluorescence Determination of Microconcentrations of Chlorambucil after Photoinactivation". *J. Pharm. Sci.* **73**, 1157.

Birks, J. W. (1989): *Chemiluminescence and Photochemical Reaction Detection in Chromatography*. VCH, Nueva York.

Blau, K., King, G. S. (1977): *Handbook of Derivatives for Chromatography*. Heyden, Londres.

Bombardt, P. A., Adams, W. J. (1982): "Liquid Chromatography Determination of Guanadrel in Laboratory Animal Diet as the Fluorescent Acetylacetone Derivative". *Anal. Chem.* **54**, 1087.

Bowen, E. J. (1968): *Luminescence in Chemistry*. Van Nostrand, Londres.

Brenan, M., Parish, C. R. (1988): "Automated Fluorometric Assay for T Cell Cytotoxicity". *J. Immunol. Meth.* **112**, 121.

Carlson, R. M., Swanson, T. A., Oyler, A. R., Lukasewycz, M. T., Liukkonen, R. J., Voelkner, K. S. (1984): "Phenol Analysis Using 2-Fluorenesulfonyl Chloride as a UV-Fluorescent Derivatizing Agent". *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 272.

Carmona, A. M., Gómez Caamaño, J. L. (1984): "Historia de la Cátedra de Técnica Física". *Bol. Soc. Esp. Hist. Farm.*, **35**, 125.

Carpenter, K. J., Kodicek, E. (1950): "Fluorimetric Estimation of N-Methylnicotinamide and its Differentiation from Coenzyme I". *Biochem. J.* **46**, 421.

Cass, A.E.G. (1990): *Biosensors. A Practical Approach*. Oxford University, Oxford.

del Castillo, B., Martin, M. A., Martin, P., Lin, B., Portillo, P. (1988): "A Few Historical Considerations Concerning some Luminescence Phenomena". *Chim. Oggi.* **5**, 47.

del Castillo, B. *Instrumentos Científicos*. En Basante, R. (Ed.) (1993): *Museo de la Farmacia Hispana*. Consejo Social UCM, Madrid, p. 126.

Chabenat, C., Ladure, P., Blanc-Continsouza, D., Boismare, F., Boucly, P. (1987): "Determination of Calcium Acetylhomotaurinate by LC with Fluorimetric and Electrochemical Detection". *J. Chromatogr.* **414**, 417.

Chehab, F. F., Kan, Y. W. (1989): "Detection of Specific DNA Sequences by Fluorescence Amplification : a Color Complementation Assay". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**, 9178.

Chen, R. F., Scott, C., Trepman, E. (1979): "Fluorescence Properties of *o*-Phthaldialdehyde Derivatives of Amino Acids". *Biochim. Biophys. Acta* **576**, 440.

Chen, R. F., Scott, C. H. (1985): "Atlas of Fluorescence Spectra and Lifetimes of Dyes Attached to Protein". *Anal. Lett.* **18**, 393.

Chiarlane, Q., Mallaina, C. (1865): *Historia de la Farmacia*. J. M. Dúcazal, Madrid.

Chiou, R., Stubbs, R. J., Bayne, W. F. (1987): "Determination of Ivermectin in Human Plasma and Milk by HPLC with Fluorescence Detection". *J. Chromatogr.* **416**, 196.

Clark, B. R., Halpern, R. M., Smith, R. A. (1975): "Fluorimetric Method for Quantitation in the Picomole Range of *N*-Methylnicotinamide and Nicotinamide in Serum". *Anal. Biochem.* **68**, 54.

Conia, J. (1987): "Flow Cytometric Analysis and Sorting of Plant Chromosomes from *Petunia hybrida* Protoplasts". *Cytometry* **8**, 500.

Cormier, M. J., Hercules, D. M., Lee, J. (1973): *Chemiluminescence and Bioluminescence*. Plenum, Nueva York.

Cosnier, S., Innocent, C. (1993): "A New Strategy for the Construction of a Tyrosinase-Based Amperometric Phenol and *o*-Diphenol Sensor". *Bioelectrochem. Bioenerg.* **31**, 147.

Cox, J. W., Pullen, R. H. (1984): "Determination of E Prostaglandins by Automated Heteromodal Column Switching HPLC with Fluorescence Detection". *Anal. Chem.* **56**, 1866.

Crozier, A., Zaerr, J. B., Morris, R. O. (1982): "Reversed and Normal-Phase High Performance Liquid Chromatography of Gibberellin Methoxycoumaryl Esters". *J. Chromatogr.* **238**, 157.

D'Souza, J., Ogilvie, R. I. (1982): "Determination of Gentamicin Components C_{1a}, C₂ and C₁ in Plasma and Urine by HPLC". *J. Chromatogr.* **232**, 212.

Davis, M. H., Altschuld, R. A., Jung, D. W., Brierley, G. P. (1987): "Estimation of Intramitochondrial pCa and pH by Fura-2 and 2,7-biscarboxyethyl-5(6)-Carboxyfluorescein (BCECF) Fluorescence". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **149**, 40.

Delia, D. (1991): "Two- and Three-Color Immunofluorescence Using Aminocoumarin, Fluorescein, and Phycoerythrin-Labelled Antibodies and Single Laser Flow Cytometry". *Cytometry* **12**, 537.

Dewey, T. G. (1991): *Biophysical and Biochemical Aspects of Fluorescence Spectroscopy*. Plenum, Nueva York.

Dunges, W. (1977): "4-Bromomethyl-7-Methoxycoumarin as a New Fluorescence Label for Fatty Acids". *Anal. Chem.* **49**, 442.

Edidin, M. (1989): "Fluorescent Labelling of Cell Surfaces". *Methods Cell Biol.* **29**, 87.

Ersoy, L. (1985): "Fluorimetric Determination of Baclofen [γ -amino- β -(*p*-Chloro-phenyl)butyric Acid]". *Analyst* **110**, 881.

Fabre, H., Blanchin, M. D., Lerner, D. A., Mandrou, B. (1985): "Determination of Cephalosporins Utilising Thin-Layer Chromatography with Fluorescamine Detection". *Analyst* **110**, 775.

Flower, R. W. (1995): "Evolution of Indocyanine Green Dye Choroidal Angiography". *Optical Engineering* **34**, 727.

Folch Andréu, R. (1927): *Elementos de la Historia de la Farmacia*. Imp. Vda. A. G. Izquierdo, Madrid.

Folch Andréu, R. (1940): *El Farmacéutico del Siglo XVIII como Hombre de Ciencia*. Imp. Vda. A. G. Izquierdo, Madrid.

Frei, R. W., Lawrence, J. F. (1982): *Chemical Derivatization and Modification Techniques in Analytical Chemistry*. Plenum, Nueva York.

García-Sánchez, F., Blanco, C. C. (1986): "Determination of the Carbamate Herbicide Protham by Synchronous Derivative Spectrofluorometry Following Fluorescamine Fluorogenic Labeling". *Anal. Chem.* **58**, 73.

Genfa, Z., Dasgupta, P. K. (1989): "Fluorometric Measurement of Aqueous Ammonium Ion in a Flow Injection System". *Anal. Chem.* **61**, 408.

Ghosh, P. B., Whitehouse, M. W. (1968): "7-Chloro-4-Nitrobenzofurazan : a New Fluorogenic Reagent for Amino Acids and Other Amines". *Biochem. J.* **108**, 155.

Goto, J., Goto, N., Shamsa, F., Saito, M., Komatsu, K., Suzaki, K., Nambara, T. (1983): "New Sensitive Derivatization of Hydroxysteroids for High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection". *Anal. Chim. Acta* **147**, 397.

Goto, J., Chikai, T., Nambara, T. (1987): "Studies on Steroids. CCXXVII. Separation and Determination of Bile Acid 7- and 12-Sulphates in Urine by HPLC with Fluorescence Labelling". *J. Chromatogr.* **415**, 45.

Grinstein, S., Cohen, S., Goetry, J. D., Rothstein, A., Gelfand, E. W. (1985): "Characterization of the Activation of Na⁺/H⁺ Exchange in Lymphocytes by Phorbol Esters: Change in Cytoplasmic pH Dependence of the Antiport". *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 1429.

Grinvald, A., Frostig, R. D., Lickes y Rudesheim, R. (1988): "Optical Imaging of Neuronal Activity". *Physiological Reviews* **68**, 1285.

Gross, D. J., Webb, W. W. (1986): "Molecular Counting of Low Density Lipoprotein Particles as Individuals and Small Clusters on Cell Surfaces". *Biophys.* **49**, 901.

Grushka, E., Lam, S., Chassin, J. (1978): "Fluorescence Labeling of Dicarboxylic Acids for High Performance Liquid Chromatographic Separation". *Anal. Chem.* **50**, 1398.

Gübitz, G., Wintersteiger, R., Frei, R. W. (1984): "Fluorogenic Labelling of Carbonyl Compounds with 7-Hydrazino-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole". *J. Liq. Chromatogr.* **7**, 839.

Guilbault, G. G. (1973): *Practical Fluorescence: Theory, Method and Techniques*. Marcel Dekker, Nueva York.

Guilbault, G. G. (1990): *Practical Fluorescence*. Marcel Dekker, Nueva York.

Hara, S., Takemori, Y., Iwata, T., Yamaguchi, M., Nakamura, M., Ohkura, Y. (1985): "Fluorimetric Determination of α -Keto Acids with 4,5-Dimethoxy-1,2-Diaminobenzene and its Application to High Performance Liquid Chromatography". *Anal. Chim. Acta* **172**, 167.

Harvey, E. N. (1952): *Bioluminescence*. Academic, Nueva York.

Hatsumi, M., Kimata, S. I., Hirose, K. (1982): "Anthryldiazomethane Derivatives of Prostaglandins for High-Performance Liquid Chromatographic Analysis". *J. Chromatogr.* **253**, 271.

Haugland, R. (1983): *Covalent Fluorescent Probes*. Plenum, Nueva York.

Hayashi, T., Tsuchiya, H., Naruse, H. (1983): "HPLC Determination of α -Keto Acids in Plasma with Fluorometric Detection". *J. Chromatogr.* **273**, 245.

Hemmils, I. (1985): "Fluoroimmunoassays and Immunofluorometric Assays". *Clin. Chem.* **31**, 359.

Hendrickson, E. R., Neuman, R. D. (1984): "Determination of Polyacrylamide by Spectrofluorometry". *Anal. Chem.* **56**, 354.

Hercules, D. M. (1966): *Fluorescence and Phosphorescence Analysis. Principles and Applications*. Wiley Interscience, Nueva York.

Hernández, L., Marquina, R., Escalona, J. (1990): "Detection and Quantification of Capillary Electrophoresis Zones by Fluorescence Microscopy". *J. Chromatogr.* **502**, 247.

Hillman, G. (1943): "The Fluorescent Reaction of *o*-Diacetylbenzene with Albumin and the Split Products of Albumin, and Their Use in the Abderhalden Protective Enzyme Reaction". *Z. Physiol. Chem.* **277**, 222.

Hirano, H., Wittmann-Liebold, B. (1986): "Protein Pico-Sequencing with 4-[(5-(Dimethylamino)-1-Naphthylsulfonyl)amino]phenyl Isothiocyanate". *Biol. Chem.*, **367**, 1259.

Huang, Z., Villarta-Snow, R. L., Lubrano G. J., Guilbault, G. G. (1994): "Glutathione Amperometric Enzyme Microsensor". *Anal. Lett.* **27(2)**, 263.

Hudson, J. (1992): *The History of Chemistry*. MacMillan, Londres.

Huff, J. W. (1947): "The Fluorescent Condensation Product of N¹-Methyl-Nicotamine and Acetone. I. Synthesis and Properties". *Biol. Chem.* **167**, 151.

Hurtubise, R. J. (1981): *Solid Surface Luminescence Analysis*. Dekker, Nueva York.

Hurtubise, R. J. (1990): *Phosphorimetry: Theory, Instrumentation and Applications*. VCH, Nueva York.

Ichinose, N., Schwedt, G., Schnepel, F. M., Adachi, (Eds.) (1991): *Fluorometric Analysis in Biomedical Chemistry*. John Wiley & Sons, Nueva York.

Ihde, A. J. (1984): *The Development of Modern Chemistry*. Dover, Nueva York.

Imai, K., Watanabe, Y. (1981): "Fluorimetric Determination of Secondary Amino Acids by 7-Fluoro-4-Nitrobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole". *Anal. Chim. Acta* **130**, 377.

Imai, K., Toyooka, T., Watanabe, W. (1983): "A Novel Fluorogenic Reagent for Thiols: Ammonium 7-Fluorobenzo-2-Oxa-1,3-Diazole-4-Sulfonate". *Anal. Biochem.* **128**, 471.

Ito, T., Tsubomatsu, Y., Suzuki, T., Murata, A. (1986): "Spectrofluorimetric Determination of Titanium with 2-Methyl-5-Hydroxy-7-Methoxyisoflavone". *Analyst* **111**, 907.

Iwase, H., Ishii, I., Kato, Y., Hamazaki, H., Hotta, K., Umezawa, A., Kanzaki, T. (1987): "Subfractionation of the Dansylated Derivatives of Glucosyl Galactosyl Hydroxylysine by LC and its Application to a Specific α -1,2-Glucosidase Assay". *J. Chromatogr.* **416**, 37.

Iwuoha, E., Smyth, M. R. (1994): "Organic-Phase Application of an Amperometric Glucose Sensor", *Analyst* **119**, 265.

Janse, C. J. (1987): "Plasmodium Species: Flow Cytometry and Microfluorimetry Assessment of DNA Content and Synthesis". *Exp. Parasitol.* **64**, 88.

Jin, S. W. (1986): "A New Sensitive Edman-Type Reagent: 4-(*N*-1-Dimethylaminonaphthalene-5-Sulfonylamino)phenyl Isothiocyanate. Its Synthesis and Application for Micro-sequencing of Polypeptides". *Febs Lett.* **198**, 150.

Kai, M., Ohkura, Y. (1986): "Selective Determination of *N*-Terminal Tyrosine Containing Peptides by a Novel Fluorescence Reaction with Borate, Hydroxylamine and Cobalt (II)". *Anal. Chim. Acta* **182**, 177.

Kanaoka, Y., Machida, M., Ando, K., Sekine, T. (1970): "Fluorescence and Structures of Proteins as Measured by Incorporation of Fluorophore. IV. Synthesis and Fluorescence Characteristics of *N*-[*p*-(2-Benzimidazolyl)phenyl] Maleimide". *Biochim. Biophys. Acta* **207**, 269.

Karlsson, K. E., Wiesler, D., Alasandro, M., Novotny, M. (1985): "7-[(Chlorocarbonyl)methoxy]-4-Methylcoumarin: A Novel Fluorescent Reagent for the Precolumn Derivatization of Hydroxy Compounds in Liquid Chromatography". *Anal. Chem.* **57**, 229.

Kawasaki, T. (1989): "Determination of Dopamine, Norepinephrine, and Related Trace Amines by Prechromatographic Derivatization with Naphthalene-2,3-Dicarboxaldehyde". *Anal. Biochem.* **180**, 279.

Kelly, R. A., O'Hara, D. S., Kelley, V. (1987): "HPLC Separation of Femtomolar Quantities of Endogenous Carboxylic Acids, Including Arachidonic Acid Metabolites, as 4-Bromomethyl-7-Acetylcoumarin Derivatives". *J. Chromatogr.* **416**, 247.

Khalfan, H. (1986): "Aminomethyl Coumarin Acetic Acid : a New Fluorescent Labelling Agent for Proteins". *Histochem. J.* **18**, 497.

Klein, B., Sheehan, J. E., Grunberg, E. (1974): "Use of Fluorescamine (Floram) to Detect Amphetamine in Urine by Thin-Layer Chromatography". *Clin. Chem.* **20**, 272.

Kohn, K. W. (1961): "Determination of Tetracyclines by Extraction of Fluorescent Complexes. Application to Biological Materials". *Anal. Chem.* **33**, 862.

Koller, E., Wolfbeis, O. S. (1985): "Continuous Kinetic Assay of Arylsulfatases with New Chromogenic and Fluorogenic Substrates". *Anal. Chim. Acta* **170**, 73.

Koller, E., Wolfbeis, O. S. (1990): en Wolfbeis, O. S. (Ed.) *Sensor Chemistry*. CRC, Boca Raton.

Kolthoff, I. M. (1994): "Analytical Chemistry in the USA in the First Quarter of This Century". *Anal. Chem.* **66**, 241

Konev, S. V. (1967): *Fluorescence and Phosphorescence of Proteins and Nucleic Acids*. Plenum, Nueva York.

Kosower, N. S., Newton, G. L., Kosower, E. M., Ranney, H. N. (1980) "Bimane Fluorescent Labels. Characterization of the Bimane Labeling of Human Hemoglobin". *Biochem. Biophys. Acta* **622**, 201.

Kuwata, K., Yamazaki, Y., Uebori, M. (1980): "Determination of Traces of Low Molecular Weight Aliphatic Amines by Gas Chromatography". *Anal. Chem.* **52**, 1980.

Laitinen, H. A., Ewing, G. W. (1977): *A History of Analytical Chemistry*. The Division of Analytical Chemistry of ACS, York.

Lakowicz, J. R. (1992): *Topics in Fluorescence Spectroscopy: Biochemical Applications*. Plenum, Nueva York.

Lambert, W. E., De Leenheer, A. P., Lefevre, M. F. (1986): "Determination of Vitamin K in Serum Using HPLC with Post-Column Reaction and Fluorescence Detection". *J. Chromatogr. Sci.* **24**, 76.

Lambrechts, M., Sansen, W. (1992): *Biosensors: Microelectrochemical Devices*. Institute of Physics, Londres.

Lawrence, J. F., Frei, R. W. (1976): *Chemical Derivatization in Liquid Chromatography*. Elsevier, Nueva York.

Lee, S. H., Field, L. R. (1984): "Postcolumn Fluorescence Detection of Nitrite, Nitrate, Thiosulfate, and Iodide Anions in High-Performance Liquid Chromatography". *Anal. Chem.* **56**, 2647.

Lee, M., Nohta, H., Umegae, Y., Ohkura, Y. (1987): "Assay for Tyrosine Hydroxylase by High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection". *J. Chromatogr.* **415**, 289.

Lehrer, S. S., Ishii, Y. (1988): "Fluorescence Properties of Acrylodan-Labeled Tropomyosin and Tropomyosin-Actin: Evidence for Myosin Subfragment 1 Induced Changes in Geometry between Tropomyosin and Actin". *Biochem.* **27**, 5899.

Lingemann, H., Hulshoff, A., Underberg, W. J. M., Offermann, F. B. J. M. (1984): "Rapid, Sensitive and Specific Derivatization Methods with 9(Hydroxymethyl)Anthracene for the

Fluorimetric Detection of Carboxylic Acids Prior to Reversed-Phase HPLC Separation". *J. Chromatogr.* **290**, 215.

Leviardi, A. (1946): *Luminescencia*. Espasa-Calpe, Madrid.

Liu, J. (1991): "Ultrasensitive Fluorometric Determination of Carbohydrates as Derivatives in Mixtures". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 2302.

Long, W. J., Norin, R. C., Su, S. Y. (1985): "Pharmaceutical Determination by Derivatization-Room-Temperature Phosphorescence". *Anal. Chem.* **57**, 2873.

Lopez, D. R., Lopez Martinez, C., Villanova, R. G. (1986): "Spectrofluorometric Method for the Determination of *N*-Nitroso Compounds". *Anal. Chem.* **58**, 2647.

Lora Tamayo, M. (1981): *La Investigación Química Española*. Alhambra, Madrid.

Lubbers, D. W., Opitz, N. (1983): "Optical Fluorescence Sensors for Continuous Measurement of Chemical Concentrations in Biological Systems". *Sensors and Actuators* **4**, 641.

Luchtefeld, R. G. (1985): "An HPLC Detection System for Phenylurea Herbicides Using Post-Column Photolysis and Chemical Derivatization". *J. Chromatogr. Sci.* **23**, 516.

Lumb, M. D. (1978): *Luminescence Spectroscopy*. Academic, Londres.

Lund, A. (1950): "Simultaneous Fluorimetric Determination of Adrenaline and Noradrenaline in Blood". *Acta Pharmacol. Toxicol.* **6**, 137.

Magner, E., Albery W. J. (1994): "Amperometric Enzyme Electrode for Ca (II)". *J. Electroanal. Chem.*, **375**, 123.

Marko-Varga, G., Johansson, K., Gorton, L. (1994): "Enzyme-Based Biosensor as a Selective Detection Unit in Column Liquid Chromatography". *J. Chromatogr. A*, **660**, 153.

Maroulis, A. J., Voulgaropoulos, A. N., Maroulis, C. P. H. (1985): "Fluorimetric Determination of Biacetyl". *Talanta* **32**, 504.

- Martin, M. A., del Castillo, B., Lerner, D. A. (1988): "Study of the Luminescence Properties of a New Series of Quinolizinium Salts and Their Interaction with DNA". *Anal. Chim. Acta* **205**, 105.
- Martin, M. A., del Castillo, B., Lerner, D. A., Ezquerro, J., Alvarez-Builla, J. (1988): "Influence of Micellar Media on the Fluorescence of Various Benzo- and Methyl-Quinolizinium Salts". *Anal. Chim. Acta* **205**, 117.
- Martin, M. A., del Castillo, B., Menéndez, J. C. (1991): "Spectrofluorimetric Study of Benzo[a]quinolizidines as Potential Fluorescent Probes for DNA". *Anal. Lett.* **24**, 1503.
- McKay, I. C., Forman, D., White, R. G. (1981): "A Comparison of Fluorescein Isothiocyanate and Lissamine Rhodamine (RB 200) as Labels for Antibody in the Fluorescent Antibody Technique". *Immunol.* **43**, 591.
- Matsumoto, K., Baeza Baeza, J.J., Mottola, H. A. (1993): "Simultaneous Kinetic-Based Determination of Fructose and Ascorbate with a Rotating Bioreactor and Amperometric Detection: Application to the Analysis of Food Samples". *Anal. Chem.* **65**, 1658.
- Meisch, H. U., Wannemacher, B. (1986): "Fluorometric Determination of 5-Aminolevulinic Acid after Derivatization with *o*-Phthaldialdehyde and Separation by Reversed Phase HPLC". *Anal. Chem.* **58**, 1372.
- Mopper, K., Delmas, D. (1984): "Trace Determination of Biological Thiols by LC and Precolumn Fluorometric Labeling with *o*-Phthalaldehyde". *Anal. Chem.* **56**, 2557.
- Moscone, D., Pasini, M., Mascini, M. (1995): "Subcutaneous Microdialysis Probe Coupled with Glucose Biosensor for *in vivo* Continuous Monitoring". *Talanta* **39**, 1039.
- Mulchandani, A., Rudolph, D. C. (1995): "Amperometric Determination of Lipid Hydroperoxides", *Anal. Biochem.* **225**, 277.
- Muramoto, K., Kamiya, H., Kawauchi, H. (1984): "The Application of Fluorescein Isothiocyanate and High Performance Liquid Chromatography for the Microsequencing of Proteins and Peptides". *Anal. Biochem.* **141**, 446.

Pantano P., Walt, D. R. (1995): "Analytical Applications of Optical Imaging Fibers". *Anal. Chem.* **67**, 481 A.

Pappen, S., Pikula, S., Martonosi, A. (1987): "Fluorescence Energy Transfer as an Indicator of Ca²⁺-ATPase Interactions in Sarcoplasmic Reticulum". *Biophys. J.* **51**, 205.

Parker, C. A. (1968): *Photoluminescence in Solutions with Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry*. Elsevier, Nueva York.

Park, J., Yee H., Kim, S. (1995), "Amperometric Biosensor for Determination of Ethanol Vapor". *Biosens. Bioelectr.* **10**, 587.

Peterson, J. I., Fitzgerald, R. V., Buckhold, D. K. (1984): "Fiber-Optic Probe for *in vivo* Measurement of Oxygen Partial Pressure". *Anal. Chem.* **56**, 62.

Prakash, C., Vijay, I. K. (1983): "A New Fluorescent Tag for Labelling of Saccharides". *Anal. Biochem.* **128**, 41.

Rendell, D. (1987): *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*. John Wiley & Sons, Chichester.

Roldán y Guerrero, R. (1976): *Diccionario Biográfico y Bibliográfico de Autores Farmacéuticos Españoles*. Gráficas Valera, Madrid.

Roth, M. (1971): "Fluorescence Reaction for Amino Acids". *Anal. Chem.* **43**, 880.

Rubio, S., Gómez-Hens, A., Valcárcel, M. (1985): "Fluorimetric Determination of Tin at the Nanograms per Millilitre Level in Canned Beverages". *Analyst* **110**, 43.

Salzberg, B. M., Grinvald, A., Cohen, L. B., Davila, H. V., Ross, W. N. (1977): "Optical Recording of Neuronal Activity in an Invertebrate Central Nervous System: Simultaneous Monitoring of Several Neurons". *J. Neurophysiol.* **40**, 1281.

Sano, A., Asabe, Y., Suzuki, M., Takitani, S. (1984): "Fluorimetric Determination of Oleandomycins with Nicotinamide and 3-Acetylpyridine". *Anal. Chim. Acta* **160**, 311.

Sawicki, E., Carnes, R. A. (1968): "Fluorometric Determination of Glycine and other Amino Acids with 2,4-Butanedione". *Anal. Chim. Acta* **41**, 178.

Schaffar, B. P. H., Wolfbeis, O. S., Leiner, A. (1988): "Optical Sensors, 23: the Effect of Langmuir-Blodgett Layer Composition on the Response of Ion-Selective Optrodes for Potassium Based on the Fluorometric Measurement of Membrane Potential". *Analyst* **113**, 693.

Scheller, F., Schubert, F. (1989): *Biosensors*. Elsevier, Amsterdam.

Schulman, S. G. (1977): *Fluorescence and Phosphorescence Spectroscopy*. Pergamon, Oxford.

Schulman, S. G. (1985): *Molecular Luminescence Spectroscopy. Methods and Applications: Part 1*. John Wiley & Sons, Nueva York.

Schulman, S. G. (1988): *Molecular Luminescence Spectroscopy. Methods and Applications: Part 2*. John Wiley & Sons, Nueva York.

Schwedt, G. (1981): *Fluorimetrische Analyse, Methoden und Anwendungen*. Chemie, Weinheim.

Seiler, N. (1970): "Use of the Dansyl Reaction in Biochemical Analysis". *Meth. Biochem. Analyt.* **18**, 259.

Sippel, T. O. (1981): "New Fluorochromes for Thiols: Maleimide and Iodoacetamide Derivatives of 3-Phenylcoumarin Fluorophore". *J. Histochem. Cytochem.* **29**, 314.

Sklar, L. A., Hudson, B. S., Peterson, M., Diamond, J. (1977): "Conjugated Polyene Fatty Acids on Fluorescent Probes: Spectroscopic Characterization". *Biochem.* **16**, 813.

Small, H., Stevens T.S., Bauman, W.S. (1975): "Novel Ion Exchange Chromatographic Method Using Conductimetric Detection". *Anal. Chem.* **47**, 1801.

Speek, A. J., Schrijver, J., Schreurs, V. H. P. (1984): "Fluorometric Determination of Total Vitamin C and Total Isovitamin C in Foodstuffs and Beverages by HPLC with Precolumn Derivatization". *J. Agric. Food Chem.* **32**, 352.

Spring, O., Krauss, W. (1987): "In vivo Fluorescence Labeling of Plasma Membrane from Plant Tissue and Cells". *Plant Sci.* **48**, 203.

Stanley, P. E. (1971): *Organic Scintillators and Liquid Scintillation Counting*. Academic, Nueva York.

Stanley, P. E. (1974): *Liquid Scintillation Counting*. Heyden, Londres.

Stock, J. T. (1994): "Historic Instruments: the Scientist's Heritage". *Anal. Chem.* **66**, 264.

Szabo, A., Karacsoni, E. M. (1980): "Detection and Assay of Dihydroergot Alkaloids by Thin-Layer Chromatography Using *o*-Phthalaldehyde - Sulfuric Acid Reagent". *J. Chromatogr.* **193**, 500.

Takadate, A., Irikura, M., Suehiro, T., Fujino, H., Goya, S. (1985): "New Labelling Reagents for Alcohols in Fluorescence High-Performance Liquid Chromatography". *Chem. Pharm. Bull.* **33**, 1164.

Takitani, S., Sano, A., Asabe, Y., Suzuki, M. (1982): "Fluoridensitometric Determination of Epoxy Compounds with Nicotinamide and Acetophenone on Silica Gel Thin-Layer Plates". *Anal. Chim. Acta* **135**, 307.

Titus, J. A., Haugland, R., Sharrow, S. O., Segal, D. M. (1982): "Texas Red, a Hydrophilic, Red Emitting Fluorophore for Use with Fluorescein in Dual Parameter Flow Microfluorometric and Fluorescence Microscopic Studies". *J. Immunol. Methods* **50**, 193.

Toyo'oka, T., Imai, K. (1984): "New Fluorogenic Reagent Having Halogenobenzofurazan Structure for Thiols : 4-(Aminosulfonyl)-7-Fluoro-2,1,3-Benzoxadiazole". *Anal. Chem.* **56**, 2461.

Trettnak, W., P.Leiner, M. J., Wolfbeis, O. S. (1989): "Optical Sensors. Part 34. Fiber Optic Glucose Biosensor with an Oxygen Optrode as the Transducer". *Biosensors* **3**, 844.

Tsien, R. Y. (1980): "New Calcium Indicators and Buffers with High Selectivity against Magnesium and Protons: Design, Synthesis, and Properties of Prototype Structures". *Biochem.* **19**, 2396.

Udenfriend, S. (1962): *Fluorescence Assay in Biology and Medicine. Vol. 1.* Academic, Nueva York.

Udenfriend, S. (1969): *Fluorescence Assay in Biology and Medicine. Vol. 2.* Academic, Nueva York.

Urbano, E., Offenbacher, H., Wolfbeis, O. S. (1984): "Optical Sensor for Continuous Determination of Halides". *Anal. Chem.* **56**, 427.

Valls, J. O., del Castillo, B. (1985): *Técnicas Instrumentales en Farmacia y Ciencias de la Salud.* Piros, Barcelona.

Vo-Dinh, T. (1984): *Room Temperature Phosphorimetry for Chemical Analysis.* John Wiley & Sons, Nueva York.

Villanúa Fungariño, L. (1987): "El Análisis Químico Aplicado. Ciencia Farmacéutica". *Anal. Brom.* **39**, 11.

Watanabe, Y., Imai, K. (1983): "Liquid Chromatographic Determination of Amino and Imino Acids and Thiols by Postcolumn Derivatization with 4-Fluoro-7-Nitrobenzo-2,1,3-Oxadiazole". *Anal. Chem.* **55**, 1876.

Wehry, E. L. (Ed.) (1976): *Modern Fluorescence Spectroscopy.* Vols. 1 y 2. Plenum, Nueva York.

Weissberger, L. E., Armstrong, M. K. (1984): "Canavanine Analysis of Alfalfa Extracts by HPLC Using Pre-Column Derivatization". *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 438.

West, W. (1956): *Chemical Applications of Spectroscopy.* Wiley Interscience, Nueva York.

White, E. H., Brundrett, R. B. (1973): *Chemiluminescence and Bioluminescence.* Plenum, Nueva York.

Wintersteiger, R. (1982): "Anthracene Isocyanate as a New Fluorescent Label for Compounds with an Alcoholic Group". *J. Liq. Chromatogr.* **5**, 897.

Wise, D. L. (1990): *Bioinstrumentation and Biosensors*. Macel Dekker, Nueva York.

Wolfbeis, O. S., Offenbacher, H., Kroneis, H. W., Marsoner, H. (1984): "A Fast Responding Fluorescence Sensor for Oxygen". *Mikrochim. Acta* **1**, 153.

Wolfbeis, O. S., Posch, E. (1986): "Fiber Optic Fluorescing Sensor for Ammonia". *Anal. Chem.* **185**, 321.

Wolfbeis, O. S., Marhold, H. (1987): "A New Group of Fluorescent pH Indicators for an Extended pH Range". *Fresenius Z. Anal. Chem.* **327**, 347.

Wolfbeis, O. S. (1991): *Fiber Optic Chemical Sensors and Biosensors. Vol. 1*. CRC, Boca Raton.

Yamaguchi, M., Iwata, T., Nakamura, M. (1987): "3,4-Dihydro-6,7-Dimethoxy-4-Methyl-3-Oxoquinoxaline-2-Carbonyl Azide as a Highly Sensitive Fluorescence Derivatization Reagent for Primary, Secondary and Tertiary Alcohols in High-Performance Liquid Chromatography". *Anal. Chim. Acta* **193**, 209.

Zander, M. (1968): *Phosphorimetry*. Academic, Nueva York.

Zander, M. (1981): *Fluorimetrie*. Springer, Berlín.

**DISCURSO
DE
CONTESTACIÓN**

Por el Excmo. Sr. D.
MANUEL ORTEGA MATA
Académico de Número

DISCURSO DE CONTESTACIÓN

por el Excmo. Sr. D. Manuel Ortega Mata

Con plena satisfacción ocupo hoy esta Tribuna para dar cumplimiento al honroso encargo de la Junta de Gobierno de esta Real Academia, de contestar al Discurso de Recepción del nuevo Académico, D. Benito del Castillo García.

Considero que mi misión en este momento es no sólo glosar el contenido del interesante discurso que el Profesor del Castillo ha redactado, sino también poner de manifiesto los méritos docentes, investigadores y profesionales, en el campo de la Farmacia, que le permitieron en su día el ser propuesto para ocupar la plaza de Académico Numerario, de la que hoy, felizmente, toma posesión, al concurrir en el Profesor del Castillo las circunstancias exigidas en nuestros Estatutos. Yo soy de los que creen que la Academia necesita de la colaboración de todos cuantos farmacéuticos y cultivadores de sus ciencias afines, sientan y vivan las inquietudes científicas que son base y fundamento de nuestra profesión, en la seguridad de que al traer a esta tribuna el fruto de sus estudios e investigaciones no sólo lograrán el reconocimiento público de su labor, sino que a la vez estarán elevando el prestigio de la clase a que pertenecen.

Conocí al Profesor del Castillo como alumno en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense y tan excelente fue su comportamiento, que no dudé al terminar su Licenciatura, con sobresaliente y Premio Extraordinario en el año 1970, solicitar su incorporación al equipo de colaboradores que estaba formando en lo que se denominó "Gabinete Central de Técnicas Instrumentales", pues era consciente que no se podía permitir que se perdiese para la Universidad un alumno tan brillante, y tan prometedor como docente. En el año 1975 obtiene el grado de Doctor, también con sobresaliente "Cum Laude" y Premio Extraordinario.

Su labor docente se inicia como Profesor Ayudante en el año 1970, para pasar sucesivamente a Profesor Adjunto contratado en el 1976 y a Profesor Adjunto numerario de Técnicas Instrumentales en 1980. Tres años después en 1983 obtiene por oposición la plaza de Profesor Agregado de Técnicas Instrumentales en la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, y ese mismo año alcanza el máximo nivel docente de Catedrático de Universidad.

Una carrera docente de estas características no se consigue si no se poseen unas cualidades personales

excepcionales, en las que sobresalen la fuerza de voluntad, el espíritu de sacrificio, y una gran fe en lo que ha sido el norte en su vida, un gran amor a su profesión de farmacéutico que le viene, no sólo por tradición familiar sino también por el testimonio que en él dejaron viejos profesores, que ya son historia, y que con su quehacer honraron a la Farmacia.

En los momentos en los que estaba planteada la controversia sobre la valoración que debería darse a la docencia o a la investigación, que aún hoy persiste, como exigencia para la promoción en la carrera del aspirante a profesor universitario, el Profesor del Castillo ha sabido mantener el equilibrio necesario entre ambas opciones para alcanzar el máximo nivel docente, sin renunciar a lo que debe ser la esencia del profesor universitario, lo que justifica su existencia, su labor docente.

A mí me causó asombro leer en una revista, los consejos de un prestigioso profesor universitario de una no menos prestigiosa Universidad americana, dirigidos a los jóvenes post-graduados que se incorporaban a la Universidad, y que decía literalmente:

"No consumas tu tiempo en la enseñanza. Ello es divertido, pero juega muy poco en tu promoción. Además, consume mucho tiempo. Participa lo menos posible en Comisiones, tales como la de admisiones, y la de desarrollo curricular. Tales participaciones juegan aún menos papel que la docencia en la promoción universitaria".

Es evidente que el Profesor del Castillo, actuando inteligentemente, nunca puso oídos a tales tipos de consejos y que su capacidad de sacrificio a su labor universitaria, entregando generosamente todo su quehacer, en muchos momentos sobrepasando el límite de lo razonable, ha hecho que, sin renunciar a las tareas investigadoras, se haya consagrado como un gran docente.

Se dice también, que el prestigio de un buen profesor queda reducido al ámbito del campus universitario donde enseña, mientras que cualquier mediocre investigador puede ser conocido internacionalmente.

El Profesor del Castillo, cuando se cree en la obligación de participar en el gobierno de la Facultad de Farmacia, en los momentos tan difíciles y delicados en que se están produciendo los cambios tan profundos de las estructuras universitarias, que de forma tan negativa podían

influir en la propia esencia de la Facultad, es precisamente su prestigio como docente el que le permite ser elegido como Decano, en unas elecciones en que participan todos los estamentos, profesores, alumnos y personal administrativo. Habría que felicitar a nuestra Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense por su acertado criterio, al elegir los magníficos decanos que han regido sus destinos estos últimos años, los ya tristemente desaparecidos D. José Lucas Gallego y D. Angel Hoyos de Castro, académicos también de esta Real Academia en la que dejaron un imborrable recuerdo y D. Antonio Doadrio López, felizmente entre nosotros, con todos los cuales tuve el honor de colaborar en el gobierno de la Facultad.

Su bien hacer al frente de la Facultad y sus cualidades personales propiciando el buen entendimiento con los profesionales farmacéuticos y sus organismos rectores, ha permitido que el proceso de implantación de las prácticas tuteladas para la formación integral de nuestros estudiantes, haya sido modélico.

En estas circunstancias no es de extrañar que planteada la reelección por un segundo período de cuatro años, los electores se decantaron por su continuidad. Para mí este hecho es por sí demostrativo del prestigio alcanzado por el Profesor del Castillo en momentos difíciles y complicados, con estructuras universitarias cambiantes, adaptación y puesta a punto de nuevos planes de estudio, de titulaciones propias de Universidad, etc. que siempre crean las inevitables tensiones en el alumnado y profesorado, es como digo su prestigio el que ha permitido llevar al buen entendimiento a todos los estamentos de la Facultad.

Pero aún tendríamos nuevos hechos que precisar que nos pueden ilustrar sobre la personalidad del Profesor del Castillo. Hay un momento en que las circunstancias exigieron que se institucionalizara lo que se denominó Conferencia Nacional de Decanos de las Facultades de Farmacia de España, con la misión concreta de armonizar criterios, no sólo en el plano docente, sino también en todo lo relativo a las relaciones entre las Facultades y los Colegios y Asociaciones Profesionales. Pues bien, a la hora de designar Presidente de dicha Conferencia, es de nuevo el prestigio del Profesor del Castillo, su poder integrador y su capacidad de trabajo reconocida, lo que le lleva a ser elegido para desempeñar dicho cargo, y posteriormente, en 1995 reelegido.

Ya en el plano internacional, al constituirse la Asociación Europea de Facultades de Farmacia, que asesora a

la Unión Europea en todo lo referente a las materias obligatorias que deben cursar todos los estudiantes de Farmacia, el Profesor del Castillo es designado Vocal del Comité Ejecutivo.

Otro tanto ocurre al constituirse la Conferencia Hispanoamericana de Facultades de Farmacia, en la que es designado Secretario de la misma, y en la que su trabajo se ha puesto de manifiesto con la redacción de los Estatutos por la que se rige, y con celebraciones periódicas en distintos países de Iberoamérica.

Pese a la actividad docente que ha quedado bien manifiesta, el Profesor del Castillo consciente del equilibrio que debe existir entre esta actividad y la investigadora, ha desarrollado una más que meritoria labor investigadora, plasmada en más de 40 trabajos publicados en revistas nacionales y extranjeras, orientados preferentemente a los análisis de medicamentos por técnicas de fluorescencia, lo que le ha hecho figurar como miembro de los Comités Científicos de numerosos Congresos Internacionales, entre los que destacaríamos el 2nd, 3rd y 5th *International Symposium on Drug Analysis* en Bruselas (1989) Amberes, Lieja (1992) y Lovaina (1995); el 2nd, 3rd, 4th y 5th *International Symposium on Quantitative Luminescence Spectrometry in Biomedical Sciences*, Gante (1987, 1989, 1991 y 1993); el 6th *International Symposium on Luminescence Spectrometry in Biomedical Analysis.- Detection Techniques and Applications in Chromatography and Capillary Electrophoresis*, Brujas (1994). Fruto de este reconocimiento a nivel internacional, son las distinciones de que ha sido objeto. En el año 1990 ingresa como Académico Correspondiente de esta Real Academia de Farmacia, a la que ha aportado su ininterrumpida colaboración.

Por los trabajos presentados junto a sus colaboradores, a los sucesivos concursos científicos de esta Academia, es de destacar que en el período de 1980 a 1990 es premiado en cinco ocasiones con el Premio Cofares (1980, 1981, 1985, 1989 y 1990); en dos ocasiones con el Premio del Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos de España (1989 y 1990) y en una ocasión con el Premio Alberto Comenge (1989).

En el año 1992 recibe la "Distinción Bicentenario" por servicios prestados a la Universidad de Los Andes (Mérida, Venezuela) y en el año 1993 ingresa como Académico Correspondientes en la Real Academia de Medicina de Bélgica.

Revistas científicas tan prestigiosas como *Analytica Chimica Acta* y *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, le nombran miembro de su Comité Asesor para la supervisión de los trabajos que publican.

Su discurso, redactado para este solemne acto, es un trabajo para ser leído con atención y en su integridad, en el que se pone de relieve su faceta oculta de historiador de la química, en la que ya había hecho algunas incursiones con publicaciones tales como: "Reflexiones sobre la historia de la fluorescencia" en el Boletín de la Sociedad Española de Historia de la Farmacia (1987).

Al comentar lo que denomina su visión histórica de la instrumentación analítica, hace un recorrido por el Museo de la Farmacia Hispana, y nos hace una detallada enumeración del instrumental que atesora, hasta tal punto que cree uno encontrarse ante un trabajo de catalogación de sus fondos.

Se lamenta de la desaparición de tantos instrumentos en nuestras universidades al no existir la sensibilidad suficiente como para comprender el valor museístico de los mismos. Es una llamada de atención a la que me sumo con verdadero entusiasmo.

En la parte descriptiva de la Historia de la Química puede verse con claridad que está escrita en clave analítica, situando al análisis químico, que luego se hará análisis instrumental, como juez sancionador, en virtud precisamente de los resultados analíticos, de las buenas o malas teorías.

Al llegar a los años treinta, nos presenta el desarrollo de la instrumentación analítica por períodos decenales, lo que permite seguir, perfectamente sistematizados, los avances en las técnicas espectroscópicas tanto atómicas como moleculares, las electroquímicas y las cromatográficas tanto analíticas como preparativas. Hace especial incapié en aquellas que tienen una marcada proyección a la farmacia, incluidas por supuesto, las orientadas a la analítica clínica.

Ello no es óbice para que, volviendo a aparecer su vena artística, se detenga en darnos unas pinceladas de las aplicaciones de las técnicas instrumentales en los análisis de obras de arte, que permiten resolver enigmas planteados y, sobre todo, para evitar el fraude con las obras de los grandes pintores.

Es sin embargo a la fluorimetría a la que dedica la máxima atención, lo que no es de extrañar pues en ella estuvieron sus primeras experiencias investigadoras, y es su línea de trabajo cultivada desde entonces. Si nos fijamos bien, no deja ningún punto sin tratar, desde los datos históricos conocidos sobre el descubrimiento del fenómeno de luminiscencia, hasta las modernas aplicaciones analíticas centradas en los biosensores de fibra óptica.

En medio se expone con claridad la relación de la estructura química de las moléculas con su eficacia cuántica de fluorescencia, en especial en lo referente a la planaridad, presencia de grupos cromóforos, sustituyentes halogenados, etc., que ilustra con ejemplos tan típicos como el de la morfina y heroína.

Al tratar la parte experimental, se detiene en explicar con la mayor claridad los factores que pueden influir en los espectros de fluorescencia, así como la forma de conseguir los que se denominan espectros corregidos. Hay para consulta una gran lista de los compuestos medicamentosos que poseen fluorescencia nativa.

A los marcadores fluorescentes le dedica bastante atención, precisamente para resaltar su utilidad en las investigaciones de aquellos medicamentos, y sus metabolitos, que dada su estructura, carecen de fluorescencia nativa.

Aquí se puede traer a colación las aplicaciones de estos marcadores fluorescentes en la biología celular y en la genética a través de la técnica de fluorescencia con hibridación "*in situ*" (FISH), que permite la localización de secuencias específicas de DNA o RNA.

Desarrollo reciente de estos fluorocromos están permitiendo la identificación de anomalías cromosómicas caracterizadas por el cambio del número, o posición relativa de determinadas secuencias específicas de ADN, tales como deleciones, translocaciones, aneuploidía, etc.

El profesor del Castillo culmina su exposición con una amplia descripción de los diferentes tipos de sensores ópticos y biosensores, especialmente los de fibra óptica, que están revolucionando la instrumentación analítica.

* * * * *

Tan interesante es el conocer el desarrollo histórico de los análisis instrumentales para un profesor

universitario, como lo es la puesta al día de los avances en la instrumentación. La revista *Science* dedica uno de sus números al año a glosar los últimos logros de las técnicas instrumentales, que lo justifica por el hecho evidente de que casi todo en las ciencias experimentales depende sustancialmente del continuo desarrollo de la instrumentación.

Es evidente que los nuevos instrumentos están permitiendo hacer mejor investigación, en menor tiempo y en definitiva más eficientemente.

El reto planteado para la instrumentación del futuro, hoy que toda la investigación hay que llevarla a nivel molecular, es la posibilidad de realizar los análisis en microentornos, y con micromuestras. Estamos hablando de técnicas analíticas que permitan poder ser realizadas con una gran resolución en espacios de 1 a 100 nanómetros, en intervalos de tiempos de 1 a 1.000 microsegundos, con sensibilidades del orden de los femtomoles y mayores, y sobre todo, con una alta especificidad.

Y esto no es una utopía inalcanzable; en este momento los avances en la microscopía están permitiendo poderes de resolución a nivel molecular; técnicas electroforéticas y cromatográficas con columnas capilares, permiten separar micromuestras muy complejas, y que detectores de alta especificidad, especialmente del tipo de los denominados biosensores nos están aproximando a sensibilidades muy próximas a la detección de una simple molécula.

El acoplamiento de técnicas analíticas unido a la miniaturización, es un proceso imparable en la química analítica, y hasta tal punto es una realidad, que grupos de investigadores han podido sustituir, con éxito, grandes equipos instrumentales actuales, por dispositivos de cámaras de reacción, canales separadores, etc. excavados en láminas de silicio del tamaño de un sello de correos.

Este es el caso de un grupo de investigadores del laboratorio Ciba-Geigy, dirigidos por Adreas Manz, que han conseguido ensamblar un sistema de HPLC, con canales de 300 μm de ancho y de una longitud de 2 cm que actuarán de microcolumnas con los absorbentes normalmente usados en sistemas de este tipo. Otra serie de microcanales en ambos extremos de la columna permitirán alimentarla con los eluyentes adecuados. Las primeras separaciones con colorantes fluorescentes han tenido el éxito esperado.

Otro tanto puede decirse de la preparación de un equipo de electroforesis capilar sobre lámina de silicio. En este caso se pretendía la separación de los fragmentos de restricción del DNA en una micromuestra, y para ello se situaba la muestra problema y las enzimas de restricción en cámaras diferentes sobre el mismo "chip" de silicio. Sistemas de bombeo permiten que se pongan en contacto y una vez concluido el proceso enzimático, se pasa la muestra a la columna capilar para su separación electroforética.

Citaremos lo que para algunos suena a misión imposible, el de poder seguir los cambios que tienen lugar en el interior de una célula, mediante la identificación de las miles de proteínas que en ella se producen, y en qué momento a través del tiempo. Sin embargo, esa tarea que parecía imposible se vislumbra ya como realizable, en virtud, una vez más, a los avances en las técnicas analíticas de proteínas.

Conocemos el gigantesco esfuerzo realizado a nivel mundial para llevar a cabo el proyecto del genoma humano, de cuyos beneficios para la humanidad no voy a entrar, pero sí indicar que queda una laguna indispensable de rellenar. Se trata de que con la secuencia de un determinado gen no podemos describir completamente la estructura de la proteína que él codifica, ya que tras su síntesis la proteína sufre, usualmente, modificaciones postraduccionales del RNA mensajero, del tipo de adición de grupos fosfatos, pérdida de aminoácidos en los finales de su cadena, acetilación, entre las 200 descritas, que pueden alterar sustancialmente su actividad biológica.

De aquí que se considere como inevitable complemento al proyecto del genoma humano, el conocimiento de las proteínas sintetizadas, campo de investigación que empieza a conocerse como el **proteoma humano**.

Las grandes dificultades que hasta ahora se encontraban para el estudio de estas proteínas, se están solventando muy rápidamente gracias al concurso de los nuevos métodos de espectrometría de masas, que simplifican la identificación de las proteínas en muy pequeñas muestras y que hace posible a los investigadores su asignación al gen correspondiente, tras la rápida consulta a las bases de datos de las secuencias de genes.

Con anterioridad a este nuevo enfoque, ya se realizaban intentos de identificación proteicas, sobre la base de utilizar las técnicas de electroforesis en geles bidimensionales, es decir realizar una primera separación en

virtud de la carga eléctrica y la segunda en función del tamaño molecular. En estas condiciones, el extracto proteico celular tras el desarrollo electroforético y subsiguiente tinción del gel, proporciona imágenes con 1000 a 3000 manchas, por lo general de simples proteínas. En principio estas imágenes del gel permitían conocer no sólo la cantidad de proteínas presentes en el extracto celular, sino también las modificaciones postraduccionales que ellas han llevado a cabo.

El freno mayor para estos estudios era la dificultad para reproducir los resultados, en virtud de las características de los geles. Hoy sin embargo se ha avanzado mucho en la manufactura de los geles y la técnica ha mejorado sustancialmente, pero lo más importante ha sido que las manchas electroforéticas pueden ser transferidas a membranas y de ellas aislar las correspondientes proteínas para ser identificadas, y aquí es donde una conocida técnica instrumental, la espectrometría de masas, en sus versiones modernas, abre el camino para el desarrollo de técnicas automatizadas que, según los expertos, identificarían sin ambigüedad hasta 10 proteínas por día, que serían introducidas en las bases de datos correspondientes.

Ya existe un sistema informático desarrollado por Amos Bairoch y Apple, denominado ExPASy (*Expert Protein Analysis System*) que permite unir las bases de datos de las electroforesis bidimensionales en geles, con las bases de datos de secuencias proteicas.

Si, como se supone, las modificaciones postraduccionales constituyen uno de los mayores factores en el desarrollo de determinadas enfermedades, los datos que nos pueden proporcionar las citadas técnicas constituirán lo que ya empieza a denominarse un **scanner** clínico molecular.

Por su parte, la ayuda que estas técnicas van a representar en los ensayos farmacológicos y tóxicos de los medicamentos es incalculable.

Llegando a este punto, en lo que no he pretendido más que apostillar la visión realista que nos ha presentado en su discurso el Profesor del Castillo sobre el papel de las Técnicas Instrumentales en lo que entendemos por Farmacia en su más amplio sentido, no puedo por menos de recordar las dificultades que hubo que vencer para conseguir su implantación definitiva en los estudios de la licenciatura en Farmacia. En todo este proceso, el profesor del Castillo ha sido testigo y directo colaborador, y les puedo asegurar que el camino recorrido no ha sido nada fácil, y muchas

veces nos preguntábamos el por qué de estas dificultades.

Uno de esos momentos difíciles se presentó al iniciarse la docencia de las Técnicas Instrumentales como asignatura obligatoria en el tercer curso de la Licenciatura en el denominado plan de estudios de 1973. En ese momento una Comisión del Plan de Estudios propuso un cambio del plan, que representaba la práctica desaparición de la asignatura, al reducir su carga docente a un cuatrimestre y en el primer curso de la Licenciatura. La Junta de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense, previa votación rechazó dicha propuesta, pero incomprensiblemente replanteada la propuesta 24 horas después, la misma Junta de Facultad, eso sí en mi ausencia, le dio su aprobación.

Nunca pude comprender esa falta de visión de futuro sobre las necesidades formativas de los alumnos en el campo de la analítica farmacéutica.

Afortunadamente dicha propuesta de modificación del plan de estudios fue rechazada por la Junta de Rectores y el propio Ministerio de Educación y Ciencia.

No extrañará pues a nadie que yo exprese en este momento la inmensa satisfacción que me produce estar presente y participar en esta ceremonia de ingreso como Académico Numerario del Profesor del Castillo, pues soy consciente que estamos cumpliendo con el deber de respetar las esencias tradicionales de esta Real Academia de Farmacia al incorporar por qué no decirlo, un farmacéutico de cuerpo entero, que nos asegura que entre los muros de este venerable edificio, que no olvidemos fue donado por los propios farmacéuticos, se seguirá hablando de la analítica farmacéutica.

Y nadie piense que estas palabras puedan tener un significado de pasar la "antorcha" de las Técnicas Instrumentales al Profesor del Castillo, pues hace ya años que con su trabajo, que con más voluntad que acierto he tratado de sintetizar, se ha construido su propia antorcha que lleva con gran dignidad y que le aseguran un lugar de liderazgo en los anales de la analítica farmacéutica.

Y no queda más que expresarle mi felicitación, lo mismo que a Petri, que como él cariñosamente dice le ha financiado con su trabajo su carrera docente, y a sus hijos que estarán viviendo con orgullo un día tan importante en la vida de su padre.

Y voy a terminar haciendo más las mismas palabras con las que fui recibido en la Academia por el Excmo. Sr. D. Enrique Otero Aenlle, que me hizo el alto honor de contestar a mi discurso de ingreso, y que quiero que sirvan a la vez de sentido homenaje a su memoria.

"Una vez que hemos escuchado con la más expectante atención este magnífico discurso, en el que están perfectamente conectados los conocimientos teóricos más actuales, con una aportación original destacada y un sentido de aplicación práctico evidente, comprendereis con cuanta justicia y acierto recibe hoy la Real Academia de Farmacia a tan distinguido compañero.

Por eso me siento muy honrado por darle la bienvenida en nombre de la misma, y al felicitarle a él, felicitarnos a nosotros mismos por la valiosa aportación que su ingreso representa para esta ilustre Corporación".