

## UTILIZACIÓN DE NARICES ELECTRÓNICAS BASADAS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS EN ESTRATEGIAS NO SEPARATIVAS

GRUPO OLFATOUSAL

Departamento de Química Analítica, Nutrición y Bromatología. Facultad de Ciencias Químicas. Universidad de Salamanca

### INTRODUCCIÓN

La solución de muchos problemas analíticos se basa en la obtención de información sobre compuestos aislados. La etapa de tratamiento de muestra suele ser la más larga y costosa del proceso analítico y una de las mayores fuentes de errores. Sin embargo, en algunas situaciones la información contenida en señales de tipo perfil, puede ser suficiente para poder tomar decisiones sobre el problema planteado.

Dentro de esta estrategia de obtención de señales e información pueden citarse técnicas como el NIRS<sup>1,2</sup>, la utilización de membranas para la introducción directa en la fuente de ionización del espectrómetro de masas (MIMS)<sup>3,4</sup>, Pirolisis-MS<sup>5</sup> y dispositivos instrumentales conocidos como lenguas y narices electrónicas<sup>6,7</sup>; estas últimas se utilizan para caracterizar muestras a partir del perfil de compuestos volátiles. En estos casos, el tratamiento de muestra es reducido al mínimo o eliminado y en la etapa de tratamiento de datos suele ser necesaria la utilización de técnicas quimiométricas.

Esta metodología no separativa puede utilizarse como criba de muestras (presencia/ausencia de una característica) de forma que permite descartar muestras negativas y de esta manera reducir el número de muestras que precisan métodos confirmatorios separativos generalmente más lentos, laboriosos y costosos.

### NARICES ELECTRÓNICAS

En 1982 Persaud and Dodd, profesores de la Universidad de Warwick, desarrollaron la idea del dispositivo que se conoce actualmente como nariz electrónica<sup>8</sup>. Hoy en día se acepta la definición de "nariz electrónica" dada por Gardner y Bartlett<sup>6</sup> en 1994; ellos la definen como *un instrumento que comprende un conjunto de sensores químicos electrónicos con cierta especificidad y un sistema de reconocimiento de pautas adecuado, capaces de reconocer olores simples y complejos.*

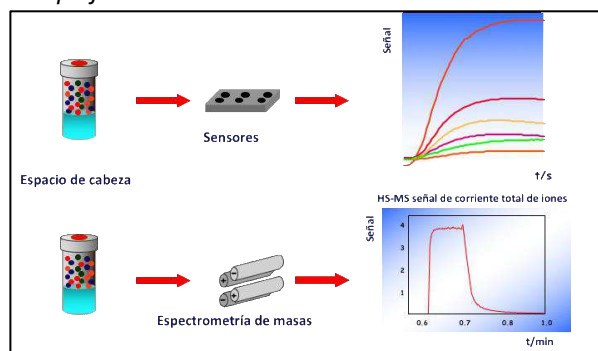


Figura 1. Narices electrónicas y señales que generan

De alguna forma, estos dispositivos intentan emular el funcionamiento del sentido del olfato de los mamíferos. En las narices electrónicas las señales generadas en un conjunto de sensores son procesadas matemáticamente para identificar conjuntos de compuestos (patrones de composición) o incluso para cuantificar compuestos individuales.

### CONFIGURACIONES INSTRUMENTALES

Se pueden considerar dos aproximaciones instrumentales diferentes: las basadas en la utilización de conjuntos de sensores de gases y las basadas en la utilización de un analizador de masas. En ambos casos las etapas del proceso de medida son las siguientes:

Se coloca la muestra en un vial, se cierra herméticamente y se calienta un tiempo determinado hasta que se alcanza el equilibrio. Posteriormente, una

<sup>1</sup> M.R. Cavalcanti, K.M. Gomes de Lima, V. Garcia Lopes, J.D. Cruz Pessoa, G.H. de Almeida, *Food. Chem.*, 136, 1160-1164 (2013).

<sup>2</sup> J.C.L. Alves, R.J. Poppi, *Fuel*, 165, 379-388 (2016).

<sup>3</sup> M. Moral, C. Tu, N. Richards, D. Silverman, *Anal. Biochem.*, 418, 73-77 (2011).

<sup>4</sup> S. Bauer, *Trend. Anal. Chem.*, 14, 202-213 (1995).

<sup>5</sup> F. Liu, B. Li, W. Li, Z. Bai, J. Yperman, *Fuel Process. Technol.*, 91, 1486-1490 (2010).

<sup>6</sup> J.W. Gardner, P. Bartlett, "A brief history of electronic noses", *Sensors and Actuator B: Chem.*, 18-19, 211-220 (1994).

<sup>7</sup> J.W. Gardner, P.N. Bartlett, "Electronic Noses: Principles and Applications", Oxford University Press, New York (1999).

<sup>8</sup> K.C. Persaud, G. Dodd, *Nature*, 299, 352 (1982).

fracción de los volátiles generados se hace pasar a través de la cámara de sensores o se dirige al espectrómetro de masas registrándose la señal correspondiente en función del tiempo (figura 1). Esta señal puede ser utilizada como “huella dactilar” de la fracción de volátiles que se ha inyectado. Cuando se utiliza espectrometría de masas, para cada tiempo, se dispone además del espectro de masas del conjunto de volátiles.

Centrándonos en los dispositivos que utilizan analizadores de masas, la configuración más habitual (figura 2) utiliza la modalidad de generación de espacio de cabeza estático y su introducción directa en el espectrómetro de masas. En menor medida, debido a que el tiempo de análisis es mayor, se utiliza la generación de espacio de cabeza dinámico (purga y trampa) o la inclusión de una etapa adicional de preconcentración como la microextracción en fase sólida.

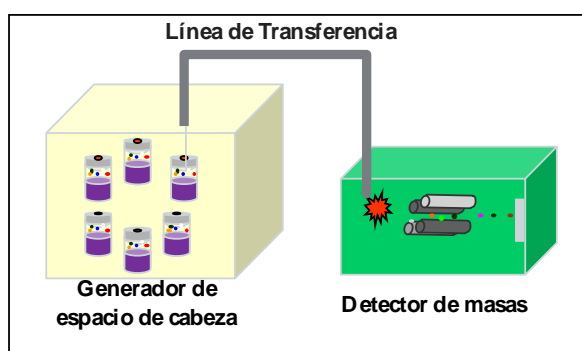


Figura 2. Configuración HS-MS

Existen en el mercado diversas casas comerciales que diseñan equipos HS-MS, HS-GC-MS y HS-sensores-MS específicos para diversos propósitos. Una alternativa a estos equipos consiste en utilizar un GC-MS convencional en el que se sustituye la columna cromatográfica por un capilar desactivado o en el que se elimina la capacidad separativa de la columna trabajando a elevadas temperaturas (figura 3).

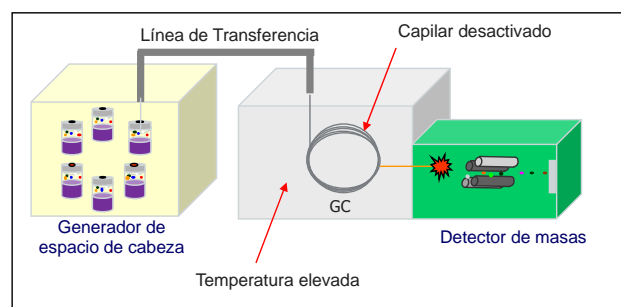


Figura 3. Configuración HS-(GC)-MS

Con esta última configuración, es posible llevar a cabo medidas sin separación o con separación cromatográfica simplemente controlando la temperatura del horno. Esto permite utilizar estrategias no separativas como método de criba (screening) y, para las muestras que dan resultado positivo, utilizar el método separativo como método de confirmación.

La información que contienen las señales generadas puede utilizarse para la clasificación de muestras y para la determinación semicuantitativa o incluso cuantitativa de compuestos o de grupos de compuestos. Un analizador de masas puede considerarse como un conjunto abierto de sensores del que es posible hacer la selección más apropiada para cada problema analítico.

La obtención de la información contenida en las señales de tipo perfil hace necesario el uso de técnicas quimiométricas incluidas en muchos casos en los programas de tratamiento de datos de los equipos analíticos.

Quizás uno de los condicionantes más importantes de estas técnicas sea la inestabilidad de la señal, que se debe a múltiples factores. Las formas habituales para corregir estos efectos son la normalización interna, la utilización de patrones internos o la transferencia de calibrados.

La transferencia de calibrados mantiene la información cuantitativa y no presenta los problemas de la adición de patrones internos, por lo que es una opción interesante para corregir los problemas de inestabilidad de la señal<sup>9</sup>. Nuestro grupo de investigación ha abordado a lo largo de los últimos 20 años el desarrollo de métodos no separativos en campos y matrices diferentes: agroalimentario, farmacéutico, medioambiental, combustibles, y en la determinación de biomarcadores en fluidos biológicos. A continuación, se resumen los logros alcanzados en las diferentes áreas de estudio.

### APLICACIONES ANALÍTICAS EN EL CAMPO AGROALIMENTARIO

Los primeros trabajos se llevaron a cabo con una nariz electrónica de sensores de óxidos metálicos de la casa ALPHA MOS (Fox 4000, Toulouse, France) obteniéndose, para la mayoría de los objetivos propuestos, buenos

<sup>9</sup>J.L Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, Anal. Chem., 75, 6361-6367 (2003).

resultados<sup>10,11,12</sup>. Sin embargo, cuando se utilizó esta instrumentación para la diferenciación de aceites monovarietales procedentes de la región Beira Baixa de Portugal los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios; por ello, se modificó la estrategia y algunos de los estudios realizados previamente fueron abordados de nuevo utilizando una configuración HS-MS (Chemical Sensor HP4440 A, modificado) basada en el acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza (HP 7694) a un espectrómetro de masas cuadrupolar (HP 5973N). Con esta nueva configuración los resultados obtenidos mejoraron notablemente<sup>13</sup>.

### APLICACIONES ANALÍTICAS EN EL CAMPO FARMACÉUTICO

En primer lugar, se abordó el estudio de la degradación de medicamentos sin realizar ningún tratamiento previo de muestra, simplemente introduciendo los comprimidos directamente en los viales y sellándolos posteriormente. Mediante la utilización de calibración multivariante se determinó la concentración de principio activo, con errores inferiores al 5%, las concentraciones de los dos compuestos mayoritarios que aparecen en el proceso de degradación y el contenido total de impurezas.

La segunda de las aplicaciones abordadas fue la identificación y cuantificación de posibles disolventes residuales. El estudio se llevó a cabo en 27 preparados farmacéuticos. La cantidad máxima de disolventes residuales que pueden contener los productos farmacéuticos está limitada por diversas regulaciones y por lo tanto es necesario su control. Habitualmente se recurre a procedimientos cromatográficos laboriosos de los cuales la única información buscada es si la cantidad presente de dichos disolventes sobrepasa o no el límite permitido. Se propuso un método rápido y con un mínimo tratamiento de la muestra basado en HS-MS. La señal se obtiene en tan solo 3 minutos y la

cuantificación mediante adición estándar proporcionó resultados muy satisfactorios<sup>14,15</sup>.

### APLICACIONES ANALÍTICAS EN EL CAMPO MEDIOAMBIENTAL

En el campo ambiental se ha utilizado el acoplamiento HS-MS o HS-fastGC-MS para la detección e identificación de hidrocarburos derivados del petróleo crudo en suelos contaminados y la identificación de la fuente de contaminación<sup>16,17</sup>. En la figura 4 se muestra el perfil del conjunto de volátiles (corriente iónica total) y el espectro de masas que se obtiene a los 0.68 min para una muestra de arena comercial limpia dopada con petróleo Olmecca. Otros estudios en este campo han estado centrados en la determinación de hidrocarburos y aditivos presentes en diversos tipos de gasolinas<sup>18,19,20</sup>, en la diferenciación de los diversos tipos de crudo de petróleo en muestras de suelos contaminados<sup>21,22</sup> y en la determinación simultánea de compuestos oxigenados (BTEX) procedentes de gasolinas en aguas<sup>23</sup>.

### APLICACIONES ANALÍTICAS EN EL CAMPO BIOMÉDICO

En el campo de la biomedicina, se han desarrollado varias metodologías tanto separativas como no separativas, basadas en espectrometría de masas, para la detección y determinación de biomarcadores,

<sup>10</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *Anal. Chem.*, 75, 6361-6367 (2003).

<sup>11</sup> Y. González Martín, J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *Anal. Chim. Acta*, 384, 83-94 (1999).

<sup>12</sup> M.C. Cerrato Oliveros, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, M. Forina, *Anal. Chim. Acta* 459, 219-228 (2002).

<sup>13</sup> I. Marcos Lorenzo, J.L. Pérez Pavón, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 945, 221-230 (2002).

<sup>14</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez; C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *Anal. Chem.*, 78, 4901-4908 (2006).

<sup>15</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez; M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 1141, 123-130 (2007).

<sup>16</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, A. Guerrero Peña, *Anal. Chem.*, 75, 2034-2041 (2003).

<sup>17</sup> J.L. Pérez Pavón, A. Guerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 1047, 101-109 (2004).

<sup>18</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, M.E. Fernández Laespada, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *Anal. Chim. Acta*, 576, 156-162 (2006).

<sup>19</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez; M.E. Fernández Laespada; C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *Talanta*, 72, 256-262 (2007).

<sup>20</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez; C. García Pinto, M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 1048, 133-139 (2004).

<sup>21</sup> J.L. Pérez Pavón, A. Guerrero Peña, C. García Pinto, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 1137, 101-109 (2006).

<sup>22</sup> J.L. Pérez Pavón, C. García Pinto, A. Guerrero Peña, B. Moreno Cordero, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391, 599-607 (2008).

<sup>23</sup> J.L. Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez; M.E. Fernández Laespada, B. Moreno Cordero, *J. Chromatogr. A*, 1175, 106-111 (2007).

fundamentalmente, de cáncer de pulmón<sup>24,25,26</sup>. Los compuestos estudiados fueron diversos y se pueden destacar: alcoholes (2-etil-1-hexanol y 3-metil-1-butanol), cetonas (2-butanona, 2-pentanona, 3-heptanona y 3-octanona) y ésteres (acetato de etilo), entre otros. Los métodos se aplicaron a muestras de saliva<sup>27,28,29</sup> y orina<sup>30,31,32</sup> tanto de individuos sanos como de enfermos. Estos fluidos tienen la ventaja de que la toma de muestra se realiza de forma no invasiva al contrario que cuando se utilizan muestras de sangre o plasma.

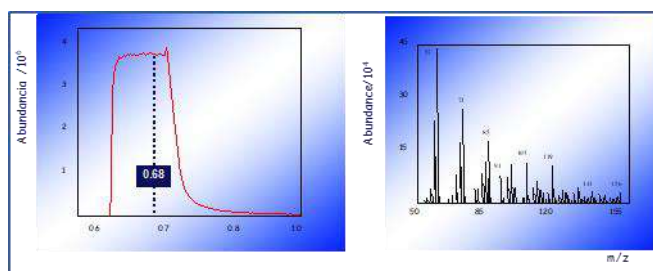


Figura 4. Perfil del conjunto de volátiles y espectro de masas.

Con el fin de incrementar la sensibilidad de los métodos se propuso por primera vez, en este tipo de metodologías la incorporación de un inyector de temperatura programada (PTV) a una nariz electrónica (HS-PTV-MS). Este tipo de dispositivos permiten que la inyección pueda llevarse a cabo de formas muy diferentes. En una de ellas, denominada inyección con

purga de disolvente, en la que se elimina la mayor parte del disolvente, se introduce un volumen de muestra relativamente grande mientras se mantiene el inyector a baja temperatura. Con esta nueva configuración se obtiene un aumento de sensibilidad de aproximadamente un orden de magnitud (figura 5)

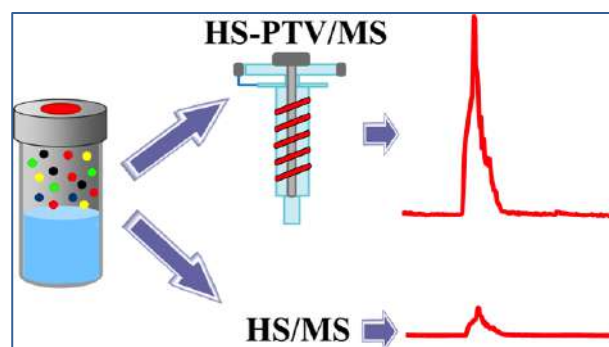


Figura 5. Comparación de las señales que se obtienen para configuraciones HS-MS y HS-PTV-MS.

Cuando se encontraron muestras con resultados positivos para alguno de los biomarcadores objeto del estudio, los resultados se confirmaron, en una segunda etapa, con el correspondiente método cromatográfico y con un análisis anatomopatológico realizado en el hospital Virgen Vega de Salamanca. Esta estrategia permite extender el uso de las metodologías no separativas a un gran número de pacientes y reserva el uso de los métodos cromatográficos solo para aquellas que sean necesarias (figura 6).

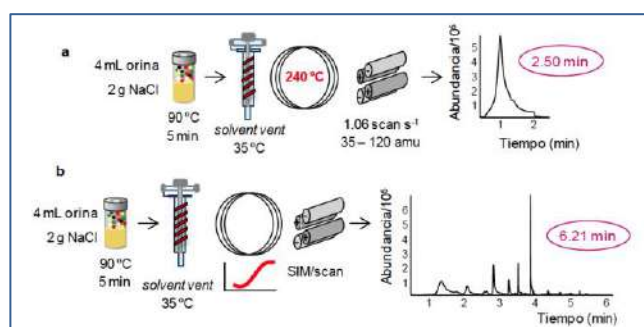


Figura 6. Esquema de las configuraciones instrumentales de (a) método de criba (screening) HS-PTV-MS y (b) método de confirmación HS-PTV-GC-MS para muestras de orina.

Se ha realizado también un estudio que tenía como objetivo comprobar si las señales de los perfiles en su conjunto podrían servir para diferenciar muestras de saliva de individuos sanos de las de individuos enfermos sin obtener información de ningún compuesto concreto. Este estudio se llevó a cabo con un conjunto de 55 muestras, 32 de individuos sanos y 23 de pacientes con

<sup>24</sup> J.L Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez. "Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering". Elsevier Inc 1-4 (2016).

<sup>25</sup> J.L Pérez Pavón, M. del Nogal Sánchez, A.M. Casas Ferreira, B. Moreno Cordero, "Encyclopedia of Analytical Chemistry", John Wiley & Sons 1-7 (2017).

<sup>26</sup> A.M. Casas Ferreira, M. del Nogal Sánchez, J.L Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Anal. Chim. Acta, 1045,10-22 (2019).

<sup>27</sup> M. del Nogal Sánchez, E. Hernández García, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Anal. Chem. 84 379-385 (2012).

<sup>28</sup> M. del Nogal Sánchez, P. Callejo Gómez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, A.P. Crisolino Pozas, A. Sánchez Rodríguez, Anal. Chem., 86 ,7890-7898 (2014).

<sup>29</sup> A. Pérez Antón, M. del Nogal Sánchez, A.P. Crisolino Pozas, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Talanta 160 21-27 (2016).

<sup>30</sup> A. Pérez Antón, A. García Ramos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, A.P. Crisolino Pozas, Anal. Bioanal. Chem. 408, 5239-5246 (2016).

<sup>31</sup> A. García Ramos, A. Pérez Antón, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Talanta 174, 158-164 (2017).

<sup>32</sup> P. Martín Santos, M. del Nogal Sánchez, A.P. Crisolino Pozas, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, Anal. Bioanal. Chem., 409 5689-5696 (2017).

diferentes tipos de cáncer, observándose algunas diferencias en los perfiles medios de los dos grupos de muestras. La mejor asignación para el grupo de muestras de validación externa se obtuvo con la técnica denominada vectores soportados en la frontera (SVM).

Recientemente se han propuestos métodos para el análisis de biomarcadores de exposición (hidrocarburos policíclicos aromáticos, PAHs)<sup>33,34</sup> que se están aplicando en muestras de orina y saliva de personas que trabajan en el parque de bomberos de Salamanca, debido a su gran exposición a estos compuestos.

Actualmente se continúa el trabajo relacionado con la determinación de biomarcadores y se están probando algunas vías que permitan ampliar el abanico de compuestos que podrían detectarse ya que la generación del espacio de cabeza limita el estudio de analitos poco volátiles.

Una estrategia novedosa consiste en introducir directamente la muestra (orina y saliva) en una fuente de ionización por electrospray con un analizador de masas de triple cuadrupolo. Esta configuración permite diferentes posibilidades de barrido permitiendo, por ejemplo, seguir varias transiciones de forma casi simultánea. Con esta metodología se ha puesto a punto un método para la determinación de poliaminas en saliva y orina.

Las poliaminas son metabolitos que se encuentran en la orina de forma natural pero cuyas concentraciones pueden variar considerablemente cuando se producen determinadas patologías entre las que se encuentran diferentes tipos de cáncer. En el procedimiento que se está desarrollando las muestras de orina simplemente se diluyen (1/10) y se les añade una pequeña cantidad de ácido heptaclorobutírico.

La figura 7 muestra las transiciones que se siguen para putrescina, cadaverina, espermidina y espermina y el registro de una muestra de orina en el que se ven los perfiles de las cuatro transiciones seleccionadas. Con las pequeñas anchuras de los picos que se generan la medida de una muestra lleva menos de un minuto.

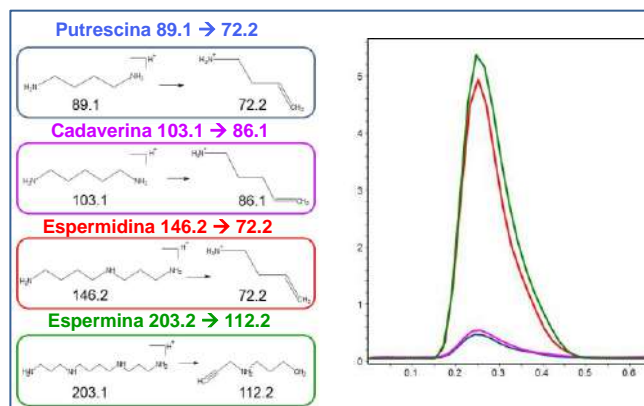


Figura 7. Transiciones seleccionadas para 4 poliaminas y registro para una muestra de orina diluida 10 veces.

## CONCLUSIONES

En los últimos años ha habido un gran auge en el desarrollo de métodos no separativos, debido principalmente a su elevada velocidad de análisis. En este sentido, se ha propuesto la utilización de “narices electrónicas” basadas en sensores de gases para la resolución de muchos problemas de clasificación y cuantificación.

Como alternativa a estos sistemas se ha propuesto la utilización de “narices electrónicas” basadas en el acoplamiento directo de un generador de espacio de cabeza (HS) a un espectrómetro de masas (MS). Esta configuración (HS-MS) presenta ventajas con respecto a los conjuntos de sensores de gases y además, un espectrómetro de masas puede considerarse como un “conjunto abierto de sensores” del que es posible seleccionar fácilmente el subconjunto más apropiado para resolver cada problema concreto mediante la elección de las relaciones masa/carga adecuadas. Se han desarrollado aplicaciones en diversos campos de interés con resultados muy favorables.

A pesar de las ventajas del acoplamiento HS-MS, la principal limitación de esta técnica radica en que no es posible llevar a cabo el análisis de compuestos no volátiles.

En este sentido, se han propuesto configuraciones instrumentales basadas en la inyección en flujo para el análisis de compuestos no volátiles mediante la introducción directa en el espectrómetro de masas.

<sup>33</sup> P. Martín Santos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, *Talanta*. 181, 373–379 (2018).

<sup>34</sup> P. Martín. Santos, M. del Nogal Sánchez, J.L. Pérez Pavón, B. Moreno Cordero, R. Verde Fernández, *Talanta*, 192, 69–78 (2019).