

AVANCES EN LA UTILIZACIÓN DE DATOS DE CUATRO Y CINCO VÍAS, BASADOS EN MATRICES DE EXCITACIÓN-EMISIÓN DE FLUORESCENCIA, PARA APLICACIONES ANALÍTICAS

A. Muñoz de la Peña, A. Espinosa-Mansilla, I. Durán Martín-Merás, O. Monago-Maraña, M. Cabrera-Bañegil
Departamento de Química Analítica, Universidad de Extremadura, Badajoz, España

Introducción

El campo de la calibración multivariante se ha expandido en los últimos años con el desarrollo de múltiples aplicaciones analíticas en muestras complejas. En muchas de ellas se han utilizado datos luminiscentes de excitación-emisión de tres vías y, en unos pocos casos, se trabaja con datos de cuatro vías e incluso de cinco vías [1-5]. Las calibraciones que emplean estos datos de cuatro o cinco vías se denominan de tercer o cuarto orden, respectivamente. Aumentar el número de vías para obtener estos datos, a pesar de la complejidad de los mismos, lleva asociada una serie de ventajas.

Booksh y Kowalski, en 1994, definieron un concepto en la calibración de segundo orden (datos de tres vías) que se conoce como la *ventaja de segundo orden*. Dicha ventaja establece que, bajo ciertas circunstancias, las concentraciones de los componentes de interés, en una muestra a analizar, pueden ser obtenidas mediante la separación de las señales de los analitos de interés de las señales no calibradas procedentes de la matriz o de la presencia de interferencias [6]. Los autores se refieren también a una hipotética *ventaja de tercer orden* correspondiente a la calibración de tercer orden (datos de cuatro vías). En la actualidad, 25 años después, diferentes autores han discutido sobre la existencia de dicha ventaja, así como sobre las limitaciones del uso de la calibración de tercer orden o de orden superior [7-9]. Entre las ventajas descritas por diferentes autores, y soportadas por evidencias experimentales, se encuentran: 1) la posibilidad de descomponer una matriz de datos única de una muestra dada independiente de otras muestras, 2) la mejora de la sensibilidad y la selectividad, así como de otras figuras analíticas de mérito, 3) un mayor poder de resolución que los métodos de tres vías y 4) la posibilidad de resolver problemas de co-linealidad al incluir una vía instrumental adicional. Las aplicaciones analíticas descritas hasta el momento se reúnen en un reciente artículo de revisión [9].

La inclusión de esta cuarta vía adicional se ha propuesto utilizando diferentes estrategias que se describen a continuación (Figura 1), unidas a la obtención de matrices de excitación-emisión (excitation-emission matrices, EEMs).

EEMs-tiempo de reacción (cinética)

Uno de los procedimientos más utilizados para obtener experimentalmente datos de cuatro vías es la inclusión del comportamiento cinético como información adicional, basado en que los compuestos de interés pueden degradarse, oxidarse, reducirse etc.

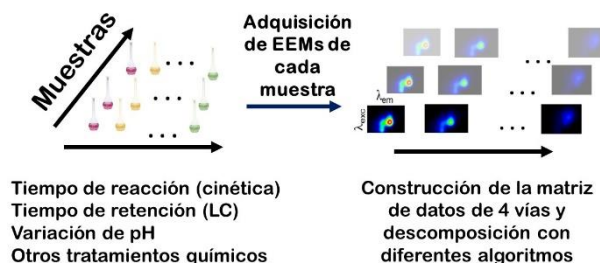


Fig. 1. Diferentes estrategias experimentales de obtención de datos de cuatro vías.

Una de las reacciones más utilizada está basada en la oxidación con permanganato potásico. Así, nuestro grupo ha propuesto métodos de determinación de metotrexato y leucovorín en orina humana utilizando análisis paralelo de factores (PARAFAC) y dos nuevos algoritmos propuestos para tratar este tipo de datos, mínimos cuadrados trilineales (TLLS) y mínimos cuadrados parciales desdoblados (U-PLS) combinados con trilinealización residual (RTL) [10, 11]. Similarmente, se determinaron metotrexato y ácido fólico en muestras de orina y suero [12, 13].

En este contexto, con el objeto de obtener una mejora en el método analítico, desarrollamos un nuevo algoritmo de calibración multivariante de tercer orden, basado en la combinación de mínimos cuadrados parciales multidimensional (N-PLS) con RTL, empleándose dicho algoritmo en la determinación de procaína y su metabolito, ácido p-aminobenzoico, en muestras de suero humano, por medio del seguimiento de la hidrólisis de la procaína [14].

Dicho algoritmo fue posteriormente empleado en la determinación de ácido fólico (FA) y sus dos principales metabolitos, ácido tetrahidrofólico (THF) y ácido 5-metil tetrahidrofólico (5-MTF), en muestras de suero que fueron sometidas a degradación fotoquímica por medio de irradiación con una lámpara UV (Figura 2) [15].

Similarmente, la reacción de Hantzsch entre malonaldehído y metilamina, que da lugar a un compuesto altamente fluorescente, se utilizó para el desarrollo de un método de determinación de malonaldehído en aceite de oliva. En esta aplicación, y dada la naturaleza no lineal de la cinética, los datos se analizaron mediante una variante de PARAFAC para datos de tercer orden y un modelo de redes neuronales [16].

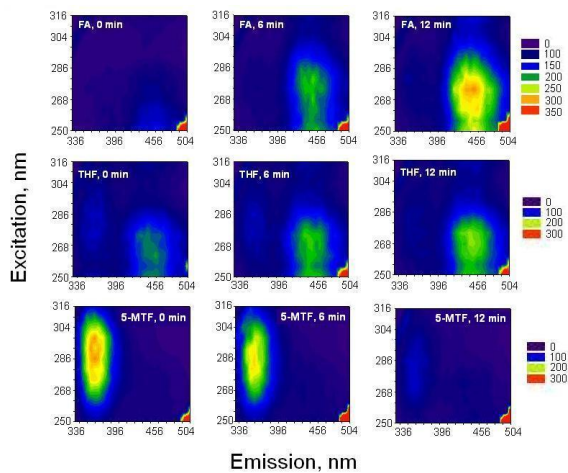


Fig. 2. Evolución de los gráficos de contornos de las matrices de excitación-emisión con el tiempo de irradiación UV, de disoluciones de FA, THF y 5-MTF. Reimpresa con permiso de la Referencia [15]. Copyright 2008 Elsevier.

EEMs- tiempo de retención (cromatografía de líquidos, LC)

En el campo de la calibración multivariante, la cromatografía de líquidos acoplada a detección fluorimétrica ha ido ganando un creciente interés, dado el alto potencial que se consigue al combinar una elevada resolución con una alta sensibilidad, permitiendo resolver sistemas extremadamente complejos. Sin embargo, el procedimiento analítico de obtención de datos de cuatro vías, desde el punto de visto quimiométrico, no es trivial. Hoy día, la instrumentación disponible nos permite obtener datos multivariantes a partir de experimentos de adquisición de matrices de excitación-emisión durante los registros cromatográficos, aunque el procedimiento tiene sus dificultades técnicas y se han propuesto diferentes estrategias experimentales para conseguirlo.

Nuestro grupo propuso un procedimiento de adquisición de datos de tercer orden, EEMs-LC, utilizando un cromatógrafo de líquidos convencional y un detector de fluorescencia de barrido rápido [17]. Para la adquisición de los datos de tercer orden se registraron distintos espectros de emisión a cada tiempo de elución, de manera que se generaron matrices de tiempo de elución-espectros de emisión (TEMs) en cada barrido cromatográfico. El tercer modo instrumental se obtuvo registrando varios TEMs a diferentes longitudes de onda de excitación. El procedimiento permitió la determinación de clorofilas a y b (Ch a, Ch b) y feofitinas a y b (Phe a, Phe b), en muestras de aceite de oliva, utilizando PARAFAC y U-PLS/RTL para el análisis de los datos obtenidos (Figura 3). Con objeto de mejorar los resultados, se propuso un nuevo procedimiento de análisis de los datos, mediante el algoritmo denominado PARAFAC aumentado (APARAFAC) [18]. El algoritmo se desarrolló para resolver datos de cuatro vías utilizando una estructura de datos de tres vías aumentada, que permite superar el

problema de la falta de trilinealidad por medio de la estructura aumentada de los datos, y presentando la ventaja adicional de obtener resultados físicamente interpretables.

La misma estrategia experimental fue utilizada para la determinación de pesticidas en muestras de frutas [19]. Posteriormente, siguiendo el pionero procedimiento descrito por Bro [20], propusimos un procedimiento alternativo de generación de datos de EEMs-LC, aplicándolo a la determinación de tres fluoroquinolonas en aguas [21]. Para ello, se utilizó un colector automático que permitía recoger fracciones cromatográficas en un lector de 96 placas. A continuación, la placa, con la correspondiente fracción, se introdujo en un espectrofluorímetro equipado con un lector de placas, lo que permitió la adquisición de las EEMs de cada una de las placas. Una vez que se registró la EEM, se construyó una matriz tridimensional que comprendía las EEMs obtenidas para cada fracción. Un punto importante a resaltar es el hecho de que cada EEM fue registrada individualmente en condiciones estáticas; de esta manera, el tiempo de elución, la longitud de onda de excitación y la longitud de onda de emisión, son mutuamente independientes, lo que garantiza la trilinealidad de la matriz de datos.

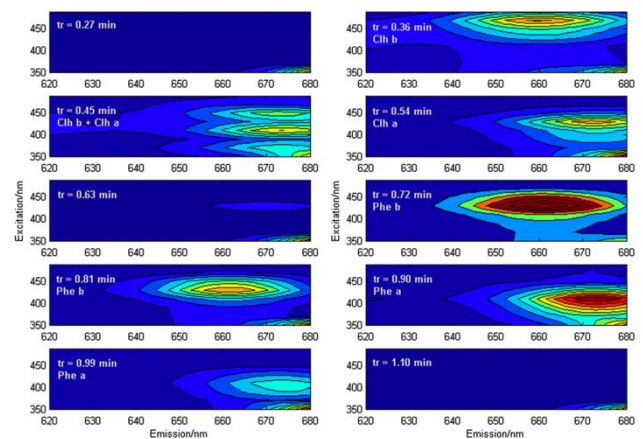


Fig. 3. Mapas de contorno de EEMs obtenidas para los diferentes tiempos de retención (tr), ilustrando la evolución cromatográfica de Chl a, Chl b, Phe a y Phe b de una muestra. El color rojo corresponde a señales más intensas y el azul a menos intensas. Los contornos corresponden a diez tiempos de retención diferentes, desde 0.27 a 1.1 minutos. Reimpresa con permiso de la Referencia [17]. Copyright 2013 Elsevier.

EEMs-otros tratamientos químicos

La combinación de EEMs con la variación del pH ha sido propuesta por el grupo de Wu y colaboradores, la mayor parte de las veces en conexión con el desarrollo de nuevos algoritmos para el análisis de matrices de datos de cuatro vías. Como ejemplos podemos citar dos recientes trabajos de este grupo, para la determinación de aminoácidos en plasma humano [22] y de tres ácidos fenólicos en muestras de cosméticos [23], en los que

discuten, defienden y demuestran, con datos experimentales, la existencia de la *ventaja de tercer orden*. Otros tratamientos químicos, tales como la adición de un atenuador de la fluorescencia (quencher) [24] o el uso de diferentes disolventes, han sido también descritos en la bibliografía [9].

Un ejemplo, empleando el uso de diferentes disolventes como cuarta vía, ha sido recientemente desarrollado y con un objetivo clasificatorio [25]. El estudio demuestra la capacidad de combinar EEMs, obtenidas en modo front-face, y en diferentes disolventes, con los algoritmos mencionados anteriormente, para realizar procesos de clasificación. Concretamente, en este estudio se establece la capacidad de clasificación de uvas procedentes de viñedos, tratados con diferentes prácticas agronómicas, que involucraban diferentes estados hídricos de las uvas. La descomposición de los datos fluorescentes de tres vías, realizada por análisis discriminante lineal (LDA)-PARAFAC y DA-UPLS, nos permitió la discriminación entre dos estados de maduración diferentes de las uvas. Además, hay que reseñar que, con el objetivo de mejorar la discriminación entre uvas con diferentes estados hídricos, se adicionó una dimensión extra (cuarta vía) que fue la extracción con dos disolventes diferentes. Los datos de la cuarta vía se obtuvieron por combinación de los extractos acuosos y en dietiléter y los resultados para la clasificación de estos datos pueden observarse en la Figura 4.

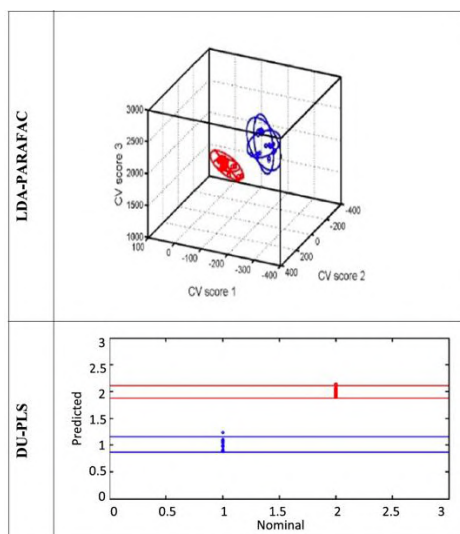


Fig. 4. Clasificación según el tratamiento de riego con datos de tercer orden. Arriba) Valores de scores obtenidos para LDA-PARAFAC de un conjunto de 48 muestras (no irrigadas, círculos rojos, e irrigadas, círculos azules). Se incluye las proyecciones tridimensionales de las elipses en los tres planos (intervalo de confianza del 95%), Abajo) Gráfico de valores predichos frente a los códigos nominales clasificatorios (1 y 2), obtenidos por DA-UPLS. Reimpresión con permiso de la Referencia [25]. Copyright 2019 Elsevier.

Aplicaciones con datos de cinco vías

Nuestro grupo propuso el primer método de utilización de datos de 5 vías. Para ello, se registraron varias EEMs siguiendo la cinética de la reacción de hidrólisis de carbaril a 1-naftol, a diferentes valores de pH. Los datos obtenidos se procesaron con U-PLS en combinación con un nuevo algoritmo, cuadrilinealización residual (RQL), que es la extensión de U-PLS/RTL a datos cuadrilineales (Figura 5) [26].

Conclusiones

A pesar de la complejidad experimental necesaria para obtener datos de cuatro y cinco vías, los avances descritos han permitido el desarrollo de métodos de determinación de compuestos de interés en los campos medioambiental, biológico y de análisis de alimentos, entre otros, en muestras complejas. Asimismo, aun cuando son numerosas las evidencias expuestas por distintos autores sobre las ventajas encontradas al utilizar estos métodos, se necesita profundizar en el desarrollo teórico para comprender las ventajas asociadas a los mismos, siendo recomendable una evaluación comprehensiva de los requerimientos experimentales necesarios, para proveer evidencias más fuertes acerca de las potencialidades de estos métodos.

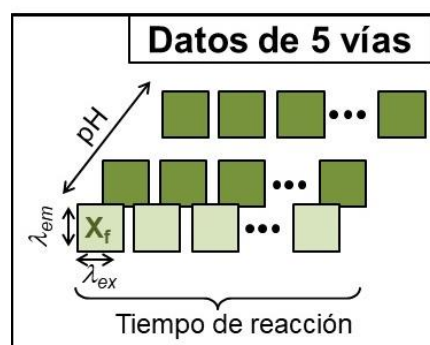


Fig. 5. Estrategia experimental de obtención de datos de cinco vías EEMs-Tiempo de reacción-pH.

Agradecimientos

Los autores agradecen financiación por parte de la Junta de Extremadura (Ayuda GR18041-Grupo de investigación ANAYCO-FQM003) y del Ministerio de Ciencia, Innovación y Universidades (Proyecto CTQ2017-82496-P).

Referencias

[1] G.M. Escandar, N.K.M. Faber, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, R.J. Poppi, Second- and third-order multivariate calibration: data, algorithms and applications, Trends Anal. Chem., 2007, 26, 752–765.
 [2] A.C. Olivieri, G.M. Escandar, A. Muñoz de la Peña, Second-order and higher-order multivariate calibration methods applied to non-multilinear data using different algorithms, Trends Anal. Chem., 2011, 30, 607–617.

- [3] G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Second- and higher-order data generation and calibration: A tutorial, *Anal. Chim. Acta.*, 2014, 806, 8–26.
- [4] A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, G.M. Escandar, H.C. Goicoechea, *Fundamentals and analytical applications of multiway calibration*, Elsevier, Amsterdam, 2015.
- [5] A.C. Olivieri, P.L. Pisano, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, *Data Analysis*, in: S. Fanali, P.R. Haddad, C.F. Poole, M.L. Riekkola (Eds.), *Liq. Chromatogr. Vol. 1. Fundam. Instrumentation.*, 2nd ed., Elsevier, Netherlands, 2017: pp. 515–528.
- [6] K.S. Booksh, B.R. Kowalski, *Theory of Analytical Chemistry*, *Anal. Chem.*, 1994, 66, 782A–791A.
- [7] A.C. Olivieri, Analytical advantages of multivariate data processing. One Two, Three, Infinity?, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 5713–5720.
- [8] X.H. Zhang, X.D. Qing, H.L. Wu, Discussion on the superiority of third-order advantage: analytical application for four-way data in complex system, *Microchemical Journal*, 2019, 145, 1078–1085.
- [9] M.R. Alcaraz, O. Monago-Maraña, H.C. Goicoechea, A. Muñoz de la Peña, Four- and five-way excitation-emission luminescence-based data acquisition and modelling for analytical applications. A review, *Anal. Chim. Acta*, 2019, 1083, 41–57.
- [10] A.C. Olivieri, J.A. Arancibia, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, Second-order advantage achieved with four-way fluorescence excitation-emission-kinetic data processed by parallel factor analysis and trilinear least-squares. Determination of methotrexate and leucovorin in human urine, *Anal. Chem.*, 2004, 76, 5657–5666.
- [11] J.A. Arancibia, A.C. Olivieri, D.B. Gil, A. Espinosa-Mansilla, I. Durán-Merás, A. Muñoz de la Peña, Trilinear least-squares and unfolded-PLS coupled to residual trilinearization: New chemometric tools for the analysis of four-way instrumental data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2006, 80, 77–86.
- [12] A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Jiménez Girón, Four-way calibration applied to the simultaneous determination of folic acid and methotrexate in urine samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 385, 1289–1297.
- [13] A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Jiménez Girón, H.C. Goicoechea, Evaluation of unfolded-partial least-squares coupled to residual trilinearization for four-way calibration of folic acid and methotrexate in human serum samples, *Talanta*, 2007, 72, 1261–1268.
- [14] P.C. Damiani, I. Durán-Merás, A. García-Reiriz, A. Jiménez-Girón, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Multiway partial least-squares coupled to residual trilinearization: A genuine multidimensional tool for the study of third-order data. Simultaneous analysis of procaine and its metabolite p-aminobenzoic acid in equine serum, *Anal. Chem.*, 2007, 79, 6949–6958.
- [15] A. Jiménez Girón, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, A. Muñoz de la Peña, F. Cañada Cañada, A.C. Olivieri, On line photochemically induced excitation-emission-kinetic four-way data. Analytical application for the determination of folic acid and its two main metabolites in serum by U-PLS and N-PLS/residual trilinearization (RTL) calibration, *Anal. Chim. Acta.*, 2008, 622, 94–103.
- [16] A. García-Reiriz, P.C. Damiani, A.C. Olivieri, F. Cañada-Cañada, A. Muñoz de la Peña, Nonlinear four-way kinetic excitation-emission fluorescence data processed by a variant of parallel factor analysis and by a neural network model achieving the second-order advantage: malonaldehyde determination in olive oil samples, *Anal. Chem.*, 2008, 80, 7248–7256.
- [17] V.A. Lozano, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, A. Espinosa-Mansilla, G.M. Escandar, Four-way multivariate calibration using ultra-fast high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation - emission detection. Application to the direct analysis of chlorophylls a and b and pheophytins a and b in olive oils, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2013, 125, 121–131.
- [18] S.A. Bortolato, V.A. Lozano, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Novel augmented parallel factor model for four-way calibration of high-performance liquid chromatography - fluorescence excitation - emission data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2015, 141, 1–11.
- [19] M. Montemurro, L. Pinto, G. Vêras, A. de Araújo Gomes, M.J. Culzoni, M.C. Ugulino de Araújo, H.C. Goicoechea, Highly sensitive quantitation of pesticides in fruit juice samples by modeling four-way data gathered with high-performance liquid chromatography with fluorescence excitation-emission detection, *Talanta*, 2016, 154, 208–218.
- [20] R. Bro, *Multi-way analysis in the food industry. Models, algorithms and applications.*, University of Amsterdam, Netherlands, 1998.
- [21] M.R. Alcaraz, G.G. Siano, M.J. Culzoni, A. Muñoz de la Peña, H.C. Goicoechea, Modeling four and three-way fast high-performance liquid chromatography with fluorescence detection data for quantitation of fluoroquinolones in water samples, *Anal. Chim. Acta*, 2014, 809, 37–46.
- [22] C. Kang, H.L. Wu, L.X. Xie, S.X. Xiang, R.Q. Yu, Direct quantitative analysis of aromatic amino acids in human plasma by four-way calibration using intrinsic fluorescence: Exploration of third-order advantages, *Talanta*, 2014, 122, 293–301.
- [23] X. Zhang, X. Qing, H. Wu, Discussion on the superiority of third-order advantage: Analytical application for four-way data in complex system, *Microchem. J.*, 2019, 145, 1078–1085.
- [24] L. Rubio, L. A. Sarabia, M. C. Ortiz, standard addition method based on four-way PARAFAC decomposition to solve the matrix interferences in the determination of carbamates pesticides in lettuce using excitation-emission fluorescence data, *Talanta*, 2015, 138, 86–89.
- [25] M. Cabrera-Bañegil, E. Valdés-Sánchez, A. Muñoz de la Peña, I. Durán-Merás, Combination of fluorescence excitation emission matrices in polar and non-polar solvents to obtain three- and four-way arrays for classification of Tempranillo grapes according to maturation stage and hydric status, *Talanta*, 2019, 199, 652–661.
- [26] R.M. Maggio, A. Muñoz de la Peña, A.C. Olivieri, Unfolded partial least-squares with residual quadrilinearization: A new multivariate algorithm for processing five-way data achieving the second-order advantage. Application to fourth-order excitation-emission-kinetic-pH fluorescence analytical data, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 2011, 109, 178–185.