

2

ELECTROFORESIS CAPILAR

2.1.INTRODUCCIÓN

El término electroforesis se emplea para describir la migración de partículas cargadas bajo la acción de un campo eléctrico. La electroforesis constituye una técnica de separación basada en la diferente velocidad (y, por tanto, en la movilidad) de diferentes solutos al ser sometidos a la acción de un campo eléctrico. Fue introducida por Tiselius en 1937 con la finalidad de separar proteínas, cuando observó que situando una mezcla de proteínas en el interior de un tubo lleno de una solución tampón y aplicando un campo eléctrico, cada proteína migraba de forma distinta. Su trabajo abrió un campo de investigación que ha sido ampliado por muchos otros científicos a lo largo del siglo XX.

Tradicionalmente, esta técnica ha sido aplicada en geles de poliacrilamida o agarosa, medios anticonvectivos que mejoran la eficiencia de la separación, en formato de placa o de tubo. Al introducir una pequeña cantidad de muestra en el sistema electroforético, al aplicar un campo eléctrico cada soluto migra en zonas discretas en función de su movilidad. A pesar de ser una de las técnicas de separación más ampliamente utilizadas, presenta como problemas la dificultad en la detección y la automatización, tiempos largos de análisis y bajas eficiencias. Estos dos últimos problemas son causados por la limitación que supone la aplicación de altos voltajes. La técnica ha ido evolucionando a lo largo de los años, hasta que a partir de los años 60 se comienza a desarrollar la técnica de electroforesis en columnas capilares de sílice fundida naciendo así la electroforesis capilar (CE, *Capillary Electrophoresis*). Al principio sólo eran accesibles capilares de diámetro interno 1 mm hasta que hacia 1980 se introducen capilares de 75 μ m de diámetro interno¹. El uso de estos capilares conlleva múltiples ventajas respecto a la electroforesis clásica²:

- Los capilares son anticonvectivos en sí mismos y, por tanto, no es necesaria la utilización de un gel soporte como medio.
- El calor generado al pasar la corriente eléctrica (efecto Joule), que daría lugar a problemas de gradientes de temperatura no uniformes, cambios locales de viscosidad o deformación del pico (señal) del analito, es reducido de forma muy eficaz, ya que la disipación de calor en los capilares es muy efectiva.
- En consecuencia, pueden aplicarse altos voltajes y, por tanto, se consigue una reducción del tiempo de análisis y altas eficiencias.
- Se tiene la posibilidad de realizar la detección en columna, lo que permite la automatización de la técnica.

En la actualidad, la electroforesis capilar es una técnica ampliamente utilizada. Su gran versatilidad, rapidez, alta capacidad de resolución y eficiencia han promovido su uso para separaciones en diversos campos. En la tabla 2.1 se muestran algunas de las aplicaciones y tendencias de los trabajos actuales de CE.

Tabla 2.1. Aplicaciones de CE.

Campo de aplicación	Aplicaciones
Farmacéutico	-Determinaciones de principios activos ^{3, 4, 5} -Métodos CE validados para control de calidad ^{6, 7} -Separaciones quirales ^{8, 9}
Clínico	-Análisis de metabolitos en fluidos biológicos ^{10, 11} -Sustancias prohibidas en fluidos biológicos ^{12, 13} -Análisis forense ^{14, 15}
Bioquímico	-Separaciones de proteínas ¹⁶ -Separación de ácidos nucleicos ¹⁷ -Secuenciación de ADN ^{18, 19}
Alimentario	-Análisis de conservantes ²⁰ -Análisis de edulcorantes ²¹ -Análisis de colorantes ²²
Ambiental	-Control de calidad de aguas depuradas ²³ -Determinación de ácidos húmicos y fúlvicos en extractos de suelos ²⁴ -Separaciones quirales de PCBs y fenoxiácidos en herbicidas ²⁵ -Separación de iones metálicos ²⁶

2.2.FUNDAMENTOS TEÓRICOS

La velocidad de un ión sometido a la acción de un campo eléctrico viene dada por la expresión:

$$v = \hat{\mu}_{ep} E \quad (2.1)$$

donde $\hat{\mu}_{ep}$ es la movilidad electroforética del ión, y E el campo eléctrico aplicado. $\hat{\mu}_{ep}$ depende a su vez de la carga del ión (q), de su radio (r) y de la viscosidad de la solución (η), según la expresión:

$$\hat{\mu}_{ep} = \frac{q}{6 \zeta r} \quad (2.2)$$

La velocidad con la que viaja un determinado ión es mayor cuanto mayor es su carga y menor su radio. Si la sustancia está presente en solución en diferentes formas en equilibrio dinámico (por ejemplo, debido a un equilibrio ácido-base), la migración se da como la de una sustancia uniforme de movilidad $\hat{\mu}_{ep}$:

$$\hat{\mu}_{ep} = \sum_{i=0}^n \hat{\mu}_i \quad (2.3)$$

donde $\hat{\mu}_i$ son las fracciones molares de las diferentes formas y $\hat{\mu}_i$ sus correspondientes movilidades iónicas.

Un fenómeno muy importante que tiene lugar en CE, debido a las características del capilar, es la electroósmosis. El flujo electroosmótico (EOF, *Electro-Osmotic Flow*) es el flujo de líquido en el interior del capilar originado por la carga eléctrica negativa existente en la pared interna del capilar. En el caso de capilares de sílice fundida, esta superficie de carga es generada principalmente por ionización de los grupos silanol, a partir de pH 2, según el equilibrio ácido-base:



La carga en la superficie interna del capilar atrae hacia sí iones positivos creando lo que se denomina doble capa electroquímica (DCE) representada en la figura 2.1. Está formada por dos sub-capas: capa adyacente fija por adsorción (capa de Stern), y una capa difusa y móvil (capa de Gouy-Chapman). Los iones de la capa difusa experimentan una fuerza paralela a la superficie y migran hacia el cátodo al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar. Estos iones, al estar solvatados, generan un movimiento global del fluido hacia el cátodo. Este movimiento del fluido constituye el EOF.

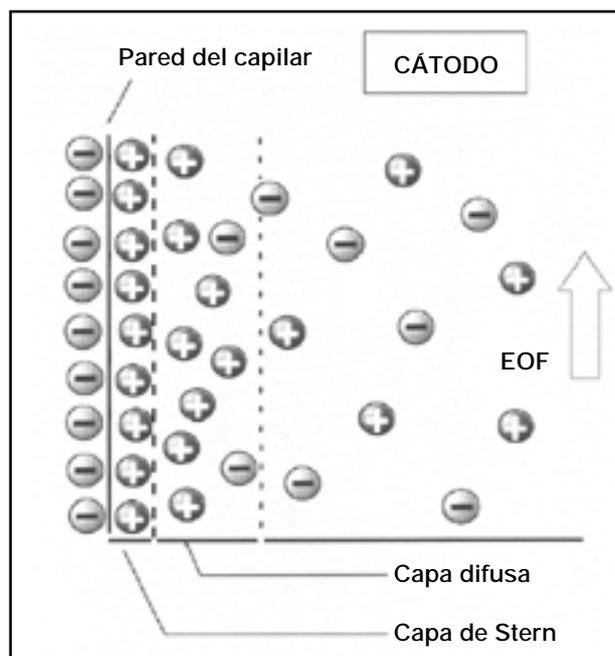


Figura 2.1. Esquema de la generación del EOF.

La movilidad electroosmótica (μ_{eo}) viene dada por la siguiente expresión:

$$\mu_{eo} = \frac{\epsilon \zeta}{4 \eta} \quad (2.4)$$

donde η y ϵ son la viscosidad y la constante dieléctrica de la solución, respectivamente, y ζ el llamado potencial zeta. El potencial zeta es el potencial existente en el plano de separación de ambas capas, y depende esencialmente de la naturaleza y cantidad de iones en la superficie interna del capilar. La velocidad del EOF (v_{eo}) viene dada por:

$$v_{eo} = \mu_{eo} E \quad (2.5)$$

El perfil del EOF es plano como consecuencia de que la doble capa es muy delgada y la fuerza conductora está uniformemente distribuida a lo largo de todo el capilar. Gracias a esto el ensanchamiento de banda debido a la resistencia a la transferencia de masa, y los efectos de calentamiento son mínimos, lo que permite obtener altas resoluciones en la separación. En los sistemas conducidos por presión (HPLC, por ejemplo) el perfil del flujo es parabólico, dando lugar a picos más anchos²⁷, como se aprecia en la figura 2.2.

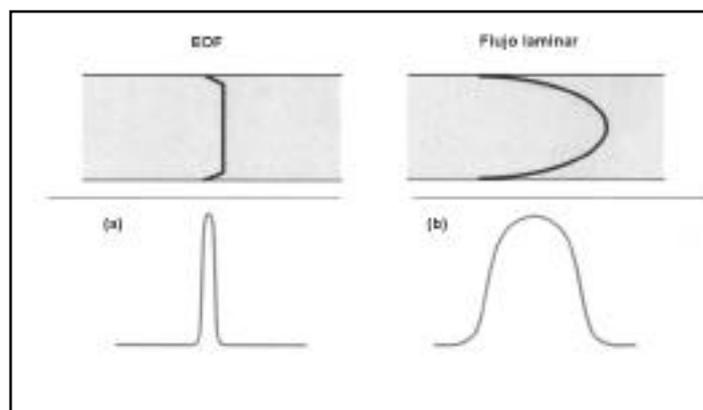


Figura 2.2. Perfil del flujo en CE (a) y en HPLC (b).

En el caso de que exista EOF se modifica la velocidad total con la que los iones se mueven a través del capilar de la forma:

$$v = (\hat{i}_{ep} + \hat{i}_{eo})E \quad (2.6)$$

Si el EOF es mayor que las movilidades electroforéticas de los iones de la muestra, los aniones, los cationes y las moléculas neutras contenidas en una muestra pueden ser separados en una misma inyección. Todos ellos se mueven hacia el cátodo, si la carga de la pared del capilar es negativa. Los cationes son atraídos electroforéticamente hacia el cátodo y a esta velocidad se le suma la del EOF, en el mismo sentido. Todas las moléculas neutras migran a la velocidad del EOF y, por último, los aniones migran con una velocidad igual a la diferencia entre la velocidad del EOF y sus velocidades electroforéticas hacia el ánodo. La diferencia de los tiempos de migración dentro del grupo de los cationes o dentro del de los aniones viene dada por la diferencia en sus movilidades electroforéticas. El esquema de movimiento de las diversas moléculas se presenta en la figura 2.3.

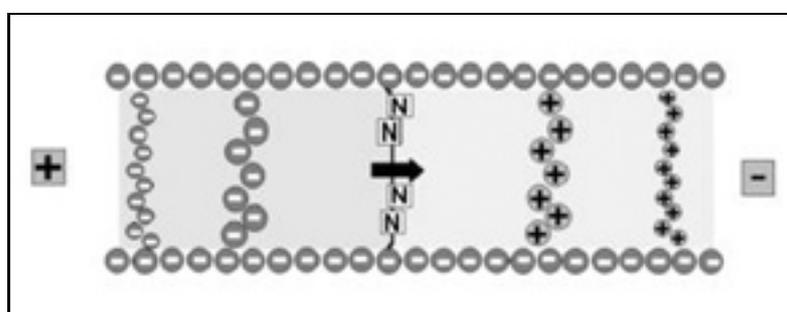


Figura 2. 3. Migración diferencial de las moléculas según carga/radio.

El EOF puede ser favorable para el análisis en algunos casos mientras que en otros puede resultar perjudicial. Existen algunos modos de aplicación de CE en los que resulta indeseable la existencia de EOF (electroforesis capilar en gel, isotacoforesis capilar, enfoque isoeléctrico capilar). El control del EOF es por tanto muy importante para lograr una separación adecuada de los compuestos contenidos en una muestra problema. Para modificar el EOF de una forma controlada, se requiere básicamente una alteración de la carga de superficial de las paredes del capilar o de la viscosidad del medio²⁷. En la tabla 2.2 se recogen diversos métodos de modificación controlada del EOF.

Tabla 2.2. Métodos de modificación controlada de la magnitud del EOF.

VARIABLE	RESULTADO	OBSERVACIONES
Campo eléctrico (E)	Cambios proporcionales en el EOF	Al aumentar E aumenta también el efecto Joule.
pH del tampón	Si el pH \uparrow el EOF \downarrow	Método más adecuado para variar el EOF.
Fuerza iónica o concentración del tampón	Un aumento de cualquiera de los dos disminuye el potencial zeta	Puede provocar aumento del efecto Joule. Fuerza iónicas bajas pueden provocar adsorción de la muestra.
Temperatura	Aumentarla disminuye la viscosidad (2-3 %/°C) y aumenta EOF	Facilidad de control debido a la automatización y termostatación.
Adición de modificadores orgánicos	Modifican el potencial zeta y la viscosidad	Generalmente disminuyen el EOF y pueden alterar la selectividad

2.3. ASPECTOS INSTRUMENTALES

2.3.1. Esquema de un instrumento de CE

Un esquema básico de los instrumentos utilizados en CE se muestra en la figura 2.4. La instrumentación básica es muy simple, constando de una fuente de voltaje, un capilar, recipientes de muestra y tampón, y un detector. Ésta puede ser mejorada gracias a la automatización, control de temperatura en muestras y capilar, muestreador automático, *software* para el tratamiento de datos, etc. Siguiendo el esquema de la figura 2.4 se puede

observar como el capilar está en contacto con los viales de entrada y salida, los cuales a su vez contienen los electrodos entre los que se aplica la diferencia de potencial. El capilar está lleno con la misma solución contenida en los viales de entrada y salida. A esta solución se le llama electrolito de fondo (BGE, de *background electrolyte*) y constituye el medio de conducción de la corriente eléctrica. El BGE suele ser un tampón adecuado a las necesidades del tipo de muestra a analizar. La muestra es inyectada en el interior del capilar reemplazando el vial de entrada por el vial de muestras y posteriormente el vial de entrada vuelve a colocarse para aplicar la diferencia de potencial. La separación tiene lugar a lo largo del tiempo y los distintos analitos son habitualmente detectados de forma directa a través de la pared del capilar.

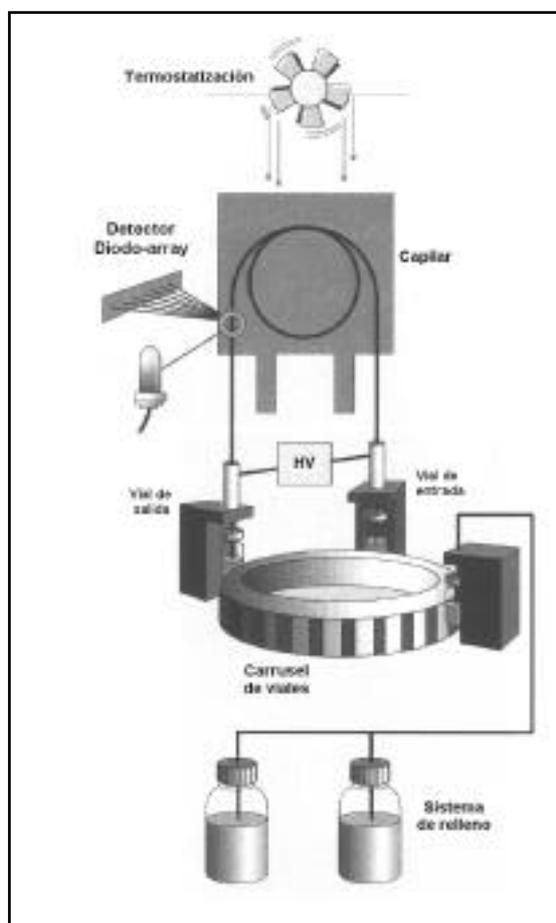


Figura 2.4. Esquema de un instrumento de CE.

A continuación se describen más detalladamente aspectos instrumentales en CE como son inyección, capilares, termostatación y detección.

2.3.2. Inyección

Las cantidades de muestra inyectadas en CE son muy pequeñas (del orden de los nanolitros), con el fin de mantener una alta eficiencia en la separación. Las pequeñas cantidades inyectadas, al igual que el poco volumen de tampón consumido, son una ventaja de la técnica cuando se dispone de poca muestra o se está utilizando un tampón caro. A la vez, resulta un inconveniente en cuanto al aspecto de la sensibilidad. Una sobrecarga de muestra causa el ensanchamiento de banda y, por tanto, pérdida de eficiencia y resolución, al mismo tiempo que una distorsión en la forma del pico. Por tal motivo, es necesario que la longitud de la zona inyectada de muestra sea menor que la dispersión causada por difusión. Debido a los pequeños volúmenes utilizados es preciso disponer de sistemas de inyección extremadamente precisos, ya que pequeñas variaciones pueden provocar grandes errores.

2.3.2.1. Inyección hidrodinámica

Es el modo de inyección más extensamente utilizado. La inyección hidrodinámica de la muestra se puede realizar de tres formas: por aplicación de una presión en el extremo de inyección del capilar, haciendo el vacío en el extremo contrario, o por efecto sifón, al elevar el vial de muestra respecto al vial de tampón situado en el extremo contrario al de inyección (Figura 2.5). En este tipo de inyección, la cantidad de muestra inyectada es prácticamente independiente de la naturaleza de la muestra, por lo que se consigue una gran reproducibilidad de inyección.

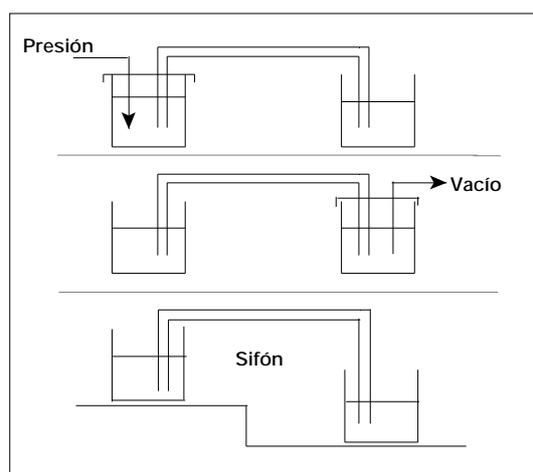


Figura 2.5. Formas de inyección hidrodinámica.

Es indicado utilizar tiempos de inyección lo más cortos posibles ya que de lo contrario aumenta la dispersión debido a la mayor longitud de la zona de muestra. No obstante, la reproducibilidad a tiempos demasiado cortos disminuye debido a limitaciones instrumentales. Es necesario por tanto llegar a una solución de compromiso que permita obtener las mejores condiciones operacionales.

2.3.2.2. Inyección electrocinética

En este modo de inyección el vial de muestra reemplaza al vial de tampón en el extremo de inyección del capilar y a continuación se aplica una diferencia de potencial entre los extremos del capilar, que suele ser de 3 a 5 veces inferior al utilizado en la separación, durante un tiempo determinado. Los diferentes solutos se introducen en el capilar por el efecto conjunto de su migración electroforética y del EOF, por lo que cada analito será inyectado en distinta cantidad²⁸: los más móviles entran en mayor proporción. Pequeñas variaciones en la conductividad de la muestra, producidas por diferentes concentraciones de iones, pueden alterar la cantidad de muestra inyectada. Si dos muestras tienen la misma concentración de un ión determinado pero presentan conductividades diferentes, la cantidad de ese ión inyectada será diferente para cada muestra. Debido a este fenómeno, este método de inyección no suele ser el habitual, aunque resulta muy útil cuando los capilares utilizados están rellenos de geles o de un medio demasiado viscoso para que la inyección hidrodinámica resulte efectiva.

2.3.2.3. Concentración de muestra en el capilar

Son técnicas denominadas de *stacking*, utilizadas para aumentar la sensibilidad de la detección por concentración en el capilar²⁷. Consiste en preparar las muestras en tampón diluido e inyectarlas en modalidad electrocinética. La intensidad de corriente es constante a través del capilar, por lo que, debido a la diferencia de conductividad entre muestra y tampón, se produce un aumento local del campo eléctrico en la zona de muestra, lo cual hace que los iones migren más rápidamente hasta la frontera de la zona de muestra, donde migran más lentamente. Este proceso continúa hasta que todos los iones de la muestra alcanzan la frontera generándose así una franja muy estrecha de cada analito. Las conductividades de muestra y tampón no deben ser muy diferentes, ya que esto provocaría efectos de ensanchamiento de bandas y deformación de picos.

2.3.3. Capilares

Los capilares utilizados deben ser química y eléctricamente inertes, transparentes al UV-VIS, ya que facilitarán la detección on-line, flexibles y robustos y de precio económico. Los capilares de sílice fundida son los que mejor cumplen estas condiciones, y por ello son los más ampliamente utilizados. Para aumentar su flexibilidad y resistencia son recubiertos de una capa externa de poliimida. Para hacer viable la detección on-line se elimina una pequeña sección del recubrimiento de poliimida. La sección de los capilares suele ser cilíndrica y sus dimensiones oscilan entre 50 y 100 cm de longitud y entre 10 y 200 μ m de diámetro interno. En algunos casos los capilares se derivatizan, funcionalizando las paredes internas con polímeros para suprimir el EOF o para evitar la adsorción de sustancias cargadas en la superficie del capilar.

Aunque la sílice es el material más utilizado también se pueden utilizar otros materiales como el pyrex y el teflón. El pyrex permite generar EOF puesto que sus paredes tienen grupos silanol. El teflón en cambio, es capaz de generar EOF adsorbiendo grupos OH⁻ del medio.

2.3.4. Termostatación

El control efectivo de la temperatura es fundamental en CE ²⁹. Su objetivo es aislar el capilar de los cambios de temperatura ambiente, eliminar el calor generado por efecto Joule en su interior y fijar la temperatura de trabajo con gran precisión. Teniendo en cuenta que la movilidad varía entre un 2-3% / °C ³⁰ y que el calor por efecto Joule conduce a ensanchamiento de picos, termostatar el capilar permite obtener resultados reproducibles y una alta resolución.

La termostatación se puede llevar a cabo mediante un flujo de aire o mediante una camisa de líquido que envuelva el capilar. Esta última es teóricamente más eficaz, ya que en general los líquidos poseen una capacidad calorífica (Cp) superior a la de los gases, con lo que mantienen la temperatura de forma más eficaz. No obstante, creando un flujo de aire a una velocidad suficiente (10 m/s) se consiguen resultados comparables por ambos métodos²⁷.

2.3.5. Fuente de voltaje

Las fuentes de voltaje deben ser capaces de generar diferencias de potencial de 10 a 30 KV de una forma estable para conseguir una alta reproducibilidad en los tiempos de migración. Generalmente se trabaja en condiciones de polaridad positiva: la muestra se inyecta en el ánodo (+) y se detecta en el cátodo (-). No obstante, puede resultar útil invertir

la polaridad de los electrodos y trabajar con polaridad inversa o negativa. Las fuentes de voltaje utilizadas deben ser capaces de realizar esta inversión de polaridad , permitiendo así disponer de más recursos para optimizar la separación.

2.3.6. Detección

La detección es una de las limitaciones de la técnica de CE, ya que, debido al tamaño de los capilares, así como a la pequeña cantidad de muestra inyectada, se requiere el uso de detectores muy sensibles y la detección de los analitos en columna. Las dimensiones del capilar limitan el camino óptico disponible y, por tanto, la sensibilidad. El aumento del diámetro del capilar daría lugar a un incremento del calor generado por efecto Joule, ya que éste es proporcional al cuadrado del diámetro. Para no perder las altas eficiencias conseguidas por la técnica, es necesario que la región de detección sea muy pequeña, ya que si no es así, podría darse en ella una mezcla de las zonas que previamente habían sido separadas en el capilar; es decir, la región de detección ha de ser pequeña en comparación con la zona de soluto para mantener una alta resolución. En consecuencia, para aumentar la sensibilidad y mantener una alta resolución, deben usarse detectores muy sensibles y realizar la detección en columna, con lo cual se elimina el ensanchamiento de pico causado por juntas, conectores, etc. Resulta sencillo adaptar las técnicas de UV-visible y fluorescencia para realizar la detección en columna, ya que, eliminando una pequeña sección del recubrimiento de poliimida del capilar se crea una ventana de detección. Son varias las técnicas de detección utilizadas en CE, la mayoría de las cuales han sido adaptadas a partir de las utilizadas en HPLC. En la tabla 2.3 se muestran algunas de las técnicas de detección utilizadas en CE, incluyendo comentarios sobre sus características ²⁸. De todas ellas se comentará en más detalle la detección en el UV-visible, utilizada en los trabajos de CE recogidos en esta memoria.

Tabla 2.3. Técnicas de detección en CE.

Técnica	Comentarios
UV-VIS	<ul style="list-style-type: none"> - Universal - Disponible comercialmente - Amplia información espectral con detector de diodos en línea.
Fluorescencia	<ul style="list-style-type: none"> - Disponible en algunos instrumentos comerciales - Muy sensible - Se requiere fluoróforo o derivatización pre o post columna
Fluorescencia inducida por láser	<ul style="list-style-type: none"> - Muy sensible - Longitudes de onda disponibles limitadas - Precio elevado
Potenciometría	<ul style="list-style-type: none"> - Se requiere un electrodo selectivo de iones - Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje de CE - Sensible siempre que no haya iones interferentes
Conductividad	<ul style="list-style-type: none"> - Universal - Bajo coste pero poca sensibilidad - Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje de CE
Amperometría	<ul style="list-style-type: none"> - Altamente sensible, pero sólo utilizable con analitos electroactivos - Altamente específico - Necesario aislar el detector de la fuente de voltaje de CE
Espectroscopia de masas	<ul style="list-style-type: none"> - Precio muy elevado - Interfase entre CE y MS complicada - Sensible y con información estructural
Detección indirecta por UV, fluorescencia y amperometría	<ul style="list-style-type: none"> - Universal - Instrumentación similar a la utilizada en detección directa - Menos sensible que la detección directa
Detección isotópica Otras técnicas basadas en láser (índice de refracción, absorbancia termoóptica, dicroísmo circular, Raman)	

2.3.6.1. Detección UV-visible

Es el método de detección más extensamente utilizado, debido a su naturaleza casi universal y a su amplia disponibilidad y uso en HPLC, técnica de la que ha sido adaptado. La detección se realiza en columna, por eliminación de parte del recubrimiento de poliimida del capilar y situando el capilar entre la salida del monocromador y el fotomultiplicador. La dependencia de la absorbancia con el camino óptico, según la ley de Lambert-Beer, hace que la sensibilidad esté limitada como consecuencia de las pequeñas dimensiones del capilar, y, por consiguiente, del pequeño camino óptico que ofrece. Esto hace que el detector tenga que ser cuidadosamente diseñado para enfocar la máxima luz en el capilar y para minimizar la luz dispersa que llega al monocromador, que a la vez limita también el rango lineal.

Existen algunos métodos que permiten mejorar la sensibilidad mediante el aumento del camino óptico sin que ello repercuta en la resolución. Éstos son el uso de capilares con camino óptico extendido en el punto de detección (o de burbuja) en los cuales se aumenta el camino óptico de 3 a 5 veces³¹, o la utilización de una celda de flujo en forma de Z o de una celda de multirreflexión, en la que la luz procedente del monocromador atraviesa varias veces el capilar³².

La utilización de un detector de diodos en línea (DAD) implica muchas ventajas con respecto a la detección por única o múltiple longitud de onda. La luz procedente de la lámpara de deuterio es enfocada en el capilar a través de un sistema de lentes y tras pasar por el capilar es difractada hacia un detector de diodos en línea, cada uno de los cuales mide un cierto intervalo de longitudes de onda. Esto supone que se puede visualizar el espectro completo UV-VIS en cualquier momento del análisis, la obtención del electroferograma a cualquier longitud de onda en una sola inyección, la posibilidad de determinar los máximos de absorción para todos los analitos, la identificación de compuestos y la determinación de la pureza de pico³³.

2.4. MODOS DE APLICACIÓN EN CE

La gran versatilidad de la técnica de CE reside, en gran medida, en los numerosos modos de aplicación, cada uno de ellos con unas características y mecanismos de separación particulares. En CE se pueden emplear los siguientes modos de aplicación: electroforesis capilar de zona (CZE), cromatografía electrocinética micelar (MEKC), electroforesis capilar en gel (CGE), electrocromatografía capilar (CEC), enfoque isoelectrico capilar (CIEF) e isotacoforesis capilar (CITP). En la tabla 2.4 se muestran recogidas las características y mecanismos de separación de los distintos modos de aplicación en electroforesis capilar.

Tabla 2.4. Características y mecanismo de separación de los distintos modos de CE.

Modo	Características / aplicaciones	Mecanismo
Electroforesis capilar de zona (CZE)	-Capilar lleno de electrolito de fondo, aplicación de campo eléctrico -Aplicaciones: aminoácidos, péptidos, proteínas, drogas, metabolitos, contaminantes, iones inorgánicos, ácidos orgánicos, compuestos quirales, fragmentos de DNA, oligosacáridos...	Separación de analitos según su movilidad en solución
Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)	-Capilar lleno de electrolito de fondo que contiene un tensioactivo -Aplicaciones: aminoácidos, vitaminas, fármacos e hidrocarburos aromáticos	Interacciones hidrofóbicas / iónicas de analitos con las micelas
Electroforesis capilar en gel (CGE)	-Capilar relleno con gel que funciona como tamiz molecular -Aplicaciones: macromoléculas, ácidos nucleicos y proteínas	Diferencia de tamaños y cargas
Electrocromatografía capilar (CEC)	-Capilar funcionalizado con fase estacionaria -Aplicaciones: contaminantes, pesticidas, herbicidas, esteroides, diuréticos...	Interacciones diferenciales de un soluto en dos fases.
Enfoque isoeléctrico capilar (CIEF)	-Capilar lleno de electrolitos, cada uno capaz de tamponar a un pH diferente. Extremos del capilar sumergidos en dos soluciones: una ácida y otra básica. Se genera gradiente de pHs en el capilar. -Aplicaciones : sustancias anfotéricas como péptidos, proteínas y aminoácidos.	Punto isoeléctrico de los analitos: migran hasta alcanzar el pH donde son neutros.
Isotacoforesis capilar (CITP)	-Sistema discontinuo de tampón: tampones con distinta movilidad. Separación en zonas consecutivas: escalones, no picos. -Aplicaciones: iones metálicos, aniones orgánicos e inorgánicos	Separación en el interior de zona delimitada por los dos tampones.

Cada uno de los modos de aplicación de electroforesis capilar es adecuado para separar un tipo de sustancias. Las sustancias estudiadas en los dos trabajos realizados por electroforesis consisten en moléculas orgánicas relativamente pequeñas por lo que en principio, la electroforesis capilar de zona (CZE) es el modo más adecuado. Una de las sustancias que se estudia se presenta en 6 posibles formas isoméricas que a pH neutro se encuentran en forma neutra. Por ello se ha probado la cromatografía electrocinética micelar como modo electroforético utilizando como mecanismo de separación la interacción de las moléculas neutras con la fase pseudoestacionaria. Por haber sido utilizados para los trabajos de esta memoria, se explican con más detalle los modos de CZE y MEKC.

2.4.1. Electroforesis capilar de zona (CZE)

Es la técnica más corrientemente utilizada en CE debido a su simplicidad y su versatilidad. Como ya se ha explicado anteriormente, el capilar se llena con un electrolito de fondo (BGE) ajustado a un determinado pH¹ y al cual se ha podido añadir algún aditivo que permita aumentar la selectividad, reducir el EOF, mejorar la resolución, etc. Al aplicar una diferencia de potencial entre los extremos del capilar los analitos migran en zonas discretas en función de sus diferentes movilidades electroforéticas (ver figura 2.3). La elección del BGE es muy importante, pues de él depende en gran medida el comportamiento electroforético de los solutos. El tampón utilizado ha de presentar una baja absorbancia a la longitud de onda de detección (excepto en los casos de detección indirecta), tener una buena capacidad tamponadora al pH elegido y buena capacidad de disipación del calor generado.²⁷ Además, los analitos han de ser solubles y químicamente estables en él.

2.4.2. Cromatografía electrocinética micelar (MEKC)

El mecanismo de separación en MEKC se basa en la distribución de los solutos en dos fases: la solución tampón y una fase micelar. Un surfactante es añadido al tampón en una concentración superior a la concentración micelar crítica, por lo que se forman micelas. Estas micelas, de forma esférica, tienen la parte hidrofílica de las moléculas de surfactante orientadas hacia la solución de tampón, mientras que la parte hidrofóbica está orientada hacia el interior. Los surfactantes más utilizados en MEKC son los aniónicos (dodecilsulfato sódico). En este caso, las moléculas neutras interaccionan con la micela en diferente grado en función de su hidrofobicidad, dando lugar a la separación (figura 2.6).

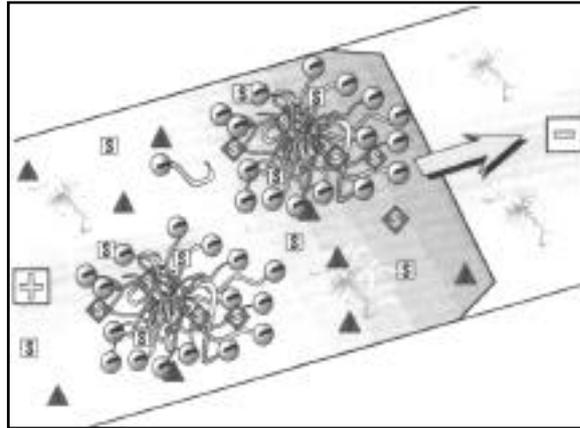


Figura 2.6. Esquema de separación MEKC.

La micela actúa, de este modo, como fase pseudoestacionaria, ya que realiza una función similar a la de una fase estacionaria cromatográfica. A pesar de su carga negativa, la micela o el conjunto micela-analito neutro migran hacia el cátodo arrastrados por el EOF. Si los solutos no son neutros, hay que tener en cuenta otros efectos: relación carga/masa, hidrofobicidad e interacción de carga. También han sido empleados surfactantes catiónicos (DTAB), no iónicos (Tritón X-100), zwitteriónicos (CHAPS) o sales biliares (ácido taurocólico).

El uso de otros aditivos (metanol, ciclodextrinas, iones metálicos, etc.), además de las micelas, permite obtener mejoras en la selectividad y la resolución.

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, 1981, **53**, 1298.
- ² M. L. Marina y M. Torre, *Talanta*, 1994, **41**, 1411.
- ³ H. Nishi, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 3237.
- ⁴ R. Gotti, R. Pomponio, V. Andrisano and V. Cavrini, *J. Chromatogr. A*, 1999, **844**, 361.
- ⁵ A. Haque, X. H. Xu and J. T. Stewart, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1999, **21**, 1063.
- ⁶ H. Fabre and K. D. Altria, *LC-GC Europe*, 2001, **5**, 302.
- ⁷ H. Wätzig, M. Degenhardt and A. Kunkel, *Electrophoresis*, 1998, **19**, 2695.
- ⁸ B. Chankvetadze, *Trends. Anal. Chem.* 1999, **18**, 485.
- ⁹ S. Fanalli, *J. Chromatogr. A*, 2000, **875**, 89.
- ¹⁰ S. Zaugg and W. Thormann, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2001, **24**, 785.
- ¹¹ A. Ivanov, I. V. Nazimov and L. A. Baratova, *J. Chromatogr. A*, 2000, **895**, 167.
- ¹² A. Ramseier, C. Siethoff, J. Caslavská and W. Thormann, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 380.
- ¹³ F. Tagliaro, R. Valentini, G. Manetto, F. Crivellente, G. Carli, and M. Marigo, *Forensic Science International*, 2000, **107**, 121.
- ¹⁴ G. Manetto, F. Crivellente and F. Tagliaro, *Therapeutic Drug Monitoring*, 2000, **22**, 84.
- ¹⁵ W. Thormann, A. B. Wey, I. S. Lurie, H. Gerber, C. Byland, N. Malik, M. Hochmeister, C. Gehrig, *Electrophoresis*, 1999, **20**, 3203.
- ¹⁶ P. G. Righetti, C. Gelfi, A. Bossi, E. Olivieri, L. Castelletti, B. Verzola and A. V. Stoyanov, *Electrophoresis*, 2000, **21**, 4046.
- ¹⁷ J. L. Zabzdyr, and S. J. Lillard, *J. Chromatogr. A*, 2001, **911**, 269.
- ¹⁸ H. H. Zhou, A. W. Miller, Z. Sosic, B. Buchholz, A. E. Barron, L. Kotler and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, 2000, **72**, 1045.
- ¹⁹ I. Kheterpal and R. A. Mathies, *Anal. Chem.*, 1999, **71**, 31A.
- ²⁰ K. L. Kuo and Y. Z. Hsieh, *J. Chromatogr. A*, 1997, **768**, 334.
- ²¹ R. Schuster and A. Gratzfeld-Huesgen, *Hewlett-Packard Appl. Notes*, 1994, 12-5963-1122E.
- ²² H. W. Liu, T. Zhu, Y. N. Zhang, S. Z. Qi, A. J. Huang, and Y. Sun, *J. Chromatogr. A*, 1995, **718**, 448.
- ²³ J. Farré, F. Borrull and M. Calull, *Chromatographia*, 1997, **44**.
- ²⁴ D. H. Craston and M. Saeed, *J. Chromatogr. A*, 1998, **827**, 1.
- ²⁵ M. L. Marina and A. L. Crego, *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 1997, **20**, 1337.
- ²⁶ D. Kaniansky, M. Masar, J. Marak and R. Bodor, *J. Chromatogr. A*, 1999, **834**, 133.

-
- ²⁷ D. N. Heiger, *High Performance Capillary Electrophoresis- An Introduction*, Hewlett-Packard, Waldbronn, Alemania, 1992.
- ²⁸ S. F. Y. Li, *Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Publishers B. V. , Amsterdam, 1992.
- ²⁹ *Capillary Thermostating in Capillary Electrophoresis*, Hewlett-Packard Product Note, Publication Number 12-5963-3975E, 1994.
- ³⁰ J. R. Veraart, H. Lingeman and C. Gooijer, *Biomed. Chromatogr.*, 1995, **9**, 271.
- ³¹ *Diode-array Detection in Capillary Electrophoresis using HP Extended Light Path Capillaries*, Hewlett-Packard Product Note, Publication Number 12-5963-1889E, 1994.
- ³² *High Sensitivity Detection Cell for HP Capillary Electrophoresis Systems*, Hewlett-Packard Technical Note, Publication Number 12-5965-5984E, 1997.
- ³³ D. N. Heiger, P. Kaltenbach and H. P. Sievert, *Electrophoresis*, 1994, **15**, 1234.

3

ESPECTROSCOPIA EN EL INFRARROJO CERCANO

3.1. INTRODUCCIÓN

La región del infrarrojo cercano, conocida habitualmente como NIR (del inglés Near-Infrared), fue descubierta por Sir William Herschel en 1800 ¹. Sin embargo, hasta casi un siglo más tarde no fue aplicada como técnica analítica cuando Abney y Festing registraron, a finales del siglo XIX, el espectro de líquidos orgánicos en la región espectral comprendida entre 700 y 1200 nm ². Durante la primera mitad del siglo XX, la atención prestada a la zona NIR era más bien escasa debido a las características del espectro: bandas anchas, solapadas y de poca intensidad, que dificultaban la asignación visual de bandas a estructuras o grupos funcionales. A lo largo de ese periodo, la zona del infrarrojo medio acaparó el interés de los espectroscopistas.

A finales de los años cincuenta, se desarrollaron las primeras aplicaciones analíticas de esta técnica, con la determinación de humedad, proteínas y grasas en productos agrícolas.^{3, 4} A partir de ese momento, el interés del NIR como técnica analítica ha ido en aumento.

Los avances tecnológicos y un mayor conocimiento de las herramientas matemáticas (quimiométricas) necesarias para el tratamiento de señales complejas, han hecho posible que en las dos últimas décadas de este siglo se hayan desarrollado múltiples aplicaciones en los más diversos campos industriales: alimentario, bioquímico, farmacéutico, petroquímico, polímeros y textil.

Las razones que hacen de la espectroscopia NIR una técnica especialmente atractiva para control de rutina en la industria se pueden resumir en:

- No requiere pretratamiento de muestra: puede registrarse el espectro de sustancias sólidas directamente.
- Es una técnica no invasiva y no destructiva.
- Puede implantarse para hacer medidas on-line y el análisis de rutina es rápido: control a tiempo real.
- Se pueden establecer calibraciones paralelas para que a partir de un espectro se obtenga más de un parámetro.
- Se obtiene información química de la muestra sin renunciar a información física: determinación de parámetros físicos.

3.2. FUNDAMENTOS DE LA TÉCNICA

3.2.1. Origen de la absorción

La región del infrarrojo comprende la zona del espectro de 780 nm a 10^6 nm. Esta región puede ser dividida en tres partes: infrarrojo cercano (NIR), infrarrojo medio (MIR o IR) e infrarrojo lejano (FIR). En la figura 3.1 se muestra un esquema del espectro electromagnético.

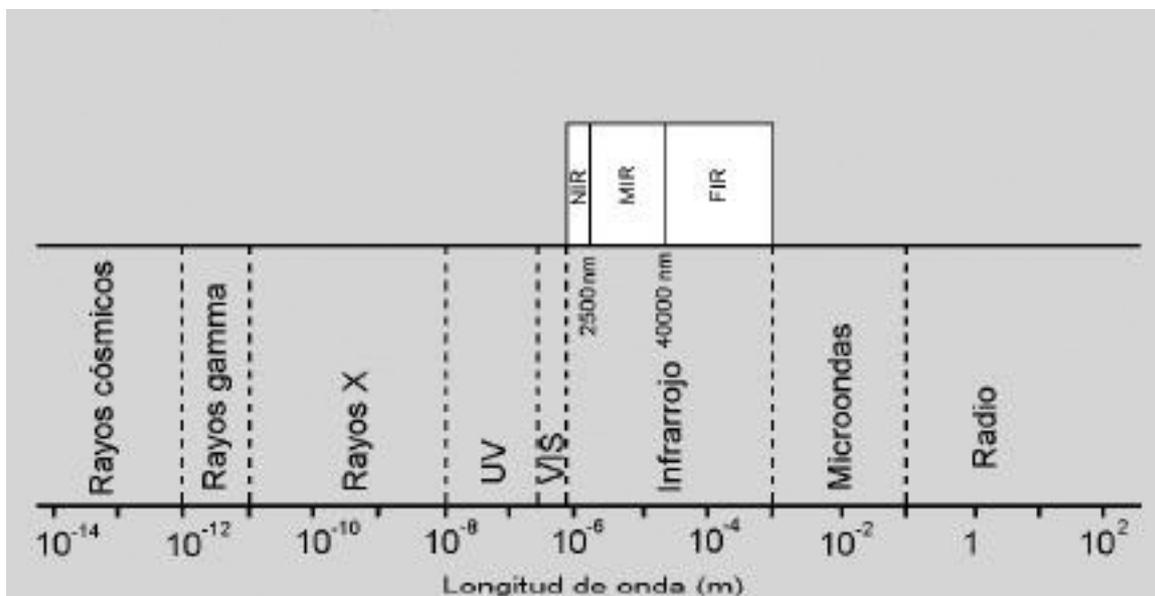


Figura 3.1. Regiones del espectro electromagnético.

La radiación infrarroja no es suficientemente energética como para producir las transiciones electrónicas que se dan cuando se trata de las radiaciones ultravioleta y visible. La absorción de radiación infrarroja se limita a especies moleculares con pequeñas diferencias de energía entre los distintos estados vibracionales.⁵

Para absorber radiación infrarroja, una molécula debe experimentar un cambio neto en el momento dipolar como consecuencia de su movimiento de vibración o de rotación. Si esto ocurre, el campo eléctrico asociado a la radiación puede interactuar con el campo eléctrico originado por la fluctuación del momento dipolar de la molécula. Si la frecuencia de la radiación iguala exactamente a la frecuencia de vibración natural de la molécula, ocurre una transferencia neta de energía que da lugar a un cambio en la amplitud de la vibración molecular; como consecuencia se absorbe la radiación.

Cuando se trata de especies homonucleares como O₂, N₂, o Cl₂, el momento dipolar no se altera durante la vibración o la rotación y, en consecuencia, este tipo de compuestos no absorben en el infrarrojo.

3.2.2. Oscilador armónico-anarmónico

Las características de vibración de una molécula diatómica pueden aproximarse a las de un oscilador armónico simple: dos masa unidas por un resorte, una de las cuales vibra a lo largo del eje de este resorte. La energía potencial E de esta vibración es 0 cuando la masa se acerca a su posición de equilibrio. Al comprimir o extender el resorte, la energía potencial del sistema aumenta, haciéndose máxima cuando la distancia entre las dos masas es máxima o mínima. Esta energía potencial puede definirse como:

$$E = \frac{1}{2} kx^2 \quad (3.1)$$

siendo k la constante de fuerza (que depende del resorte, del enlace en el caso de moléculas) y x el desplazamiento del objeto (de los átomos). La curva de la energía potencial para una oscilación armónica simple es una parábola como en la Figura 3.2.

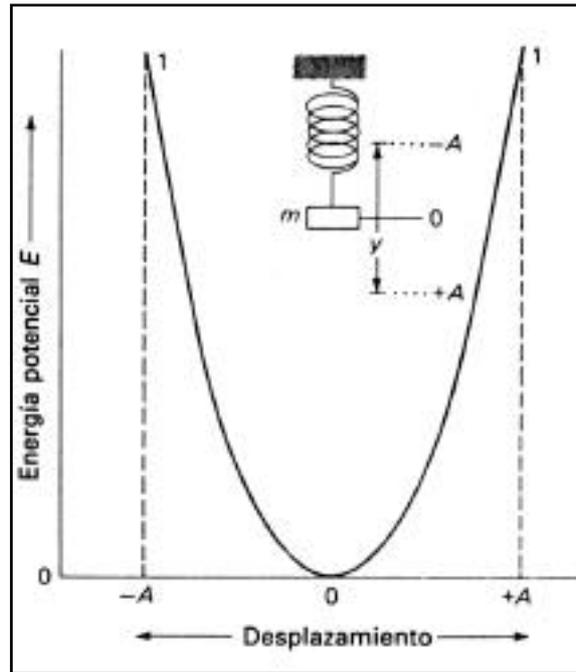


Figura 3.2. Diagrama de energía potencial del oscilador armónico.

La frecuencia natural de vibración de un sistema constituido por dos masas unidas por un muelle perfectamente elástico viene dada por:

$$\nu = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad (3.2)$$

siendo ν la frecuencia, k la constante de fuerza y m_1 y m_2 las masas respectivas de cada una de las masas (átomos).

Pero las ecuaciones de mecánica ordinaria, tal como se han utilizado hasta ahora, no describen completamente el comportamiento de partículas atómicas, ya que no recogen la naturaleza cuantizada de las energías vibracionales moleculares (y por supuesto de otras energías atómicas y moleculares). Para cada molécula, existen niveles discretos de energía y las únicas transiciones posibles son entre niveles energéticos consecutivos. La energía vibracional, resolviendo ecuaciones cuánticas, se puede expresar como:

$$E_{\text{vib}} = \left(\nu + \frac{1}{2}\right) h\nu \quad (3.3)$$

donde ν es el número cuántico vibracional (que sólo adquiere valores enteros: 0,1,2,3...) y h la constante de Planck. El resultado de combinar las ecuaciones (3.2) y (3.3) proporciona la

expresión de la energía vibracional de una molécula diatómica teniendo en cuenta su naturaleza cuantizada:

$$E_{\text{vib}} = \tilde{\nu} + \frac{1}{2} \frac{h}{2} \sqrt{\frac{k(m_1 + m_2)}{m_1 m_2}} \quad (3.4)$$

El modelo de oscilador armónico, aún teniendo en cuenta consideraciones cuánticas, resulta incompleto para describir la vibración molecular. Cuando dos átomos se acercan experimentan una repulsión coulombica entre los dos núcleos que actúa en la misma dirección que la fuerza restauradora del enlace, por lo que la energía potencial se elevará más rápidamente que lo que predice el modelo armónico. Por el contrario, cuando los átomos se alejan, se produce una disminución de la fuerza restauradora, al acercarse la distancia interatómica a la distancia de disociación del enlace, por lo que la energía potencial disminuye.

Las ecuaciones de onda de la mecánica cuántica permiten obtener curvas de energía potencial más correctas para las vibraciones moleculares. Sin embargo, la elevada complejidad matemática implica que estas ecuaciones sólo permiten ser aplicadas cuantitativamente a sistemas muy sencillos. Pero es evidente que desde un punto de vista cualitativo, las curvas que describen la evolución de la energía vibracional adoptan forma no armónica, como se muestra en la figura 3.3. Las curvas armónicas y no armónicas son casi iguales a energías bajas, por lo que las moléculas sólo tienen un comportamiento armónico entorno a la posición de equilibrio.

La expresión de la energía vibracional (ec. 3.3), corregida con términos que explican la anarmonicidad de las moléculas, se expresa como:

$$E_{\text{vib}} = \nu + \frac{1}{2} h\nu - \nu + \frac{1}{2} {}^2 h\nu y - \nu + \frac{1}{2} {}^3 h\nu y' \quad (3.5)$$

donde y , y' ... son denominadas constantes de anarmonicidad. Para valores pequeños de y , el tercer término y superiores pueden ser ignorados. En el modelo anarmónico los niveles energéticos no están igualmente espaciados: a niveles de energía más altos, la energía entre niveles consecutivos es menor. La regla de selección para transiciones energéticas cambia permitiendo ahora $\Delta \nu = \pm 2, \pm 3, \dots$, por lo que además de observar la banda fundamental ($\Delta \nu = \pm 1$), pueden observarse otras bandas denominadas sobretonos.

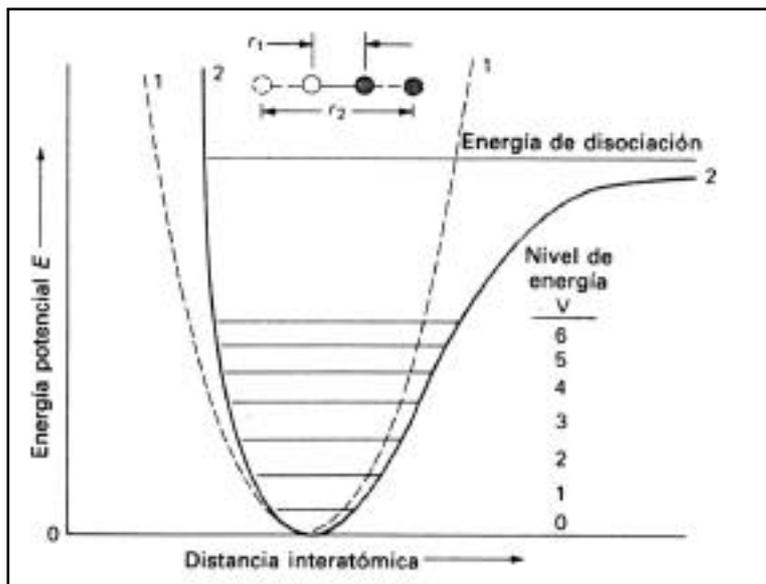


Figura 3.3. Diagrama de energía potencial para un oscilador no armónico.

3.2.3. Absorción de las bandas en el infrarrojo cercano

El origen de la absorción de las bandas en el infrarrojo cercano es el mismo que para las bandas en el infrarrojo medio: una molécula absorberá radiación NIR si la energía de la radiación se corresponde a la diferencia energética entre dos niveles vibracionales y se da un cambio en su momento dipolar. Sin embargo, en la zona NIR no aparecen bandas correspondientes a vibraciones fundamentales ($\nu = \pm 1$), como ocurre en la zona del infrarrojo medio ⁶. En esta zona aparecen las bandas denominadas sobretonos, correspondientes a transiciones energéticas en las que $\nu > 1$. Estos sobretonos aparecen a frecuencias ligeramente menores que las predichas como múltiplos de las frecuencias fundamentales, debido al diferente espaciado entre los niveles energéticos en el modelo anarmónico. El primer sobretono ($\nu = 2$) es de intensidad mayor que los siguientes.

Además de estos sobretonos, en la región NIR también pueden observarse otro tipo de bandas de absorción, llamadas bandas de combinación, debidas a la interacción entre las diferentes frecuencias fundamentales de vibración de moléculas poliatómicas: sumas o restas de múltiplos de cada una de las frecuencias que interaccionan:

$$\nu_{\text{comb}} = n_1 \nu_1 + n_2 \nu_2 + n_3 \nu_3 \dots \quad (3.6)$$

donde n_i son números enteros y ν_i las frecuencias de las transiciones que contribuyen a la banda de combinación. Las bandas de combinación más frecuentes son aquellas en que $n_1 = n_2 = 1$.

Las transiciones no fundamentales son mucho menos probables que las correspondientes a transiciones entre niveles consecutivos, por lo que las bandas NIR son de intensidad menor que las que aparecen en la zona IR, además de ser anchas y no tan bien definidas como resultado del solapamiento de sobretonos y bandas de combinación.

Las bandas más frecuentes en NIR son debidas a enlaces que contienen átomos ligeros como C-H, N-H, O-H, S-H, debido a su mayor anarmonicidad ... En la figura 3.4 se muestran las regiones NIR donde absorben los diferentes enlaces. Las bandas de los grupos C=O, C-C, C-F o C-Cl, en general son muy débiles o no aparecen en la región NIR. Las vibraciones fundamentales de estos grupos tienen bajas frecuencias en la región IR y por tanto, los primeros sobretonos también aparecen en esa región.

Una característica de la zona del infrarrojo cercano es que las interacciones entre moléculas, como puentes de hidrógeno, afectan al espectro NIR, por lo que un espectro NIR también incorpora información sobre la estructura cristalina de la sustancia.

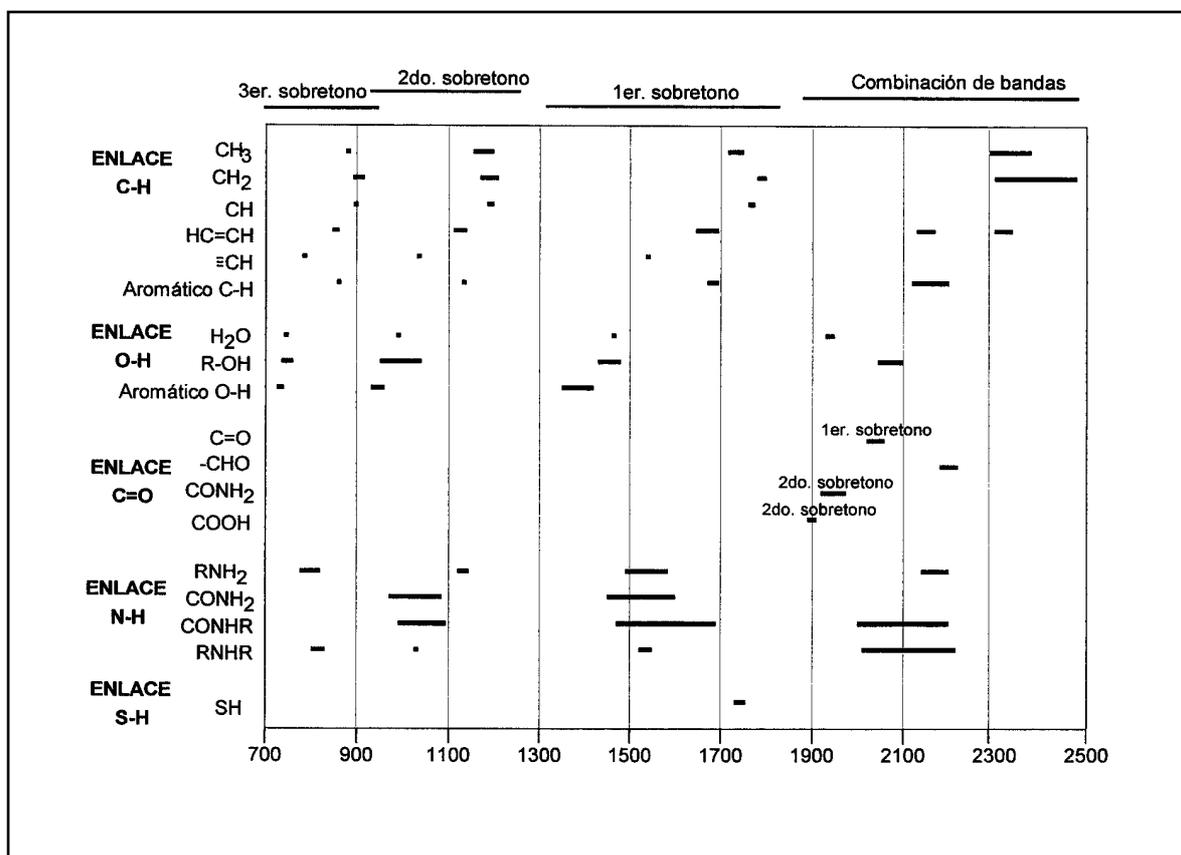


Figura 3.4. Tabla de asignación de bandas en la región NIR.

3.2.4. Interacción de la radiación NIR con la muestra

Cuando una radiación interactúa con una muestra, esta radiación puede ser absorbida, transmitida o reflejada. Si la radiación atraviesa la muestra hablamos de medidas de transmisión. Si por el contrario la radiación no atraviesa la muestra y es reflejada, estaremos realizando medidas de reflectancia. En ambos casos, la señal NIR obtenida consiste en una función compleja de la que hay que extraer la información deseada. A continuación se exponen los fundamentos de cada tipo de medida NIR.

3.2.4.1. Medidas por transmisión

La absorción de radiación sigue la ley de Lambert-Beer por lo que pueden utilizarse las medidas de transmisión para realizar medidas cuantitativas, siendo la absorbancia:

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{P_0}{P} = \epsilon bc \quad (3.7)$$

siendo A la absorbancia de la muestra, I la transmitancia, I_0 la intensidad de radiación incidente y I la intensidad de radiación transmitida. La absorbancia según la ley de Lambert-Beer es igual al producto de la absorptividad molar (ϵ) por el camino óptico (b) y por la concentración (c).

Pueden producirse desviaciones del cumplimiento de esta ley debidas a causas muy diversas como: reflexión y/o dispersión de radiación, concentraciones demasiado elevadas, interacciones químicas de la muestra...⁷

3.2.4.2. Medidas por reflectancia

La reflexión de radiación para una muestra opaca puede ser de dos tipos: especular y difusa. La reflectancia especular (o regular) descrita por las leyes de Fresnel, no aporta información sobre la composición, por lo que sólo contribuye al ruido. Por ello el diseño de los instrumentos coloca los detectores de manera que se minimiza la contribución de la reflexión especular. La reflectancia difusa tiene lugar en todas direcciones como consecuencia de los procesos de absorción y dispersión y predomina cuando los materiales de la superficie reflectante son débilmente absorbentes a la longitud de onda incidente y cuando la penetración de la radiación es grande en relación a la longitud de onda. Este tipo de reflexión es la base de las medidas que se realizan en espectroscopia por reflectancia.

Debido a su gran complejidad, no hay teorías rigurosas sobre reflectancia difusa. En cambio sí se han propuesto un conjunto de teorías empíricas, de entre las cuales la más

popular es la teoría de Kubelka-Munk ⁸ (KM). Esta teoría propone que la intensidad de radiación reflejada en una capa de grosor infinito completamente opaca (R) puede describirse:

$$\frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{k}{s} \quad (3.8)$$

donde k y s son las llamadas constantes de dispersión y de absorción respectivamente. La función $(1 - R)^2 / 2R$ se conoce como función de Kubelka-Munk y usualmente se escribe como $f(R)$. En análisis cuantitativo, la ecuación 3.8 puede escribirse en función de la concentración del analito absorbente (c) como:

$$f(R) = \frac{\ln 10 \cdot a \cdot c}{s} \quad (3.9)$$

siendo a la absorptividad molar.

La ecuación de KM requiere medir la reflectancia absoluta. En la práctica se utiliza la reflectancia relativa (R) que es la relación de intensidades de luz reflejadas por la muestra y un estándar ($R = R_{\text{muestra}} / R_{\text{estándar}}$) (suele tratarse de placas cerámicas de alúmina de alta pureza, teflón o sulfato de bario). De esta forma, la ecuación en términos de reflectancia relativa resultante es:

$$f(R) = \frac{(1 - R)^2}{2R} = \frac{c}{a} \quad (3.10)$$

donde a es $s / \ln 10$. Esta expresión sólo es válida para muestras débilmente absorbentes, en matrices no absorbentes. En espectroscopia NIR la matriz suele ser muy absorbente a la misma longitud de onda que el analito, lo que provoca desviaciones de la ecuación de KM.

Una expresión muy utilizada es una aplicación empírica de la relación entre la concentración y la reflectancia relativa, análoga a la ley de Beer:

$$A = \log \frac{1}{R} = a' \cdot c \quad (3.11)$$

siendo A la absorbancia aparente, R la reflectancia relativa, c la concentración y a' una constante de proporcionalidad. A pesar de que esta relación no comparte los fundamentos teóricos de KM, en la práctica proporciona resultados muy satisfactorios en muchas aplicaciones de espectroscopia NIR.

3.3. INSTRUMENTACIÓN

Debido a la baja intensidad de las bandas NIR, los niveles de ruido permisibles y la estabilidad de un instrumento deben tener un nivel de exigencia mayor que en otros espectrofotómetros si se pretende aplicar al análisis cuantitativo. Ésta es una de las causas de la tardía aparición de los primeros instrumentos comerciales NIR: sólo cuando los avances tecnológicos permitieron obtener niveles adecuados de sensibilidad, reproducibilidad y ruido pudo desarrollarse la espectroscopia NIR.

El esquema básico de un instrumento NIR no difiere de cualquier espectrofotómetro. Sus componentes básicos son: fuente de radiación, sistema de selección de longitud de onda, compartimiento de muestra y detector. A continuación se describen con más detalle las diferentes partes integrantes de un instrumento NIR.

3.3.1. Fuente de radiación

La fuente de radiación más utilizada es la lámpara halógena de filamento de tungsteno con ventana de cuarzo, capaz de proporcionar un espectro continuo en la región de 320-2500 nm. Otras fuentes de radiación que pueden utilizarse son los denominados LEDs (*Light Emitting Diodes*)⁹, que dependiendo de su composición pueden llegar a emitir hasta 1600 nm, pero no por encima de esa longitud. Los instrumentos que incorporan este último sistema de fuente de radiación no requieren un sistema de selección de longitudes de onda.

3.3.2. Sistemas de selección de longitudes de onda

Disponer de un sistema adecuado de selección de longitudes de onda es un factor importante para poder obtener un buen nivel de sensibilidad. Un buen sistema de selección de longitudes de onda debe ser capaz de:

- Proporcionar una anchura de banda estrecha con respecto a la banda de absorción que se está midiendo.
- Proporcionar señales altas a fin de conseguir una relación señal/ruido satisfactoria.

En función del dispositivo utilizado para la selección de longitudes de onda, los instrumentos NIR pueden ser clasificados en : instrumentos de filtros, monocromadores e instrumentos de transformada de Fourier.

Los instrumentos de filtros seleccionan las longitudes de onda interponiendo entre la fuente y la muestra materiales que permiten el paso de determinadas longitudes de onda.¹⁰ Los más sencillos son los de absorción que transmiten longitudes de onda de forma selectiva

según sea el material de que están hechos. Otro tipo de filtros son los de interferencia óptica (de Fabry-Perot) que filtran longitudes de onda según el índice de refracción del filtro y su grosor.

Los monocromadores son dispositivos que descomponen la luz policromática que proviene de la fuente de radiación en longitudes de onda discretas. La radiación entra en forma de haz estrecho y un elemento dispersante, que puede ser un prisma o una red de difracción, la descompone. Los más utilizados actualmente son los que incorporan una red de difracción, ya que son más baratos, proporcionan mejor separación de longitudes de onda y dispersan linealmente la radiación.⁵ Un último tipo de monocromador es el llamado optoacústico (AOTF), que aprovechan el cambio de índice de refracción de un material (TeO_2) cuando es atravesado por una onda sonora, convirtiéndose el material en una red capaz de difractar ciertas longitudes de onda de un haz incidente¹¹.

Los instrumentos de Transformada de Fourier dividen la luz en dos haces cuyas longitudes de trayectoria se pueden variar periódicamente para dar modelos de interferencia mediante un espejo móvil. Variando la posición de estos espejos se pueden crear interferencias constructivas o destructivas. Recombinando los dos haces se obtiene una señal denominada interferograma. Mediante la transformada de Fourier se convierte el interferograma (representación de señal en dominio tiempo) en el espectro (en dominio de frecuencias).⁵

3.3.3. Compartimiento de muestra

Dependiendo de la naturaleza de las muestras, la muestra deberá ser presentada de distinta forma. Para las muestras en forma sólida, la medida efectuada es de reflectancia difusa. En cambio, muestras líquidas suelen medirse por transmisión de radiación. Un caso intermedio es el de muestras que se miden por transflectancia, en el que parte de la luz incidente es reflejada en la muestra y otra parte la atraviesa, para ser reflejada por un material colocado en la cara opuesta de la muestra, siendo recogida por el detector. Esto implica que el diseño de los instrumentos cambie según la finalidad del análisis o bien que los instrumentos comerciales dispongan de varios dispositivos intercambiables para aumentar su versatilidad. En la figura 3.5 se muestran esquemáticamente los tres tipos de diseños instrumentales NIR.

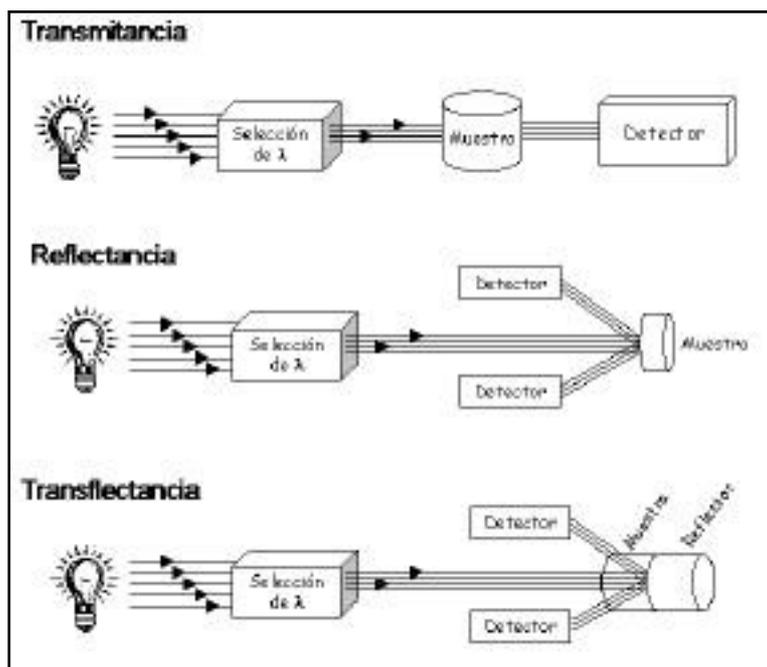


Figura 3.5. Diseños instrumentales NIR.

3.3.4. Detector

Detectores habituales en espectroscopia en el infrarrojo próximo son los construidos con semiconductores (como InGaAs, PbS, InAs, InSb, Si...). El detector más ampliamente utilizado es el de PbS, que posee sensibilidad adecuada entre 900 y 2600 nm. Para medidas por transmisión en sólidos se utilizan detectores de arseniuro de Indio y Galio (InGaAs), operativo de 600 a 1900 nm.

3.4. APLICACIONES NIR EN LA INDUSTRIA FARMACÉUTICA

La industria farmacéutica ha mostrado un especial interés en el uso de la espectroscopia NIR, debido a su rapidez, a su naturaleza no destructiva, y especialmente a su versatilidad en cuanto a la gran cantidad de aplicaciones, tanto para análisis cualitativo o cuantitativo en control de calidad como en el control de procesos. Las aplicaciones más importantes de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica pueden resumirse en la tabla 3.1.

Tabla 3.1. Aplicaciones de la espectroscopia NIR en la industria farmacéutica.

Control de calidad	• Cualitativas	-Identificación de materias primas ^{12, 13} -Identificación de preparados ^{14, 15} -Diferenciaciones polimórficas ¹⁶
	• Cuantitativas	-Determinación de principios activos y/o excipientes ^{17, 18} -Determinación de humedad ^{19, 20} -Determinaciones polimórficas ^{21, 22} -Determinación de parámetros físicos ²³
Control de procesos	• Procesos físicos	-Homogeneizaciones de mezclas ^{24, 25} -Seguimiento del proceso de <i>film coating</i> ^{26, 27}
	• Procesos químicos	-Seguimiento de reacciones ^{28, 29} -Seguimiento de conversiones polimórficas ³⁰

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ W. Herschel, *Phylosophical Transactions of the Royal Society*, 1800, **90**, 255.
- ² W. Abney and E. R. Festing, *Phylosophical Transactions of the Royal Society*, 1881, **172**, 887.
- ³ G. S. Birth, *Agricul. Mark.*, 1957, **2**, 2.
- ⁴ G. S. Birth and K. H. Norris, *Food Technol.*, 1958, **12**, 592.
- ⁵ D. A. Skoog, F. J. Holler and T. A. Nieman, *Principios de análisis instrumental*, 5ª ed., McGraw-Hill cop. 2001.
- ⁶ Near Infra-red Spectroscopy, ed. K. I. Hildrum, T. Isaksson, T. Naes and A. Tandberg, Ellis Horwood, Chichester, England, 1992.
- ⁷ B. G. Osborne and T. Fearn, *Near Infrared Spectroscopy in Food Analysis*, Longman Scientific & Technical, Harlow, Essex, UK, 1986.
- ⁸ P. Kubelka and F. Munk, *Z. Tech. Phys.*, 1931, **12**, 593.
- ⁹ A. S. Bonano and P.R. Griffiths, *Appl. Spectrosc.* 1995, **49**, 1590.
- ¹⁰ *Handbook of Near-Infrared Analysis*, ed. D. A. Burns and E. W. Ciurczak, Marcel Dekker Inc., New York,
- ¹¹ P. J. Treado, I. W. Levin and E. N. Lewis, *Appl. Spectrosc.* 1992, **46**, 553.
- ¹² C. I. Geräusser and K. A. Kovar, *Appl. Spectrosc.*, 1997, **51**, 1504.
- ¹³ W. Plugge and C. Van der Vlies, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 1993, **11**, 435.
- ¹⁴ M. A. Dempster, B. F. MacDonald, P. J. Gemperline and N. R. Boyer, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **310**, 43.
- ¹⁵ M. A. Dempster, B. F. MacDonald, P. J. Gemperline and N. R. Boyer, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1993, **11**, 1087.
- ¹⁶ P. K. Aldridge, C. L. Evans, H. W. Ward, S. T. Colgan, N. Boyer and P. J. Gemperline, *Anal. Chem.*, 1996, **68**, 997.
- ¹⁷ D. Trafford, R. D. Jee, A. C. Moffat and P. Graham, *Analyst*, 1999, **124**, 163.
- ¹⁸ P. Corti, G. Ceramelli, E. Dreassi and S. Matii, *Analyst*, 1999, **124**, 755.
- ¹⁹ M. Blanco, J. Coello, H. Iturruga, S. MasPOCH and E. Rovira, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1997, **16**, 255.
- ²⁰ S. M. Han and P. J. Faulkner, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 1681.
- ²¹ G. Buckton, E. Yonemochi, J. Hammond and A. Moffat, *Int. J. Pharm.*, 1998, **168**, 231.
- ²² M. Blanco and A. Villar, *Analyst*, 2000, **125**, 2311.
- ²³ J. D. Kirsch and J. K. Drennen, *J. Pharm. Biomed Anal.*, 1995, **13**, 1273

-
- ²⁴ P. A. Hayley, P. Doherty, P. Tapsell, T. Olivier and P. K. Aldridge, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1996, **14**, 551.
- ²⁵ S. Sekulic, J. Wakeman, P. Doherty and P. A. Hayley, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1998, **17**, 1285.
- ²⁶ J. D. Kirsch and J. K. Drennen, *Pharmaceut. Res.*, 1996, **13**, 234.
- ²⁷ J. D. Kirsch and J. K. Drennen, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 1995, **13**, 1273.
- ²⁸ C. Coffey, B. E. Cooley Jr. and D. S. Walker, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **395**, 335.
- ²⁹ Z. Ge, B. Buchanan, J. Timmermans, D. DeTora, D. Ellison and J. Wyvratt, *Process Control Qual.*, 1999, **11**, 277.
- ³⁰ T. Norris, P.K. Aldridge and S. Sekulic, *Analyst*, 1997, **122**, 549.