

Aplicación de la Quimiometría para el aprovechamiento analítico de reactivos generales. Revisión de la incertidumbre instrumental y del Límite de Detección multivariable.

Juan Zuriarrain Ocio

TESIS DE LA UNIVERSIDAD DEL PAÍS VASCO/EUSKAL HERRIKO UNIBERTSITATEA

QUIMICA APLICADA

Fecha de Lectura: 16/07/2010

CAPÍTULO 4

EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN LOS MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE: PROPUESTA PARA EL CÁLCULO DEL L.O.D. SIGUIENDO LAS RECOMENDACIONES DE LA I.U.P.A.C. Y UTILIZANDO EXCLUSIVAMENTE LOS DATOS PROPIOS DEL PROCESO DE CALIBRACIÓN



Juan Zuriarrain Ocio, 2010

<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>

<http://addi.ehu.es/handle/10810/5574>

EL LÍMITE DE DETECCIÓN EN LOS MÉTODOS DE CALIBRACIÓN MULTIVARIABLE: PROPUESTA PARA EL CÁLCULO DEL L.O.D. SIGUIENDO LAS RECOMENDACIONES DE LA I.U.P.A.C. Y UTILIZANDO EXCLUSIVAMENTE LOS DATOS PROPIOS DEL PROCESO DE CALIBRACIÓN



“Xi ya pensaba que nunca encontraría el final de la Tierra... Un día, de pronto, llegó hasta él”

1. INTRODUCCION

El presente capítulo tiene por objeto extender la metodología recomendada por la I.U.P.A.C para calibración univariable, generalmente aceptada por la comunidad científica, a nuevos métodos de calibración multivariable. De este modo se propone un estimador del límite de detección multivariable. Se han considerado situaciones de diversa complejidad y la metodología propuesta se aplica principalmente al algoritmo de calibración PLS, aunque también se aplica en algunos casos a otros como PCR o PLS2. La principal característica de la metodología que se propone, es que únicamente se emplean los datos multivariados adquiridos originalmente para el cálculo del límite de detección; es decir, no se emplea ningún tipo de señal univariable subrogada que provenga de ellos. A diferencia de otras, la metodología que aquí se propone puede aplicarse a sistemas no lineales, en los que tras haber seleccionado un número óptimo de componentes principales (PCs) o variables latentes (LVs) se aplican algoritmos como la regresión por componentes principales (PCR) o la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR).

Más que una metodología específica, la propuesta puede considerarse una metodología conceptual, al basarse propiamente en definir y calcular la señal multivariable del límite de detección. Una vez que el modelo de calibración-predicción se ha optimizado, puede aplicarse dicho modelo a la señal multivariable obtenida independientemente de cual sea ésta. De este modo, la metodología propuesta podría aplicarse para cualquier método de calibración multivariable conocido. En esta memoria, se han incluido como ejemplos PCR, PLS y PLS2.

2. ASPECTOS TEORICOS:

La calibración de un sistema de medición es una de las claves más importantes de un proceso de medida en química, dado que tiene importancia directa en la trazabilidad de la medida en sí misma y contribuye a la incertidumbre de la propia medida. La medición puede considerarse como un proceso en dos pasos, con sus incertidumbres asociadas¹:

- Primeramente se calibra el instrumento de medida empleando para ello un solo patrón o un grupo de patrones. En este proceso se realiza la estimación de los parámetros que designan el modelo de calibración, y si es lineal:

$$r = \hat{b}_0 + \hat{b} \cdot c \quad (1)$$

(donde \hat{b} y \hat{b}_0 son los parámetros estimados del modelo, y r la respuesta instrumental).

- Una vez que se ha realizado el calibrado, la etapa de predicción puede describirse con la siguiente expresión (Figura 1):

$$\hat{c} = \frac{r - b_0}{b} \quad (2)$$

en la que \hat{c} representa la concentración (o cantidad) estimada para la nueva muestra.

La señal analítica correspondiente al límite de detección, r_{LOD} , puede escribirse de la siguiente manera²:

$$r_{LOD} = b_0 + k_\alpha \cdot s_{blanco} + k_\beta \cdot s_{LOD} \quad (3)$$

donde b_0 es la señal del blanco, k_α y k_β son factores que conducen a las probabilidades α y β respectivamente, y s_{blank} y s_{LOD} son las desviaciones estándar experimentales correspondientes a una disolución sin analito (blanco) y otra con analito a la concentración del límite de detección respectivamente.

¹ D. B. Hibbert, *The uncertainty of a result from a linear calibration*, *Analyst*, 2006, 131, 1273-1278.

² K. Faber and B. R. Kowalsky, *Improved estimation of the limit of detection in multivariate calibration*, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1997, 357, 789-795)

La **ecuación 3** es la base del criterio (recomendación ISO 11843) establecido para el cálculo del Límite de Detección multivariable una vez reducida la señal a univariable³.

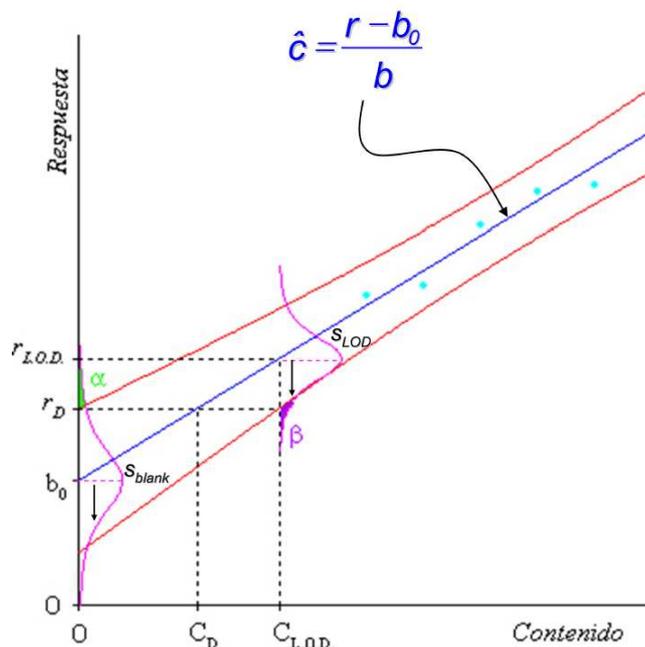


Fig. 1: Recta de regresión lineal e incertidumbre asociada a la señal del blanco (s_{blank}) y a la del límite de detección (s_{LOD}). Las probabilidades de cometer el error de tipo I y de tipo II son α y β respectivamente.

Un valor de $k_{\alpha} = 1.5$ en la **ecuación 3** significaría que únicamente el 7 % de las muestras que no tuvieran analito ($c = 0$) darían un resultado de concentración mayor que $b_0 + 1.5s_{blanco}$ (error tipo I). La concentración correspondiente a la señal $r_D = b_0 + 1.5s_{blanco}$ es conocida como *Límite de Decisión* (c_D) o *Valor Crítico*. Un valor de $k_{\beta} = 1.5$ en la **ecuación 3** significa que únicamente el 7% de las muestras que contienen analito a un nivel de concentración correspondiente a la del límite de detección (c_{LOD}) darán una concentración inferior al límite de decisión ($r_C = b_0 + 1.5 s_{blank}$) (error tipo II).

Si ambos tipos de errores fueran iguales, el límite de decisión (c_D) sería igual a $c_{LOD}/2$, ya que las distribuciones de error para $c=0$ y $c=c_{LOD}$ serían entonces iguales. Eso no es exactamente así ya que las distribuciones no son iguales, pero si muy similares y puede por tanto adoptarse esta aproximación⁴. Ambos valores son conceptualmente diferentes ya que el límite de detección (c_{LOD}) se fija antes de que se realice la medida;

³ M. C. Ortiz, L. A. Sarabia, A. Herrero, M. S. Sánchez, M. B. Sanz, M. E. Rueda, D. Giménez and M. E. Meléndez, *Capability of detection of an analytical method evaluating false positive and false negative (ISO 11843) with partial least squares* Chemom. Intell. Lab. Syst., 2003, 69, 21-33.

⁴ A. Hubaux and G. Vos, *Decision and detection limits for calibration curves*, Anal. Chem., 1970, 42, 849-855.

es pues una decisión *a priori*, mientras que la decisión sobre si se detecta o no un analito (c_D) se toma una vez realizada la medida, y es por lo tanto una decisión *a posteriori*².

Cuando $k_{\alpha} = k_{\beta} = 1.5$, y se asume la aproximación de homocedasticidad entre $c=0$ y $c=c_{LOD}$ (desviación estándar constante), la **ecuación 3** puede ser escrita como:

$$r_{LOD} = b_0 + 3 \cdot s_{blanco} \quad (4)$$

Y sustituyendo esta expresión en la **ecuación 2** nos quedaría:

$$\hat{c}_{LOD} = \frac{3 \cdot s_{blanco}}{b} \quad (5)$$

Se ha escrito mucho acerca de las limitaciones de esta expresión, pero es la base del criterio de la IUPAC, y su utilización está muy extendida para realizar comparaciones. Quedaría por discutir la obtención práctica de los valores b_0 y s_{blanco} , cuando se utiliza una recta de regresión para el calibrado del método analítico. Según el método de los mínimos cuadrados se da por supuesto que cualquier punto de la recta tiene una incertidumbre distribuida normalmente (en la dirección r) con una desviación estándar estimada por $s_{r/c}$.

$$s_{r/c} = \sqrt{\frac{\sum_i (r_i - \hat{r}_i)^2}{I - 2}} \quad (6)$$

Donde el término $(r_i - \hat{r}_i)$ se refiere a los residuales de la señal, e I al número de muestras incluidas en el calibrado. Es por tanto justificable utilizar $s_{r/c}$ en lugar de la desviación estándar del blanco, s_{blanco} , en la estimación del límite de detección, aunque en general el uso de $s_{r/c}$ es menos frecuente que el de s_{blanco} en la aplicación de la **ecuación 2**. Por supuesto es posible medir el blanco varias veces y obtener un valor independiente para s_{blanco} que estadísticamente no debería diferir significativamente de $s_{r/c}$. El valor medio obtenido (a) promediando todas las medidas del blanco, se puede utilizar como estimación de b_0 , de quien no difiere significativamente. Incluso puede decirse que a efectos de cálculo del límite de detección debe usarse este valor (a), ya

que de otro modo pueden obtenerse resultados aberrantes. Aquí recae uno de los temas más problemáticos en el área del límite de detección, decidir la forma de estimar la incertidumbre del método. La posición de la ISO es la de utilizar los datos que provienen de la propia línea de calibración y no, por lo tanto, la réplica de la medida del blanco⁵. Debe decirse que el frecuente uso de medidas repetidas sobre disoluciones del blanco se explica porque los resultados son, generalmente más favorables al analista, ya que se obtienen incertidumbres menores, y por lo tanto, límites de detección más bajos, pero tienden a generar una subestimación en el valor del límite de detección.

Se podría deducir una teoría similar para el caso que se utilice calibración inversa multivariable. El objetivo de la calibración consiste en obtener unos parámetros que permitan predecir la concentración (o propiedad de interés) en futuras muestras a partir de su respuesta multivariable. En este proceso, el conjunto de muestras de calibración (matriz \mathbf{X}), constará de I muestras, cada una de ellas con J variables predictoras, que estarán relacionadas con una matriz \mathbf{Y} de concentraciones o propiedades de interés (con I muestras y L analitos)⁶.

Se considerará un método de calibración por PLS1 (los principios del PLS se pueden encontrar en la bibliografía^{7,8,9}). Las ecuaciones que resumen la etapa de calibración son las siguientes¹⁰:

$$\mathbf{T}_{(IxA)} = w(\mathbf{X}) \quad (7)$$

$$\mathbf{X}_{(IxJ)} = \bar{\mathbf{x}}_{(IxJ)} + \mathbf{T}_{(IxA)} \cdot \mathbf{P}_{(AxJ)}^T + \mathbf{E}_{(IxJ)} \quad (8)$$

$$\mathbf{Y}_{(IxL)} = \bar{\mathbf{y}}_{(IxL)} + \mathbf{T}_{(IxA)} \cdot \mathbf{Q}_{(AxL)}^T + \mathbf{F}_{(IxL)} \quad (9)$$

⁵ L. A. Currie; *Detection: International update, and some emerging di-lemmas involving calibration, the blank, and multiple detection decisions*; Chemom. Intell. Lab. Syst.; 37 (1997); 151-181

⁶ Como notación se emplearán los **caracteres en negrita** para designar **Matrices** (letras en mayúsculas) y **vectores** (en minúsculas), y el superíndice ^T para designar la operación de transposición. Las dimensiones tanto de las matrices como de los vectores se dan como subíndices y entre paréntesis (IxJ).

⁷ H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*, Wiley, Chichester, 2001, Chapter 6.

⁸ R. Kramer, *Chemometric Techniques for Quantitative Analysis*, Marcel Dekker, New York, 1988.

⁹ J. M Andrade-Garda, R. Boqué-Martí, J. Ferré-Baldrich, A. Carlosena-Zubieta; *Partial Least-Squares Regression*, en: J. M Andrade-Garda (Ed.); *Basic Chemometric Techniques in Atomic Spectroscopy*; RSC, Cambridge (2009), Cap. 4.

¹⁰ H. Martens, M. Martens, *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*, Wiley, Chichester, 2001, p 118.

En la regresión parcial por mínimos cuadrados (PLSR) la función $w(\mathbf{X})$ se define de tal forma que las primeras variables latentes (LVs) estén lo más correlacionadas con la concentración (a partir de aquí se considerará un único analito, para hacer los cálculos más sencillos). \mathbf{T} es la matriz de puntuaciones (*scores*) y se utiliza para modelar tanto la matriz \mathbf{X} como la \mathbf{Y} . \mathbf{P} y \mathbf{Q} son las matrices de cargas (*loadings*), aunque al definir las para un solo analito, la matriz $\mathbf{Q}_{(A \times L)}$ se convierte en el vector $\mathbf{q}_{(A \times 1)}$ y lo mismo ocurre con la matriz $\mathbf{F}_{(L \times L)}$ que se transforma en el vector $\mathbf{f}_{(L \times 1)}$. \mathbf{E} y \mathbf{F} son las correspondientes matrices de residuales para \mathbf{X} (señales) e \mathbf{Y} (concentraciones o propiedades de interés) respectivamente.

De una forma similar, el vector de concentraciones $\mathbf{y}_{(I \times 1)}$ se puede modelar directamente a partir de la matriz \mathbf{X} a través del vector de coeficientes de regresión del modelo $\mathbf{b}_{(J \times 1)}$:

$$\mathbf{y}_{(I \times 1)} = b_0 + \mathbf{X}_{(I \times J)} \mathbf{b}_{(J \times 1)} + \mathbf{f}_{(I \times 1)} \quad (10)$$

donde $\mathbf{b}_{(J \times 1)}$ es el vector de regresión, y b_0 es la desviación del modelo (offset), es decir la concentración estimada cuando la señal es cero ($\mathbf{X}=0$). Los valores reales tanto de \mathbf{E} , \mathbf{f} , \mathbf{b} y b_0 dependerán del número de variables latentes (LVs) seleccionadas como óptimas ($a = 1, 2 \dots A$) para la construcción del modelo.

Una vez que se ha seleccionado el número óptimo de variables latentes (LVs) para la construcción del modelo, y todos los parámetros del modelo han sido estimados (después de minimizar los residuales por mínimos cuadrados), el modelo de predicción de concentración (y), para una nueva muestra (i) se puede representar con la siguiente expresión:

$$\hat{y}_i = \hat{b}_0 + \mathbf{x}_i \cdot \hat{\mathbf{b}} \quad (11)$$

donde el símbolo \mathbf{r}_i corresponde al vector de señal multivariable para una muestra cualquiera (i). En adelante se omitirá el sombrero sobre b_0 y \mathbf{b} .

Es muy frecuente preprocesar (centrar o auto escalar) previamente los datos (\mathbf{r}_i'); en ese caso la **ecuación 11** se simplificaría, y resultaría ser:

$$\hat{y}_i' = \mathbf{x}_i' \cdot \mathbf{b} \quad (12)$$

pero posteriormente el preprocesado realizado tendría que deshacerse en la concentración estimada \hat{y}_i' para obtener la concentración real¹¹ (\hat{y}_i) y por tanto se mantendrán las expresiones en su forma original (sin pretratamiento).

De forma similar a la **ecuación 4**, podría definirse una señal multivariable para el límite de detección:

$$\mathbf{r}_{LOD(1 \times J)} = \mathbf{r}_{blanco(1 \times J)} + 3 \cdot \mathbf{s}_{blanco(1 \times J)} \quad (13)$$

donde \mathbf{r}_{LOD} y \mathbf{r}_{blanco} serían los vectores señal multivariable del límite de detección y del blanco respectivamente, y \mathbf{s}_{blanco} el vector desviación estándar del blanco definido como un vector compuesto por las desviaciones estándar de cada una de las J variables.

Llevando esta expresión a la **ecuación 11**, queda lo siguiente:

$$\hat{c}_{LOD} = b_0 + \mathbf{r}_{blanco} \cdot \mathbf{b} + 3 \cdot \mathbf{s}_{blanco} \cdot \mathbf{b} \quad (14)$$

(Siendo $\hat{c}_{LOD} = \hat{y}_{LOD}$)

La señal del *blanco* corresponde a aquella en la que el analito está ausente.

$$b_0 + \mathbf{r}_{blanco} \cdot \mathbf{b} \approx 0 \quad (15)$$

Y por tanto, de las **ecuaciones 14** y **15** se obtiene la siguiente expresión:

$$\hat{c}_{LOD} = 3 \cdot \mathbf{s}_{blanco} \cdot \mathbf{b} \quad (16)$$

La **ecuación 16** es similar a la que ya se vio para el caso univariante (**Ecuación 4**), y puede ser la base para el cálculo del límite de detección multivariable. Sin embargo en este caso no es sencillo proponer una estimación de cómo hacerlo desde el punto de vista multivariable. Como para la calibración univariable, la desviación estándar del blanco debería poder deducirse tanto a partir de (N) repetidas medidas sobre la disolución del blanco como a partir de los propios resultados del modelo de regresión.

¹¹ J. Ferré, S.D. Brown and F.X. Rius, *Improved calculation of the net analyte signal in inverse multivariate calibration*; J. Chemometrics, 2001, 15, 537-553.

Se puede calcular un valor de la desviación estándar para cada una de las variables (j) a partir de la (N) medidas de las disoluciones del blanco. Todas las desviaciones $s_{blanco}(j)$ así calculadas (**ecuación 17**), formarán el vector s_{blanco} que podrá ser utilizado en la **ecuación 16**.

$$s_{blanco}(j) = \sqrt{\frac{\sum_{n=1}^N (r_{n,j} - \bar{r}_{blanco,j})^2}{N-1}} \quad \text{para } j=1,2,\dots,J \quad (17)$$

Por otro lado, bien podría calcularse un vector s_{XY} (vector **Residual de la Regresión Multivariable**) similar al escalar $s_{r/c}$ de la calibración univariante (**ecuación 6**), teniendo en cuenta que como se ve en la **ecuación 8**, se obtiene un vector residual, e_i , proveniente de la autopredicción para cada una de las (i) muestras empleadas en el calibrado:

$$e_i = r_i - \hat{r}_i \quad (18)$$

Para el conjunto completo de las I muestras de calibración, se puede obtener el vector s_{XY} y utilizarlo como estimación del vector s_{blanco} en la **ecuación 16**. Nuevamente el cálculo se realiza para cada una de las (j) variables de los (i) vectores residuales del grupo de calibración (**Ecuación 19**):

$$s_{X/Y}(j) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I e_{i,j}^2}{I-2}} \quad \text{para } j = 1,2,\dots,J \quad (19)$$

La elección de $I-2$ como el número de grados de libertad (DF), es ciertamente, una decisión algo controvertida. Se han realizado numerosas propuestas para definir, por ejemplo el número de grados de libertad para métodos de calibración por *PLS*, pero en realidad no existe una conclusión definitiva^{12, 13}.

¹² H. Van der Voet, *Pseudo-degrees of freedom for complex predictive models: the example of partial least squares*; J. Chemometrics, 1999, 13, 195-208.

¹³ R. G. Brereton, *Introduction to multivariate calibration in analytical chemistry*; Analyst, 2000, 125, 2125-2154.

Una de estas propuestas propone lo siguiente¹⁴:

$$DF = I - (LV + 1) \quad (20)$$

siendo (LV) el número de variables latentes óptimo seleccionado para la construcción del modelo.

La expresión matemática de la **ecuación 20** hace prácticamente irrelevante pequeños cambios en el número de grados de libertad seleccionados. Esto puede comprobarse fácilmente teniendo en cuenta que de las **ecuaciones 16** y **20** se deduce que:

$$\hat{c}_{LOD} \approx \text{función} \left(\frac{1}{\sqrt{DF}} \right) \approx \text{función} \left(\frac{1}{\sqrt{I - (LV + 1)}} \right) \quad (21)$$

En esta ecuación, la concentración del límite de detección, \hat{c}_{LOD} , depende del número de muestras empleadas en la calibración (I) y del número de variables latentes óptimo seleccionado para la construcción del modelo (LV). Cuando el número de muestras empleadas para la calibración no es demasiado bajo (por ejemplo más de 20), no se aprecia un cambio importante en \hat{c}_{LOD} a menos que el número de LV s se aumente hasta un número muy alto (10 o más) lo cual no es muy frecuente en la práctica analítica habitual.

En este caso se han seleccionado un número de grados de libertad $DF = I - 2$ considerando que la desviación estándar calculada para cada variable (**Ecuación 19**) podría adoptar la misma expresión que para el caso univariante (**Ecuación 6**).

Se podrían tomar las mismas consideraciones para diferentes algoritmos tales como la regresión por componentes principales (PCR) o por ($PLS2$), y de este modo deducir una estimación del límite de detección para estos casos de forma similar. Todos ellos son modelos con unas ecuaciones (**Ecuaciones 7-10**) expresadas por los coeficientes de regresión \mathbf{b} (\mathbf{B} en su forma matricial), a partir de los cuales se computan los valores de \mathbf{Y} predichos. Para todos ellos se computan los residuales \mathbf{E} como la diferencia entre las señales reales predichas y las reales.

¹⁴ M. Felipe-Sotelo, M. J. Cal-Prieto, J. Ferré, R. Boqué, J. M. Andrade, A. Carlosena, *Linear PLS regression to cope with interferences of major concomitants in the determination of antimony by ETAAS*; J. Anal. At. Spectrom., 2006, 21, 61-68.

3. EXPERIMENTAL

3.1. Reactivos

Todos los reactivos que se han utilizado son de calidad analítica, y no se les realizó ningún tratamiento. Para realizar disoluciones se empleó agua bidestilada. Las disoluciones de bentazona y fenamifhos (10^{-4} mol l^{-1}) empleadas en el sistema de inyección secuencial (SIA) se prepararon a partir de las sustancias sólidas (calidad Pestanal®, Riedel-de Haën, Seelze, Germany). Las disoluciones para la reacción de Fenton se prepararon y se utilizaron tal y como se ha establecido en el primer capítulo de esta memoria.

3.2. Instrumentación

Para el montaje del sistema de inyección secuencial, se utilizó la instrumentación que se detalla esquemáticamente en la **Figura 2**: Una multibureta 4S y una válvula de selección VA 1+1 de la casa Crison, (Alella, Spain), y un espectrofotómetro de diodos, Hewlett Packard (Avondale, PA, USA) HP 8452A, con una cubeta de flujo de 1 cm de paso óptico, termostatazada a 25 °C mediante un accesorio de control de temperatura, HP 89090A. Dos ordenadores son los que controlaban el sistema SIA y el espectrofotómetro respectivamente. Para el sistema químico utilizado en la reacción de Fenton, la instrumentación empleada se describe en el primer capítulo de esta memoria.

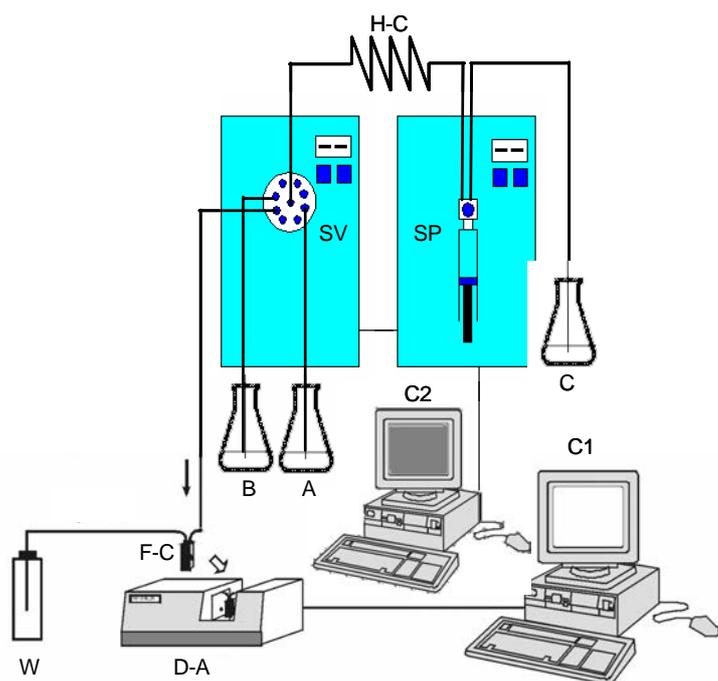


Fig.2: Esquema del sistema de inyección secuencial. Los tubos utilizados son de teflón de un diámetro interno de 0.8 mm, exceptuando los empleados para la carga del portador, que en ese caso eran de 1.5 mm.

A, Disolución de bentazona;
 B, disolución de fenamifhos;
 C, portador; C1 y C2, ordenadores;
 D-A, espectrofotómetro de diodos;
 F-C, cubeta de flujo;
 H-C, bucle de almacenaje;
 S-P, modulo multibureta (bomba de jeringa);
 SV, 8 válvula de selección;
 W, desecho.

3.3. Programas y procesado de datos.

- Los datos simulados utilizados en fluorescencia (ruido incluido) se obtuvieron de un modelo de fluorímetro virtual e interactivo, ejecutado bajo el entorno del programa WingZ, disponible gratuitamente¹⁵. El modelo permite cambiar varias de las condiciones experimentales (longitudes de onda, ganancias, etc), seleccionar la cubeta que contiene el blanco o bien una muestra, fijar diferentes concentraciones de los analitos, elegir el tipo de espectro de salida (excitación, emisión síncrono), etc. La **Figura 3** muestra una página típica del espectro síncrono que se obtiene por simulación para diferentes mezclas de dos compuestos (A y B) que muestran señal fluorescente.

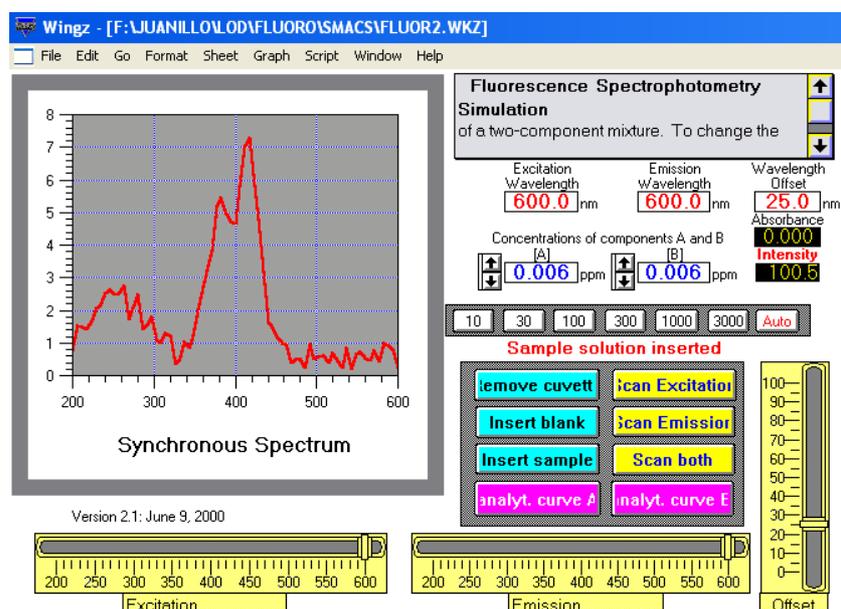


Fig. 3: Panel virtual de un espectrofluorímetro simulado. Se trata de una aplicación de la hoja de cálculo WingZ. Desde aquí se pueden cambiar las concentraciones de los analitos A y B, así como las condiciones de la adquisición del espectro.

- El algoritmo de Resolución de curvas multivariadas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) también se puede obtener libre de cargos¹⁶. Esta aplicación se ejecuta a modo de *Toolbox* bajo el entorno de Matlab® (The MathWorks, Natick, Massachusetts).

¹⁵ Thomas C. O'Haver, *Interactive Computer Models for Analytical Chemistry Instruction*; <http://www.wam.umd.edu/~toh/models/> (página revisada en 2010)

¹⁶ Romà Tauler, Anna de Juan, *Multivariate curve resolution homepage*: <http://www.ub.edu/mcr/welcome.html> (página revisada en 2010).

- El cálculo de la Señal Analítica Neta (NAS) se realiza de acuerdo a un método previamente establecido^{17,18}. La operación del cálculo tanto del vector *Señal Analítica Neta* como de su escalar, se realiza bajo la función “*figmerit*” integrada en el *PLS_Toolbox* (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, Washington, USA), ejecutado bajo el entorno de Matlab[®]. De aquí se obtiene el escalar NAS, que es la *norma*^{19,20} del vector *Señal Analítica Neta*, y de la representación del NAS frente a la concentración puesta, el límite de detección.

- Los datos de infrarrojo cercano (*nir_data*) utilizados para este trabajo consisten en un set disponible como ejemplo dentro del mismo *PLS_Toolbox* (Eigenvector Research, Inc., Wenatchee, Washington, USA).

A menos que se indique, el modelo de calibración empleado fue PLS, aunque en algún caso se utilizaron PCR o PLS2.

Todo el funcionamiento y control del sistema de inyección secuencial se realizó mediante el programa *Autoanalysis* (Sciware SL, Palma de Mallorca, Spain).

Los datos simulados o experimentales se trataron con el programa *The Unscrambler versión 9.6* (Camo A/S, Trondheim, Norway), el cual permite la construcción de los modelos de calibración mediante los algoritmos PLS, PCR, PLS2, etc, y su posterior aplicación a nuevas muestras, así como el pretratamiento de los datos, obtención de gráficos, etc.

El preprocesado de los datos se indica en cada caso. El método de validación empleado para la construcción de los modelos de regresión, fue el de validación cruzada completa (dejando cada vez una muestra fuera). El número de variables latentes (LVs) óptimo seleccionado se escogió de acuerdo un método anteriormente establecido²¹. Éste consiste en que una vez que el modelo se ha construido empleando un grupo de muestras de calibración, se aplica el mismo a un nuevo grupo de muestras de

¹⁷ R. Bro and C.M. Andersen, *Theory of net analyte signal vectors in inverse regression*; J. Chemometrics, 2003, 17, 646-652.

¹⁸ N. M. Faber; *Efficient Computation of Net Analyte Signal Vector in Inverse Multivariate Calibration Models*; Anal. Chem., 1998, 70, 5108-5110.

¹⁹ El operador norma de un vector v (escrito como $|v|$ ó $\|v\|$) determina la longitud del vector bajo consideración desde el punto de vista de la geometría euclídeana.

²⁰ Ion Zaballa Tejada; *Normas de vectores y matrices; Análisis Matricial Aplicado (Matemáticas)Tema 2*; http://www.ehu.es/izaballa/Ana_Matr/Apuntes/lec2.pdf (visto en 2010).

²¹ M. Haaland and E.V. Thomas, *Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information*; Anal. Chem., 1988, 60, 1193-1202.

predicción, utilizando un número diferente de variables latentes, y se calcula el error medio de predicción en cada caso; Se escoge el menor número de LVs para el cual el error medio no difiera significativamente del valor mínimo, de acuerdo a una prueba-*F* con una probabilidad $P=0.25$.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4.1. NIR data:

El archivo de datos está formado por espectros de infrarrojo cercano (Figura 4) de muestras de pseudo-gasolina, tomados por dos aparatos distintos (instrumentos 1 y 2), que dan las señales correspondientes a 5 analitos en cada muestra. En este caso únicamente se emplearán los datos correspondientes al Instrumento 1, y la concentración correspondiente al primero de los analitos (figura 4).

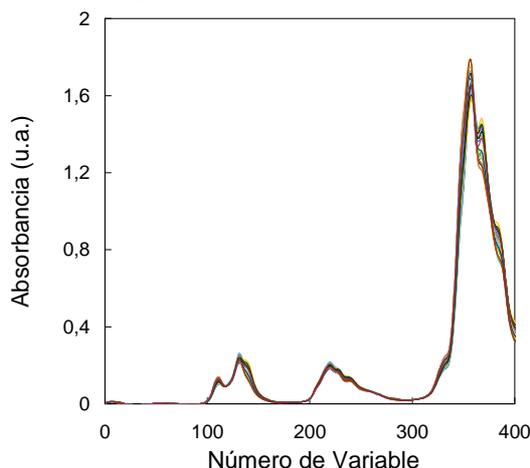


Fig. 4: Espectros NIR de muestras de pseudo-gasolina adquiridas mediante el Instrumento 1.

Se construyó el modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales considerando únicamente el primero de los analitos (de un total de 5). Los datos no se sometieron a ningún tipo de preprocesado, y como método de validación se utilizó la validación cruzada completa (dejando cada vez una muestra fuera). Se escogieron 5 Variables Latentes (LV) (Figura 5).

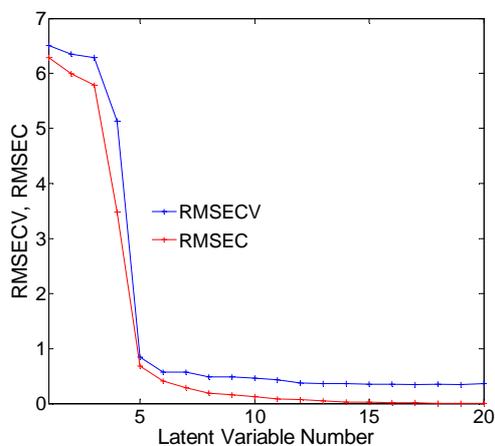


Fig. 5. Curvas de los errores cuadráticos medios de calibración (RMSEC) y de validación cruzada (RMSECV) del modelo construido.

Una vez construido el modelo, a partir de los residuales de cada una de las muestras (Figura 6.a), se construyó el vector s_{XY} (Figura 6.b) según la ecuación 19. No se calculó el vector desviación estándar del blanco (Ecuación 17), dado que no se cuenta con medidas repetidas del blanco.

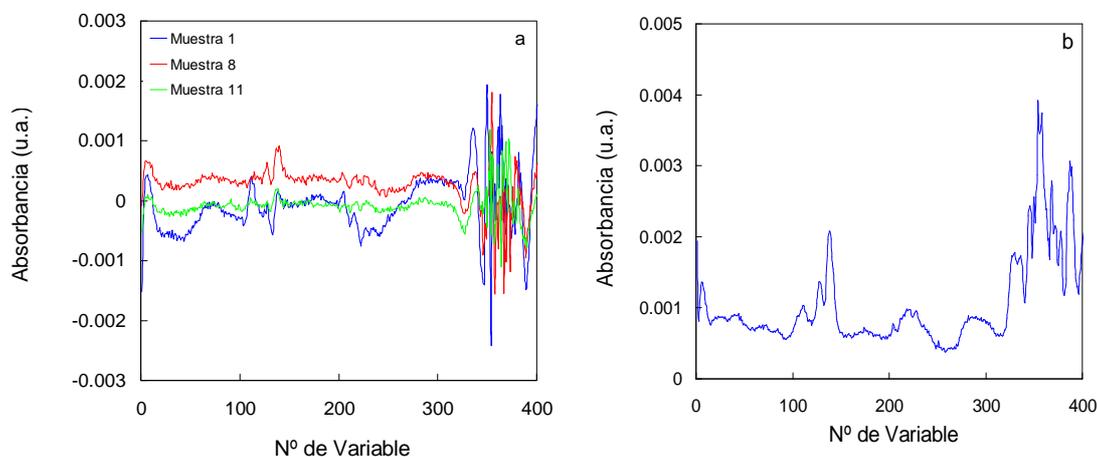


Fig. 6. a) Residuales de algunas de las muestras de calibración, seleccionando 5 LV. b) Vector $3s_{XY}$ calculado según la ecuación 19, a partir de los residuales.

Del mismo modo, y como ya se había comentado antes, se pueden calcular los límites de detección utilizando otros métodos de regresión, como por ejemplo la regresión por componentes principales (PCR). Se presentan los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1: Valores encontrados para el L.O.D. obtenido aplicando las diferentes propuestas que se han comentado anteriormente para el grupo de datos “nir_data”. Las concentraciones se dan en unidades arbitrarias.

	s_{XY}	N.A.S.	$s_{r/c}$ ^a
PLSR ^b	1.5	2.1	2.1
PCR ^c	0.8	1.4	1.4

^a Desviación estándar de la regresión de la representación hallado vs. puesto.

^b Modelo de regresión por PLS. Datos no preprocesados. Nº LV = 5.

^c Modelo de regresión PCR. Datos no preprocesados. Nº PC = 6.

El valor del límite de detección obtenido (Tabla 1) de acuerdo a la Ecuación 16, es en este caso similar, aunque ligeramente inferior, al que se puede obtener aplicando otros métodos como el de la representación hallado frente a puesto ($s_{r/c}$) o la Señal Analítica Neta (Anexo IV-1).

4.2. Datos simulados de fluorescencia:

Los niveles de concentración para ambas especies fueron fijados arbitrariamente entre 0.002 y 0.010 ppm. El grupo completo de 33 muestras (que incluyen 8 replicados) se dividió siguiendo un estricto criterio geométrico en dos sub-grupos, uno para calibración (17 muestras incluyendo 4 replicados) y otro para validación (16 muestras incluyendo 4 replicados) (Figura 7). Además se adquirieron 20 espectros del blanco, es decir en ausencia de ambas especies.

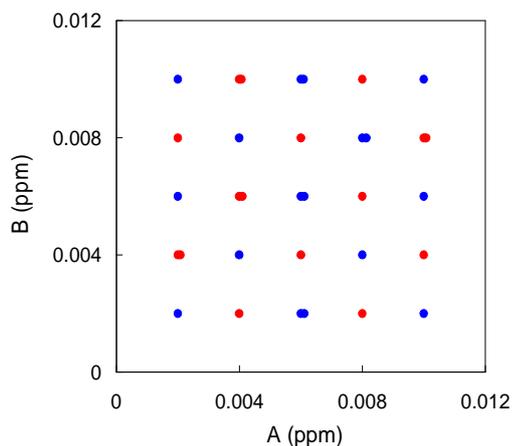


Fig. 7 Matriz de concentraciones y distribución geométrica de los grupos de: ● Calibración, y ● validación.

En la Figura 8.a se pueden ver unos espectros síncronos típicos simulados para dos especies (A y B) junto con el espectro adquirido cuando se mezclan ambas (Figura 8.b). En este caso las concentraciones de A y B son 0.006 ppm. En todos los casos se ha añadido una función de ruido en la lectura debida al ruido de disparo (*photon noise*), que se puede observar en la adquisición del blanco (Figura 8.b).

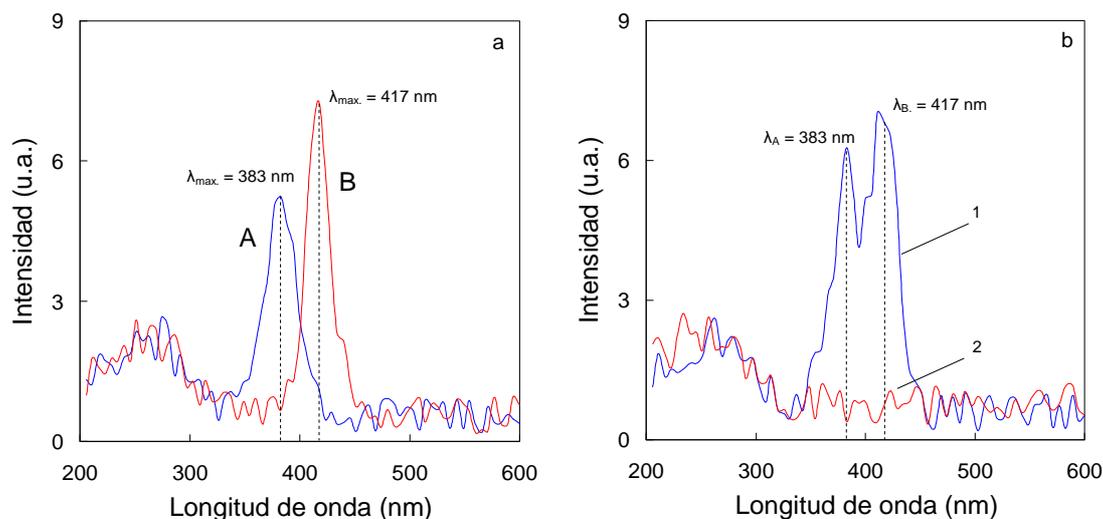


Fig. 8. (a) Espectros síncronos simulados de los fluoróforos A y B, adquiridos mediante el programa WingZ. Las líneas punteadas corresponden a los máximos de intensidad de ambas especies. b) Espectros simulados (1) de la mezcla de ambos fluoróforos a concentración de 0.006 ppm; y (2) blanco.

Los espectros individuales de ambas especies, están ligeramente solapados, pero aun pueden utilizarse los máximos de intensidad (383 nm para A y 417 nm para B), para la cuantificación de los dos analitos por métodos univariantes, sin interferirse demasiado entre ellos. Bajo estas premisas, podría obtenerse el límite de detección utilizando el método univariante clásico, es decir a partir de la representación de la intensidad vs. concentración (**Anexo IV-2**). Asimismo se realizan modelos de regresión por PCR, PLS y PLS2 para ambas especies, y se calculan los límites de detección de esos modelos empleando para ello, tanto la propuesta aquí descrita como otras anteriormente establecidas^{3,22, 23}.

Los resultados obtenidos para los diferentes modelos de calibración realizados, y sus correspondientes límites de detección hallados se encuentran en la siguiente tabla (**Tabla 2**). Siempre que el modelo de regresión fue multivariable, únicamente se utilizaron los datos de intensidad de fluorescencia comprendidos entre 320 y 480 nm.

²² C. D. Brown; *Discordance between Net Analyte Signal Theory and Practical Multivariate Calibration*; Anal. Chem., 2004, **76**, 4364-4373.

²³ A.C. Olivieri; *A simple approach to uncertainty propagation in preprocessed multivariate calibration*; J. Chemometrics, 2002, **16**, 207-217.

Tabla 2: Resultados obtenidos para el Límite de Detección, calculado por distintos métodos para los diferentes modelos de regresión propuestos para ambas especies (A y B). Todos los valores se dan en sus unidades originales (ppm x 10³).

	Analito	Nueva Propuesta		Referencia (otras propuestas)		
		$s_{X/Y}$	s_{blanco}	$NAS_{r/c}$	$s_{r/c}$	s_{blanco}
Clásico ^a	A	-	-	-	1.4	0.97
	B	-	-	-	1.4	0.63
PCR ^b	A	1.5	1.1	0.77	0.77 ^c	0.48 ^d
	B	1.2	0.79	0.61	0.61 ^c	0.32 ^d
PLS ^e	A	1.5	1.1	0.76	0.76 ^c	0.48 ^d
	B	1.2	0.79	0.60	0.60 ^c	0.32 ^d
PLS2 ^f	A	1.5	1.1	0.76	0.76 ^c	0.48 ^d
	B	1.2	0.79	0.61	0.61 ^c	0.32 ^d

^a Modelo de regresión clásico en el que se utilizan las intensidades de fluorescencia a las λ de intensidad del máximo de cada especie frente a su concentración. También se dan los *L.O.D.* obtenidos al utilizar los datos de la regresión ($s_{r/c}$), así como repetidas medidas del blanco (s_{blanco}).

^b Modelos de regresión por componentes principales para ambas especies (A y B) en presencia de la otra. En ambos casos se seleccionaron 2 PC. Datos centrados y no escalados entre 320 y 480 nm.

^c Límite de detección calculado a partir de la desviación estándar de la regresión de la recta (*Hallado vs. Puesto*).

^d Límite de detección calculado a partir de la desviación estándar del blanco estimada a partir de repeticiones del blanco (según los modelos).

^e Modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales para ambas especies (A y B) en presencia una de la otra. Para ambos analitos se seleccionaron 2 variables latentes (L.V.). Datos centrados y no escalados entre 320 y 480 nm.

^f Modelo de regresión por PLS2 para ambas especies a la vez. Se seleccionaron 2 L.V. para ambas especies. Datos centrados y no escalados entre 320 y 480 nm.

A la vista de los resultados se puede destacar cómo el límite de detección multivariante calculado por los métodos de referencia considerados en esta memoria es siempre más bajo que el obtenido por el método propuesto. Los límites de detección calculados mediante la nueva propuesta que se da en esta memoria sin embargo son más parecidos entre si. Tal y como se mencionó al inicio de este capítulo, el límite de detección calculado a partir de medidas repetidas de la señal del blanco es siempre más bajo, se aplique la metodología que se aplique.

4.3. Datos de Inyección Secuencial:

Mediante el sistema SIA mostrado en la **Figura 2**, se obtuvieron los perfiles de elución no resueltos de dos pesticidas (Bentazona y Fenamiphos) con espectros de UV bastante solapados. La señal resultante es similar a la obtenida como señal de un cromatograma con detector de diodos, en el que se eluyen dos especies no resueltas. (**Figura 9**).

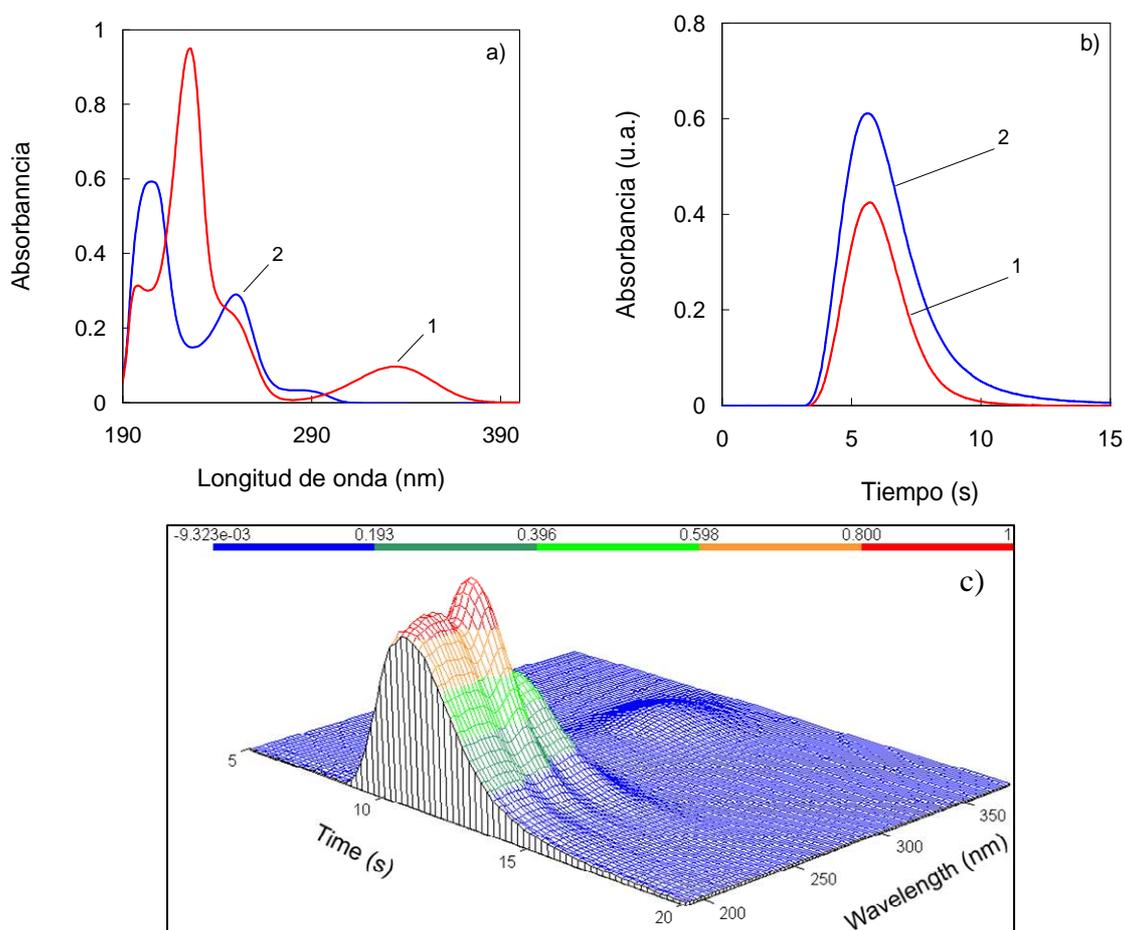


Fig. 9. Mezcla de los pesticidas Bentazona (1) y Fenamiphos (2) en concentración de $2 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$ mediante el sistema SIA anteriormente comentado. a) Espectros de las especies individuales; b) Perfiles de elución recuperados de ambas especies individualmente; c) Respuesta tridimensional del espectrofotómetro de diodos cuando ambas especies son inyectadas mediante el sistema SIA descrito hacia el detector.

Para los tratamientos quimiométricos se emplearon los datos de absorbancia entre 190 y 270 nm, cada 2 nm, y entre 8 y 16.8 s, cada 0.2 s. Los datos obtenidos se vectorizaron consiguiendo así un único vector de datos por experimento.

La matriz de muestras se dividió en dos grupos, siguiendo únicamente un criterio geométrico: 13 de las muestras serán para calibración y 12 para validación (**Figura 10**).

Las concentraciones iniciales de Bentazona fueron 1, 3, 5, 6.7 y 7 x 10⁻⁵ mol l⁻¹ y las de Fenamiphos 1, 3, 5, 7 y 9 x 10⁻⁵ mol l⁻¹ (disoluciones acuosas). Las mezclas se obtuvieron cargando secuencialmente en el sistema 70 µl de cada pesticida en concentración adecuada, y después inyectándolas hacia el detector a una velocidad de 7.5 ml min⁻¹.

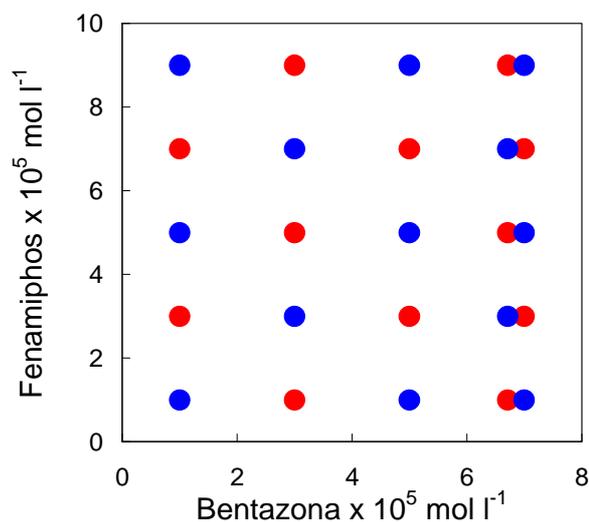


Fig. 10: Matriz de concentraciones y distribución geométrica de los grupos de: • Calibración, y • validación.

Para aplicar el método de estimación clásico del Límite de Detección, se podría emplear una longitud de onda a la que solo absorba una de las especies. A 340 nm, por ejemplo, solo absorbe la Bentazona, pero para justificar el ejemplo se empleará únicamente la región espectral a la que ambas especies se encuentran solapadas, entre 190 y 270nm. Por lo tanto las señales deberían ser resueltas antes de poder aplicar el citado método clásico. Para estos casos, en los que resulta complicada la estimación de un límite de detección univariante clásico, se han propuesto algunas herramientas quimiométricas muy efectivas, que permiten extraer la señal correspondiente a cada analito individual. Entre otras, se han utilizado algoritmos tales como MCR-ALS²⁴ o Quantitative Iterative Target Transformation Factor Analysis (QITTFA)²⁵.

En esta memoria se ha empleado el MCR-ALS para la obtención de una señal subrogada para cada componente: el perfil individual de cada componente al cruzar el detector. Como señal analítica se toma el área bajo ese perfil, en función de la

²⁴ Romà Tauler and Damià Barceló; *Multivariate curve resolution applied to liquid chromatography—diode array detection*; Trends. Anal. Chem, 1993, 12, 319-327)

²⁵ Selena E. Richards and Anthony D. Walmsley; *Quantitative iterative target transformation factor analysis*; J. Chemometr. 22 (1), 2008, 63-80.

concentración, para obtener una recta de calibración de la que se puede estimar un Límite de Detección clásico para cada analito, como han hecho otras veces²⁶.

Para aplicar MCR-ALS, se colocan todas las muestras de calibración unidas una seguida de otra en la dirección del tiempo, (Column-wise augmented) (Figura 11). Como estimación inicial se toman los espectros individuales de cada especie, y se aplica el algoritmo sin ningún tipo de restricción (a modo de caja negra). Una vez realizado el modelo, se aplica a las señales medidas de los blancos, y se obtienen para todas las muestras (calibración y blancos), sus perfiles (Anexo IV-3), y por tanto sus áreas. Al representar el área recuperada frente a la concentración puesta se obtiene la recta de calibrado para cada especie, y de la desviación de la regresión ($s_{r/c}$), los Límites de Detección. Tomando la desviación de los valores de las áreas obtenidas para los blancos (s_{blanco}) y llevando ésta a las rectas, se pueden obtener de otro modo la estimación de los límites de detección (Tabla 3).

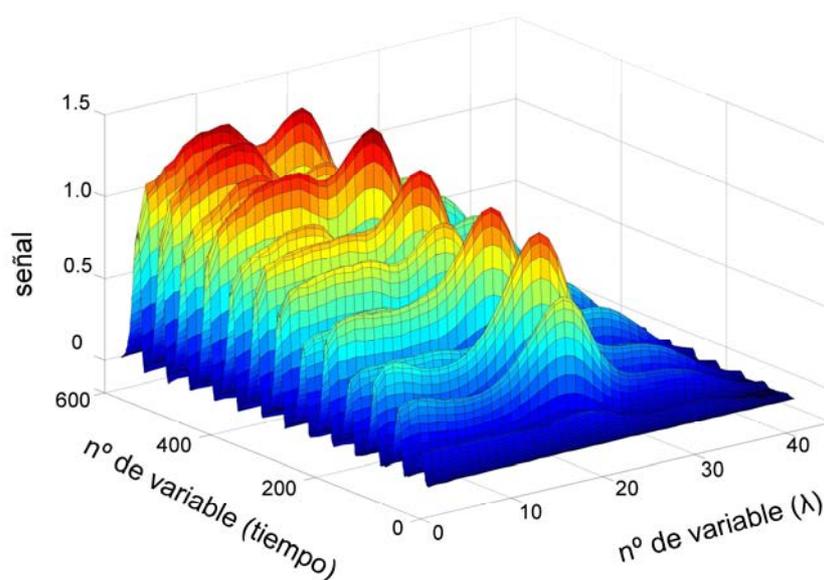


Fig. 11. Matriz aumentada compuesta por las señales de las muestras de calibración colocadas una detrás de otra, en la dirección del tiempo.

Previamente a realizar los modelos de calibración multivariable por PCR, PLS y PLS2, los datos de cada una de las muestras son vectorizados; es decir, se colocan los espectros adquiridos a cada tiempo uno a continuación de otro, de este modo se obtiene un vector para cada una de las muestras de calibración. Una vez optimizados los diferentes modelos (se elige el número óptimo de componentes principales, o variables

²⁶ J. Saurina, C. Leal, R. Compañó, M. Granados, M. D. Prat, R. Tauler; *Estimation of figures of merit using univariate statistics for quantitative second-order multivariate curve resolution*; *Analytica Chimica Acta* 432 (2001) 241–251.

latentes), se calculan los límites de detección correspondientes a cada una de las especies (Bentazona y Fenamiphos) mediante las diferentes propuestas ya comentadas anteriormente (**Tabla 3**).

Tabla 3: Resultados obtenidos para el Límite de Detección, calculado por distintos métodos para los diferentes modelos de regresión propuestos para ambas especies (Bentazona y Fenamiphos).

		Nueva Propuesta		Referencia (otras propuestas)		
		$S_{X/Y}$	S_{blanco}	$NAS_{r/c}$	$S_{r/c}$	S_{blanco}
MCR-ALS ^a	Bentazona	-	-	-	4.6	0.56
	Fenamiphos	-	-	-	6.4	1.2
PCR ^b	Bentazona (4 L.V.)	0.46	0.10	3.3	3.3 ^c	0.21 ^d
	Fenamiphos (5 L.V.)	2.1	0.87	2.8	2.8 ^c	0.86 ^d
PLS ^e	Bentazona (3 L.V.)	4.5	0.064	4.0	4.0 ^c	0.21 ^d
	Fenamiphos (4 L.V.)	4.6	0.77	2.7	2.7 ^c	0.81 ^d
PLS2 ^f	Bentazona (3 L.V.)	4.2	0.060	4.1	4.1 ^c	0.20 ^d
	Fenamiphos (3 L.V.)	4.4	1.0	5.6	5.6 ^c	0.74 ^d

^a Modelo de regresión clásico en el que se utiliza como señal el área bajo el perfil de concentración recuperado al aplicar un modelo de MCR-ALS, sin restricciones, a las señales originales. Se dan los *L.O.D.* obtenidos al utilizar los datos de la regresión ($s_{r/c}$), así como repetidas medidas del blanco (s_{blanco}).

^b Modelos de regresión por componentes principales para ambas especies (Bentazona y Fenamiphos) en presencia de la otra. Datos centrados y no escalados. Validación cruzada completa (leave one out).

^c Límite de detección calculado a partir de la desviación estándar de la regresión de la recta (*Hallado vs. Puesto*).

^d Límite de detección calculado a partir de la desviación estándar del blanco estimada a partir de la predicción (según los modelos) de repeticiones del blanco, y llevada a la recta de regresión.

^e Modelos de regresión por mínimos cuadrados parciales para ambas especies (Bentazona y Fenamiphos) en presencia de la otra. Datos centrados y no escalados. Validación cruzada completa (leave one out).

^f Modelo de regresión por PLS2 para ambas especies a la vez. Se seleccionaron 3 L.V. para ambas especies. Datos centrados y no escalados. Validación cruzada completa (leave one out).

No se han dado resultados del límite de detección calculado por la nueva propuesta para MCR-ALS dado que este algoritmo por definición no es propiamente un modelo de calibración, sino más bien de descomposición de datos²⁷. Cuando se aplicó PLS2 para modelar ambos analitos a la vez, no hay apenas diferencias entre las distintas propuestas. Destacan los bajos valores que se obtienen al utilizar medidas repetidas del blanco para la estimación del límite de detección y sobre todo en el caso de la Bentazona; Quizá esto sea consecuencia de la metodología utilizada para la obtención de los datos y es que la técnica de flujo secuencial (SI) es capaz de reproducir eventos con una precisión muy alta.

²⁷ Anna de Juan, Romà Tauler; *Multivariate Curve Resolution (MCR) from 2000: Progress in Concepts and Applications*; Crit. Rev. Anal. Chem. 36 (2006), 163–176.

4.4. Datos de la reacción de Fenton

La oxidación de algunos pesticidas por medio del reactivo de Fenton ya se ha utilizado en esta memoria con fines analíticos (comentado en el primer capítulo). Estas reacciones fueron seguidas mediante espectroscopía de UV, y se les aplicó la metodología de análisis cinético.

El grupo de datos utilizados corresponde a los conjuntos designados en el primer capítulo de esta memoria como “muestras sintéticas” y “muestras de agua”. En resumen, el procedimiento consiste en la mezcla de ácido sulfúrico, uno o más pesticidas, Fe^{2+} y H_2O_2 . El último reactivo (H_2O_2), hace comenzar la reacción, que se sigue a 25 °C, cada 4 nm, y cada 5 s durante 300 s mediante un espectrofotómetro de diodos. La respuesta experimental cinética obtenida de un espectrofotómetro de diodos es conceptualmente similar a aquella que se puede obtener en sistemas de cromatografía con detector de diodos (HPLC-DAD), es decir, datos de segundo orden, y por tanto pueden manejarse de forma similar. En la siguiente figura se ve una respuesta típica del sistema FR-Atrazina (Figura 12).

Estos datos de segundo orden se vectorizan (de igual modo que los datos de inyección secuencial) con el propósito de ser tratados mediante el algoritmo PLS.

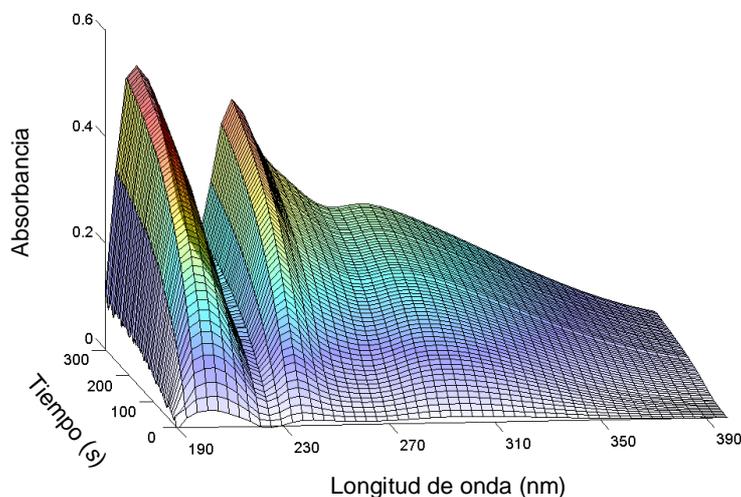


Fig. 12. Datos típicos de segundo orden correspondientes a la evolución del espectro en una mezcla de reacción que contiene Reactivo de Fenton y Atrazina $4.17 \times 10^{-5} \text{ mol l}^{-1}$.

Igual que para el caso del sistema de inyección secuencial, para este sistema se podría encontrar un modo de realizar un calibrado univariante clásico, que bien pudiera haber sido el de las velocidades iniciales, el valor de la absorbancia a cierta longitud de onda a un tiempo fijo...etc. pero como ya se comentó (**Capítulo 1**) no se encontró ninguna forma de obtener con éxito esa señal “subrogada”.

Por lo tanto, en este caso se utilizarán los calibrados que ya se realizaron en el primer capítulo de esta memoria para el cálculo del LOD, y se compararán con los valores del LOD obtenidos mediante la representación “hallado vs. puesto”³ y también con los obtenidos mediante la señal analítica neta (NAS). En todos los casos se emplearán exactamente los mismos calibrados multivariados y en las mismas condiciones que se obtuvieron en el primer capítulo de la presente memoria, por lo que los valores que se obtienen del límite de detección, bien pueden considerarse como una ampliación de los resultados en aquellos casos.

Para calcular el límite de detección mediante la propuesta que se describe en esta memoria, se hace uso de los residuales de las muestras de calibración una vez hecho el modelo y con ellas se define el vector $3s_{XY}$ (Ecuación 19). En la (Figura 13) se puede ver una representación en 3D de los valores $3s_{XY}(j)$ obtenidos. A su vez, también se calcula el L.O.D. mediante la desviación estándar de medidas repetidas del blanco s_{blanco} (Ecuación 17). Los resultados también aparecen en la Tabla 4.

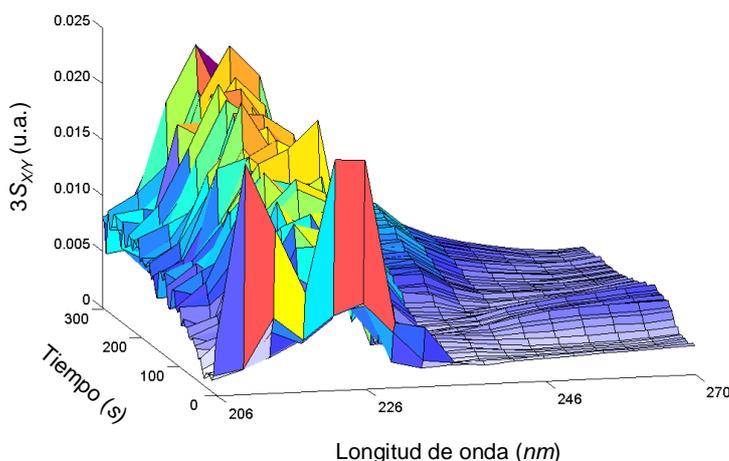


Fig. 13. Reconposición en matriz del vector $3s_{XY}$ calculado para el sistema Fenton-Atrazina (sintética).

Otra de las aplicaciones que se le dio al reactivo de Fenton (FR) fue la resolución de mezclas binarias de pesticidas (Atrazina + Alacloro y Atrazina + Bentazona). En ambos casos se consigue la determinación individual de cada uno de los componentes de la mezcla, en presencia del otro como interferente, y el método se aplica a la determinación de ambas sustancias activas en pesticidas comerciales. Pueden tomarse los residuales e_i para todas las (I) muestras de calibración, y construir los vectores s_{XY} para cada pesticida y cada mezcla mediante la ecuación 19 (Anexos IV-4 y IV-5).

En este caso, no se realizaron medidas repetidas del blanco, por lo que los valores del límite de detección que se toman como referencia son los calculados mediante la representación “*hallado vs. puesto*” y mediante la señal analítica neta (NAS). Las características de los modelos ya se dieron en el **capítulo 1** de la presente memoria. Los resultados obtenidos también se incluyen en la **Tabla 4**.

Por último, se aplica la propuesta descrita en esta memoria para el cálculo del límite de detección en el sistema de la determinación de Atrazina en muestras de agua, con preconcentración previa mediante el reactivo de Fenton. Nuevamente se calculan los límites de detección mediante las otras propuestas ya mencionadas anteriormente, que sirven a modo de comparación (**tabla 4**).

Tabla 4: Valor del Límite de Detección calculado de acuerdo a la propuesta presentada en esta memoria para los distintos modelos de calibrado ya realizados en el **capítulo 1**. Se han calculado los límites de detección para los mismos modelos de acuerdo con otras propuestas ya citadas en la bibliografía (ver texto).

Tipo de datos	Analito	Nueva Propuesta		Referencia (otras propuestas)	
		s_{blank}	$s_{X/Y}$	NAS	$s_{Y/c}$
Determinación individual ^a	Atrazina	0.5×10^{-6}	1.1×10^{-5}	0.38×10^{-5}	0.38×10^{-5}
Mezcla binaria ^b	Atrazina	-	8.3×10^{-6}	5.9×10^{-6}	5.9×10^{-6}
	Bentazona	-	1.4×10^{-6}	2.7×10^{-6}	2.7×10^{-6}
Mezcla binaria ^c	Atrazina	-	8.5×10^{-6}	6.7×10^{-6}	6.7×10^{-6}
	Alacloro	-	1.5×10^{-7}	8.3×10^{-6}	8.3×10^{-6}
Preconcentración ^d	Atrazina	-	3.2×10^{-8}	1.6×10^{-8}	1.6×10^{-8}

^a Determinación individual (PLS) de Atrazina por medio de la reacción de Fenton. Los detalles del modelo se dieron en la sección Resultados y discusión del Capítulo 1, en el apartado Calibración (**Tabla 2**).

^{b,c} Determinaciones individuales (PLS) de distintos pesticidas en mezclas binarias. Los detalles de los modelos se dieron en el Capítulo 1, ^b **Anexo I-11**, y ^c **Anexo I-12**.

^d Determinación individual (PLS) de Atrazina por medio de la reacción de Fenton en distintos tipos de aguas, y con una etapa de preconcentración. Los detalles del modelo se dieron en la sección Resultados y discusión del **Capítulo 1**, en el apartado Determinación de atrazina en aguas (**Tabla 10**).

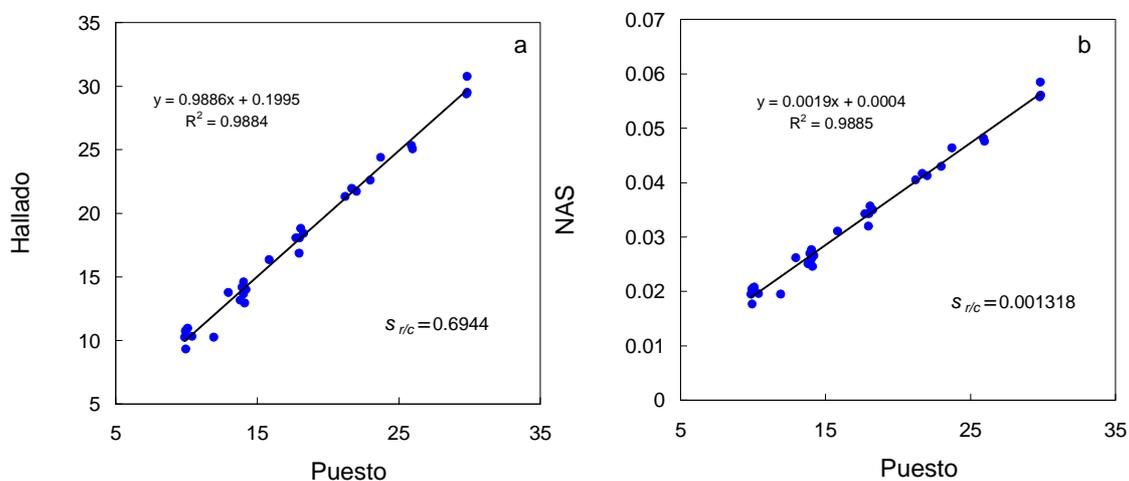
En general los resultados obtenidos mediante las diferentes propuestas son muy similares y teniendo en cuenta que el valor del límite de detección se calcula tras una manipulación de los datos significativa, un factor de 2 entre distintos métodos, en el caso con mayor diferencia, puede considerarse poco representativo. Sin embargo, el valor del límite de detección estimado para el caso del alacloro en la mezcla con atrazina es de más de un orden inferior al de las demás propuestas, resultado éste al que no se le ha encontrado explicación ninguna.

5. CONCLUSIONES

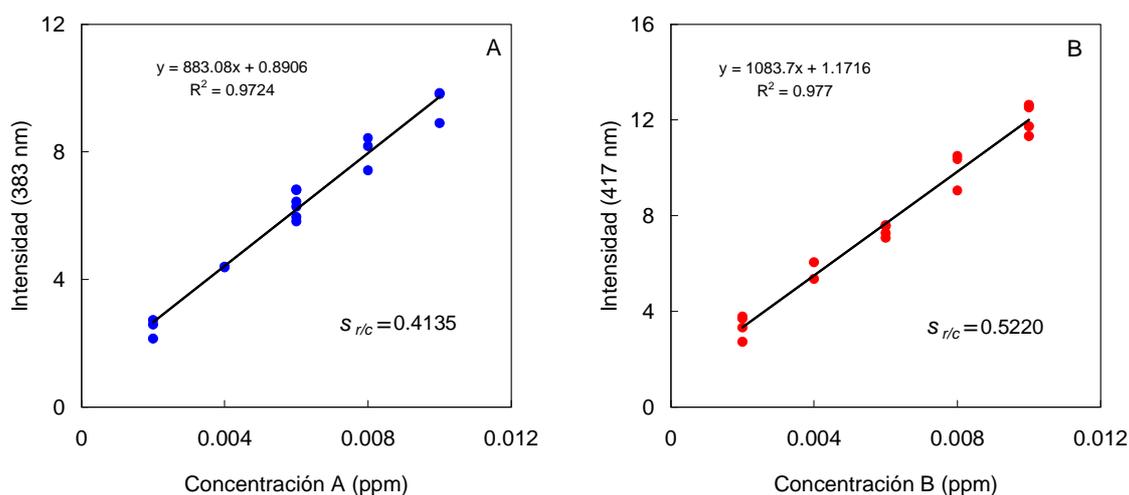
Como conclusión se puede destacar que la metodología de cálculo del Límite de Detección aquí propuesta es fácil de entender como concepto, ya que sigue las premisas de la metodología de la I.U.P.A.C. para la calibración univariante. Su aplicación ya es más compleja y requiere comprender los algoritmos de calibración para los que se determina y el modo de manejar los datos del software utilizado. Contrariamente al resto de los métodos propuestos, aquí se utilizan únicamente los valores experimentales del modelo de calibración para la estimación directa del LOD en lugar de una señal subrogada univariante a la que aplicar la metodología clásica. En muchos casos, los valores del LOD encontrados son similares a los que se calculan mediante los otros métodos anteriormente propuestos, pero en algunos de los casos se pueden encontrar ciertas diferencias relevantes. De forma similar a la calibración univariante, la incertidumbre obtenida por sucesivas medidas del blanco tiende a generar valores inferiores en el cálculo del LOD en comparación con los encontrados al utilizar la incertidumbre proveniente de la propia regresión. Esta metodología se ha aplicado principalmente a la calibración por PLS, pero puede aplicarse perfectamente a otros algoritmos como PCR o PLS2, lo que incita a pensar que pudiera aplicarse a otro tipo de algoritmos como PARAFAC, o incluso algoritmos de órdenes superiores (n-way methods).

Finalmente, la nueva propuesta de cálculo de un límite de detección multivariable nace con la voluntad de servir como motivo de discusión, y sus bondades y deficiencias deberían ser evaluadas en futuras aplicaciones.

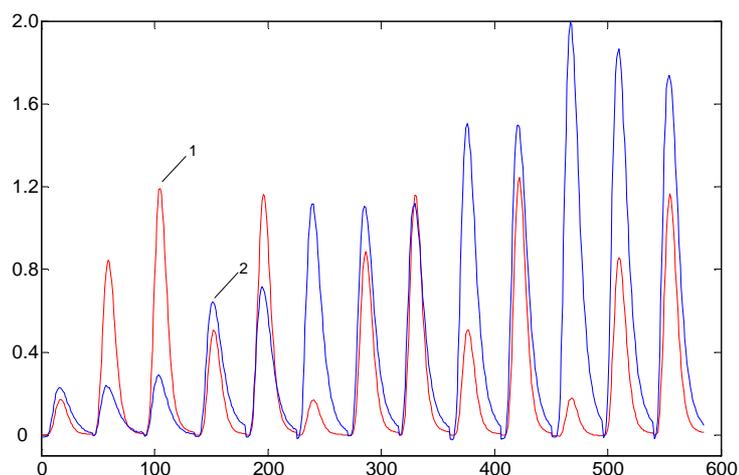
ANEXO IV



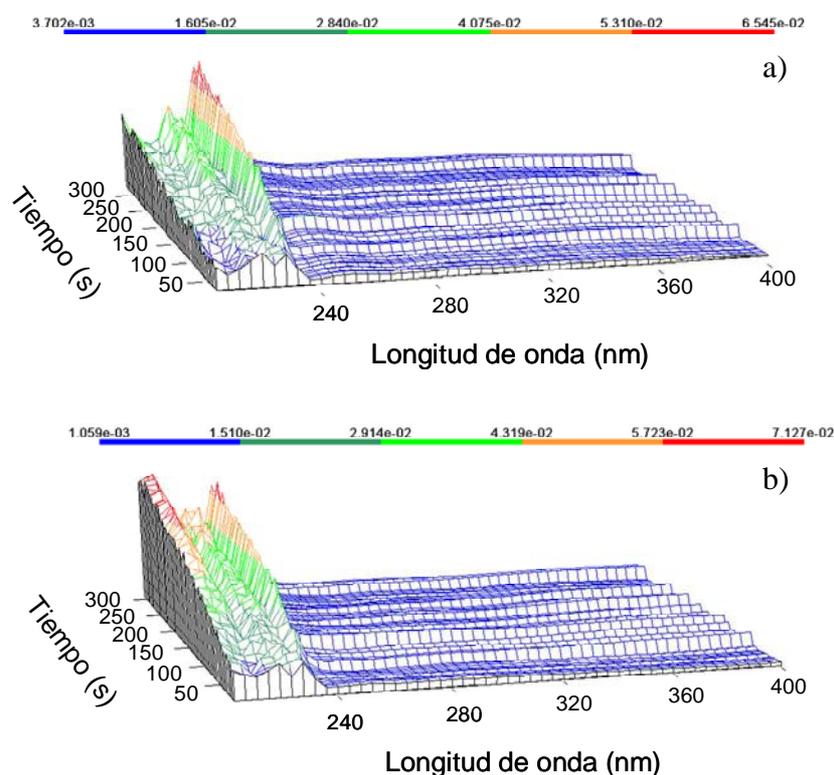
Anexo IV-1) a) Representación de los valores hallados mediante el modelo de PLSR (5 L.V.), frente a los valores de referencia, y ecuación de regresión de la recta. b) Representación de la señal analítica neta obtenida para cada una de las muestras frente a su contenido de referencia y ecuación de la recta.



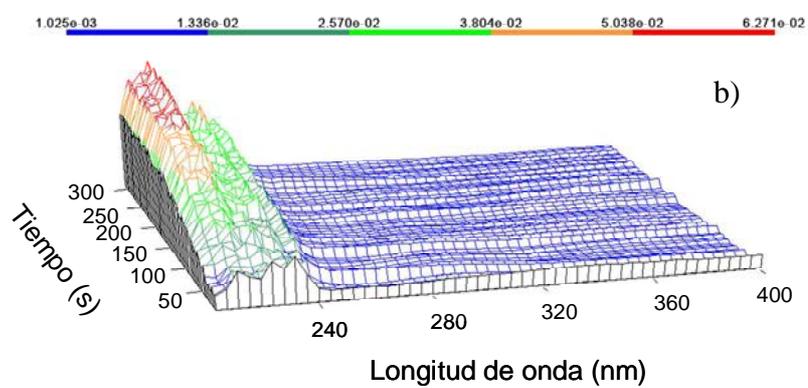
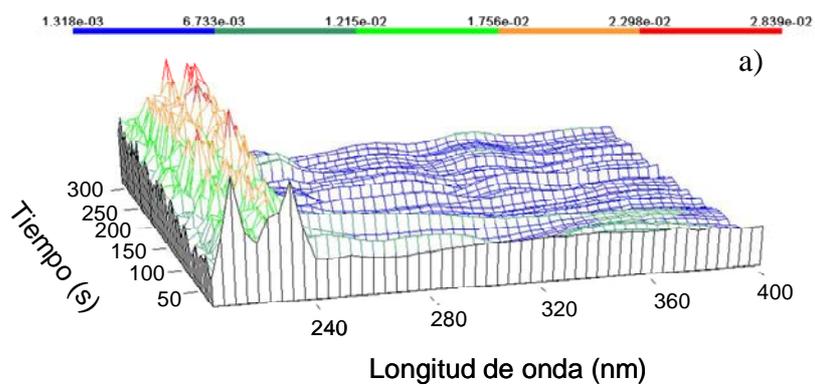
Anexo IV-2): Representación de la intensidad de fluorescencia frente a la concentración puesta de los compuestos A y B a las longitudes de onda de intensidad máxima, A (383 nm) y B (417) respectivamente.



Anexo IV-3) Perfiles de concentración recuperados por el modelo MCR-ALS para las dos especies; 1) Bentazona y 2) Fenamifos, para todas las muestras de calibración (Figura 11). Como parámetro para la calibración univariante clásica se toma el área bajo el perfil correspondiente a cada especie, para cada una de las muestras.



Anexo IV-4) Reconposición en matriz del vector $3s_{XY}$ calculado para los distintos modelos del sistema Fenton-mezcla binaria de pesticidas a) Modelo de la Atrazina en presencia de Alacloro; b) Modelo del Alacloro en presencia de Atrazina;



Anexo IV-5) Reconposición en matriz del vector $3s_{XY}$ calculado para los distintos modelos del sistema Fenton-mezcla binaria de pesticidas a) Modelo de la Atrazina en presencia de Bentazona; b) Modelo de la Bentazona en presencia de Atrazina;

