



Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada

DE MONARDES Y TSWETT A LA BIOANALÍTICA

DISCURSO PARA EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

EXCMO. SR. D.
ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

GRANADA, 2011



Academia de Ciencias Matemáticas,
Físico-Químicas y Naturales de Granada

DE MONARDES Y TSWETT A LA BIOANALÍTICA

DISCURSO PARA EL ACTO DE SU RECEPCIÓN
COMO ACADÉMICO NUMERARIO POR EL

**EXCMO. SR. D.
ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ**

GRANADA, 2011

DE MONARDES Y TSWETT A LA BIOANALÍTICA

ALBERTO FERNÁNDEZ GUTIÉRREZ

Excmo. Señor Presidente
Excmos. e Ilmos. Señores Académicos,
Queridos compañeros y amigos,
Señoras y Señores

Mis primeras palabras no pueden ser más que de sincero y profundo agradecimiento a los miembros de esta Academia, por haberme confiado la responsabilidad de compartir sus tareas como miembro de número. Deseo hacerlo de manera muy especial al Prof. Fernando González Caballero, Presidente de la Academia, por el afecto y consideración que siempre ha tenido conmigo desde que compartimos aulas e ilusiones en la antigua Facultad de Ciencias. Igualmente, quiero expresar mi gratitud al Prof. Gerardo Pardo Sánchez, anterior presidente, en cuyo mandato fui propuesto Académico electo. Doy también las gracias al Prof. Pedro Luis Mateo Alarcón, compañero y amigo, quien ha tenido a bien ser mi padrino en este solemne acto de toma de posesión.

Es un motivo de inmensa satisfacción para mí, formar parte de esta Academia que tiene, entre otros objetivos, el contribuir al fortalecimiento de nuestro entorno científico más inmediato y el de éste con la sociedad mediante la transferencia del conocimiento. Me anima conseguir un mayor acercamiento entre nuestra Academia de Ciencias, la comunidad científica y la sociedad, especialmente la cercana; la vitalidad de aquella debe estar en concordancia con el empuje de éstas. Me ilusiona lograr que este deseo sea una realidad

permanente en nuestra tierra, aunque creo que el camino por recorrer aún es largo; por ello no cabe conformismo alguno.

Podéis estar seguros de que, en lo que a mí concierne, volcaré todo mi entusiasmo y energía en la responsabilidad que ahora asumo, intentando superar mis deficiencias, y velaré por unir, a los mejores servicios de mis compañeros y colegas, los míos propios. Asimismo cuidaré también que el ejercicio cotidiano de mi actuación como científico, y como persona se ajuste a los códigos de ética y de excelencia sobre los que la Academia se funda. De mis maestros, muchos de ellos Académicos, aunque alguno desgraciadamente no, he aprendido que nada hay más productivo que trabajar en equipo siendo consciente de nuestras posibilidades y limitaciones, sin pretender metas imposibles, pero sin carecer por esto de afán de progreso y de aspirar a la utopía.

Hoy es un día muy deseado e importante para mí. Rodeado de ilustres académicos, de nuestras autoridades, de colegas, colaboradores, discípulos, y también de la familia y amigos, y sintiendo igualmente la cercanía de los que no pueden estar, tengo la convicción de que, en algún sentido, con este acto se culmina un largo camino que se inició hace más de cuarenta y cinco años, cuando empecé mi licenciatura en Ciencias Químicas, y fui alumno-ayudante en las prácticas de Química General. A pesar de los muchos momentos difíciles, he podido desarrollar plenamente mi vocación docente, investigadora y de gestión, dando respuesta a los retos y problemas que en cada ocasión han ido surgiendo en cada uno de esos ámbitos, y que han puesto el matiz en el detalle, y el modelado en lo general, a una gratificante e intensa trayectoria vital.

Cuando comencé a considerar cuál podría ser el tema sobre el que versaría este discurso de ingreso tuve dudas acerca de si escribirlo sobre aspectos generales como Ciencia y Sociedad, Investigación y su transferencia, o algo más cercano a nuestras áreas de trabajo como Química Analítica y alimentación saludable, Alimentos funcionales etc., o bien centrarlo en alguna parte, más o menos extensa, de las líneas de trabajo de nuestro grupo de investigación. Así, teniendo en cuenta que las campos que hemos desarrollado, a lo largo de nuestra vida investigadora, están centrados actualmente en: “La luminiscencia molecular y los sensores ópticos aplicados a la solución y control de problemas ambientales, biomédicos, domóticos y alimentarios” y en “El desarrollo de técnicas analíticas separativas avanzadas para el control de extractos vegetales y de alimentos funcionales, especialmente referidas a la caracterización de compuestos bioactivos de interés en nutrición, salud y estudios de metabolómica”, me decidí por no renunciar a ninguna de las líneas, y diseñar este discurso partiendo desde los orígenes de estos campos, recordando con pasión, respeto y agradecimiento, a los que pueden ser considerados como “padres” de los mismos : Nicolás Monardes y Mikhail Tswett. El recorrido histórico, y el desarrollo instrumental actual, lo he querido conducir al ámbito de lo que hoy se conoce con el nombre de Bioanalítica, concretándolo en algunas de nuestras más recientes aportaciones en forma de aplicaciones bioanalíticas.



Nicolás Bautista Monardes (Sevilla, 1493—1588) fue un destacado médico y botánico español que cursó estudios de medicina en la Universidad de Alcalá del siglo XVI.

Escribió bastantes libros de suma importancia para su época, tales como: *Diálogo llamado pharmacodilosis* (1536), *De Secanda Vena in pleuriti Inter Grecos et Arabes Concordia* (1539), *De Rosa et partibus eius* (1540), *Sobre las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales, que sirven al uso de la medicina* (1569), *Tratado de la piedra bezaar, y de la yerva escuerçonera* (1569), *Segunda parte del libro des las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales, que sirven al uso de la medicina; do se trata del tabaco, y de la sassafras, y del carlo sancto, y de otras muchas yervas y plantas, simientes, y licores que agora nuevamente han venido de aquelllas partes, de grandes virtudes y maravillosos efectos* (1571), *Diálogo de las grandezas del hierro, y de sus virtudes medicinales; Tratado de la nieve, y del beuer frío* (1574), *Historia Medicinal* (1580).



Nicolás Monardes

Su obra fue traducida a los más importantes idiomas de la época y tuvo una enorme influencia en la farmacopea del viejo continente durante siglos. Sin embargo no siempre tuvo el reconocimiento merecido, por ejemplo, su nombre no aparece en la obra de biografías "*Grandes científicos de la humanidad*", de Manuel Alfonseca (Espasa; Madrid, 1998).

Para tratar de demostrar su relevancia se pueden aportar las citas siguientes: 1) En "*La ciencia y la técnica en el descubrimiento de América*" (Espasa-Calpe, Colección Austral, Buenos Aires, 1951) nos cuenta el insigne matemático riojano Julio Rey Pastor lo que sigue: "El más famoso de todos los investigadores de las plantas descubiertas en las expediciones por el Nuevo Mundo, que según Paoli merece el nombre de padre de la farmacología, es Nicolás Monardes, médico andaluz, "il primo scienziato che si occupò delle piante medicinali americane". 2) En la presentación de la "Biblioteca de la Cultura Española", dirigida por el también matemático Francisco Vera (M. Aguilar Ed.; Madrid, 1934), se dice de Monardes: "La figura de este médico es, cronológicamente, la primera y una de las más importantes de todas las que cultivaron con más éxito el estudio de las drogas medicinales, que, en su

tiempo, se importaban de América, como lo prueban sus aportaciones al conocimiento de la zarzaparrilla, del guayaco, de la pimienta, de la canela de Indias, del tabaco, del bálsamo de Tolú, etc. 3) El profesor Tschirsch, de Berna en 1933, considera a Monardes como el padre de la farmacognosia, y su museo, formado casi exclusivamente con materiales exóticos, tiene excepcional importancia para la historia de la cultura universal, y ha servido de modelo a los que después se crearon fuera de España". En 1988, el Ayuntamiento de Sevilla reconoció, tardíamente, su figura con una placa cerámica en el lugar donde estuvo ubicado su jardín botánico.

Se atribuye a Nicolás Monardes, por tanto, la introducción y estudio en Europa de numerosas plantas medicinales americanas, cuyas propiedades y aplicaciones investigó y describió extensamente. Sin embargo no quedan aquí sus meritos ya que en su estudio exhaustivo de plantas exóticas, de 1565, observó un tinte azul en el agua contenida en un recipiente fabricado con una clase de madera llamada "lignum nephriticum" o "peregrinum", la coloración azul que muestra a la luz blanca el extracto acuoso de la madera desaparecía en medio ácido. Un comportamiento semejante de la corteza del "aesculus hippocastanum" se observa en 1615: la corteza de castaño en agua origina un líquido incoloro con reflejos azules; hoy se sabe que se debe a la fluorescencia de la esculina. La de Monardes fue la primera observación descrita de ese fenómeno en disolución y lo que aparecía en esas "maderas luminosas" era lo que después se denominaría fluorescencia.

Podemos decir, por tanto, que el descubridor de esta emisión luminiscente o más bien del estudioso que llevó a los libros de medicina y botánica este fenómeno fue Nicolás Monardes aunque desde hacía siglos era bien conocido el hecho de que determinados compuestos emiten una radiación visible cuando son expuestos a los rayos solares. Los fenómenos luminiscentes tales como la "aurora boreal", la fosforescencia del mar, la luminiscencia de animales marinos, de insectos, de la madera, etc., han fascinado al hombre desde la antigüedad. Una de las más antiguas referencias escritas sobre la luminiscencia aparece en la literatura china alrededor de los años 1.500-1000 a.c., describiendo el comportamiento de las luciérnagas y de los gusanillos de luz; Aristóteles (384-322 a.c.) parece ser uno de los primeros en reconocer la "luz fría" en pescados muertos, hongos y en la secreción luminosa de algunos peces y según cuenta la leyenda, hacia el año 1.000, un emperador de China poseía un cuadro mágico sobre el que aparecía la imagen de un buey al caer la tarde. Francis Bacon señala, en 1605, las diferentes clases de luminiscencia según sus diferentes orígenes, afirmando que: "el azúcar luce solo cuando es frotado y algunas sales en agua si están en pequeña cantidad; las luciérnagas lucen mientras tienen vida o un poco después y las escamas solo si el pescado está putrefacto, comportándose de la misma manera que la "madera luminosa" y ello es debido a que "en la putrefacción tiene lugar una transformación intensa que va acompañada de fuego o luz".

Como se puede deducir, todas estas observaciones iniciales se relacionaron principalmente con organismos vivos que emitían luz, tales como la luciérnaga, las bacterias luminosas, la luciérnaga marina u organismos unicelulares como los dinoflagelados, etc., siendo considerado Monardes como el descubridor de esa emisión luminiscente que se producía, por efecto de la incidencia de luz solar sobre determinadas disoluciones o materiales y que actualmente se reconoce que es un fenómeno fotoluminiscente llamado fluorescencia.

El primer ejemplo de emisión luminiscente de sólidos, del que hay certeza escrita, data de la época del Renacimiento italiano debido a un descubrimiento accidental algunos años después, en el 1602 ó 1603, por un zapatero y alquimista aficionado de Bolonia, llamado Vincencio Casciarolo. Este artesano fundía piedras particularmente pesadas, cercanas a su hogar, con la

esperanza de extraer después posibles metales preciosos. Las piedras, después de calcinadas con carbón y expuestas a la luz del día, emitían un resplandor rojizo en la obscuridad. Estas piedras llamadas "de Bolonia" o también "piedras de Luna", en particular, las del Monte Paterno, resultaron ser las más célebres y fueron objeto de interés científico durante los 200 años siguientes, asignándoseles el nombre de "phosphor" (en griego "portador de luz"). Se las considera el primer "phosphor" inorgánico artificial siendo el primero natural el diamante, cuya luminiscencia fue señalada por Cellini en 1568.

El descubrimiento de las "piedras de Bolonia" atrajo la atención de Galileo (1564-1642) y sus contemporáneos, que señalaron que un "phosphor" no presenta luminiscencia hasta después de haber sido expuesto a la luz natural, de manera que la luz entraba en la piedra, a semejanza de una esponja que embebe agua, y luego se producía la emisión de luz, por lo que el comportamiento del "phosphor" implicaba un tiempo en el cual la luz permanecía en la sustancia material. El matemático italiano Zucchi escribe, en 1652, que la "piedra de Bolonia" emitía más intensamente si era expuesta a la luz brillante y que el color de la luz emitida no cambiaba cuando la piedra era expuesta a la luz blanca, verde, amarilla o roja. Concluía indicando que la luz no era simplemente absorbida y remitida sin cambio alguno, a modo de esponja, sino al contrario, que al excitar se originaban reacciones con una sustancia ("spirituosus") contenida en la piedra, y cuando cesaba la luz, esa sustancia iba desapareciendo gradualmente.

Se había considerado, por tanto, en principio, a la "piedra de Bolonia" como una "esponja de luz", pero ese término era más poético que exacto. Así la denominaba el poeta Goethe, que hacía llegar luces de diversos colores a una "piedra de Bolonia", observando que la luz azul era la que excitaba una luz roja, pero que la luz roja era incapaz de ello. La luz emitida por la piedra en la oscuridad, no es consiguientemente la misma con la que había sido iluminada antes, lo que pone de manifiesto que la "piedra de Bolonia" no actúa como una esponja que posteriormente restituye la luz embebida.

La emisión retardada de luz de la "piedra de Bolonia" actualmente se considera como fosforescencia. Sabemos que dichas piedras contienen sulfato bórico con trazas de bismuto y manganeso y que en el proceso de reducción correspondiente tiene lugar la transformación del sulfato en sulfuro. Es bien conocido actualmente que los sulfatos alcalinotérreos presentan fosforescencia, que se incrementa considerablemente por la presencia en ellos de trazas de metales pesados. A los compuestos inorgánicos denominados "phosphor" se les conoce también como "crystallophosphor" por ser sustancias policristalinas que contienen trazas de algunos iones que actúan como activadores de la luminiscencia.

El término "phosphor" se utilizó también para el elemento químico fósforo, P, descubierto por el alquimista de Hamburgo, Hennig Brand, en 1669, que fue el primer científico conocido que descubrió un elemento químico. Brand, buscando la piedra filosofal, destiló una mezcla de arena y orina evaporada y obtuvo un producto que tenía la propiedad de lucir en la obscuridad. Se le llamó "fósforo de Brand" para distinguirlo de otros materiales luminiscentes denominados también "phosphor". Brand denominó al producto obtenido "phosphorous miralis" (luz milagrosa). El elemento fósforo, en su variedad alotrópica blanco o blanco amarillento, emite luz en la obscuridad, pero no es una fotoluminiscencia (fosforescencia) sino una quimioluminiscencia originada al reaccionar el elemento con el oxígeno, en un ambiente húmedo.

Durante los siglos XVII y XVIII fueron descubiertos numerosos materiales luminiscentes, aunque se realizaron pequeños progresos en su caracterización. Un ensayo de clasificación de los fenómenos luminosos, designados con el nombre genérico de "fosforescencia", aparece a

finales del siglo XVIII. La Enciclopedia de Diderot y D'Alembert, en su edición de Ginebra de 1778-1779, menciona seis órdenes de emisión, diferenciando así la oxidación lenta del metaloide de los fenómenos: fisiológicos (gusanos de luz, luciérnaga, mosquitos de las lagunas de Venecia, mosca de las Antillas, aguijón de la víbora irritada; eléctricos (diamante, telas y ropas frotadas rudamente, globo de Hauxbee); mecánicos (choques y fricción del azúcar o de la cadmia, metales atrapados en el hierro o en el acero); físicos ("piedra de Bolonia" y espató expuestos al sol) y biológicos (fermentaciones pútridas o fuegos fatuos).

El primer ejemplo señalado de luminiscencia de proteínas se debe a Beccari que, en 1746, detecta una fosforescencia visible procedente de las manos heladas al introducirse en una habitación oscura, después de una exposición a la luz solar.

Es importante señalar que la idea de absorción y emisión de luz fue establecida antes para los "phosphor" (siglo XVII) que para los materiales fluorescentes (siglo XIX), probablemente debido al retardo con que se produce la emisión de la fosforescencia.

Las propiedades luminiscentes de los extractos acuosos de ciertas maderas, que antes hemos comentado, intrigó a algunos científicos importantes del siglo XVII y comienzos del siglo XVIII, tales como Athanasius Kircher, Robert Boyle, Isaac Newton, Robert Hooke, etc., pero pocos progresos se realizaron encaminados a la explicación de los fenómenos luminiscentes en general y de la fluorescencia en particular. Importantes avances en la interpretación de los fenómenos luminiscentes se llevaron a cabo casi a mediados del siglo XIX, destacando los estudios sobre fluorescencia de David Brewster (1781-1868) en 1833; de John Herchel (1792-1871) en 1845 y de George Gabriel Stokes (1820-1903) en 1852 y 1864.

Stokes, además de introducir el término fluorescencia, es el primero en establecer claramente que la fluorescencia es un proceso de emisión de luz y definió lo que se conoce actualmente como ley o regla de Stokes, que establece que la luz emitida es de mayor longitud de onda que la excitante. Hay que señalar que la ley o regla de Stokes de 1852 es válida, por ejemplo, tanto para la fosforescencia de la "piedra de Bolonia" como para la fluorescencia de soluciones de sulfato de quinina, y con ella se engloban, por primera vez, dos tipos de fenómenos luminiscentes considerados hasta entonces como independientes: la fosforescencia y la fluorescencia.

Edmond Becquerel (1820-1891) fue, en el siglo XIX, el más importante estudioso de la fosforescencia. Continuando los estudios de Stokes, obtuvo el espectro de excitación y de emisión de diversos materiales, estableció la influencia de la temperatura y de otros parámetros y midió el tiempo entre la excitación y la emisión de la fosforescencia y el tiempo de duración de la misma.

El término "luminiscencia" (del latín "lucifer", en sentido de "portador de luz" o emisión de luz fría) fue introducido, en 1888, por Eilhardt Wiedemann con objeto de distinguir entre la emisión de luz procedente de la excitación térmica de las sustancias, y la emisión de luz procedente de moléculas que han sido excitadas por otros medios sin incrementar la energía cinética. Wiedemann señaló que los fenómenos de fosforescencia y de fluorescencia muestran que la materia es capaz de emitir luz sin que sea necesario calentar. En otras palabras, caracterizó la luminiscencia por el hecho de que no obedece a la ley de Kirchoff de la absorción y la emisión procedente de un cuerpo negro.

El desarrollo de nuestra área de conocimiento, la Química Analítica, a mediados del siglo XIX aparece con las obras de Heinrich Rose (1795-1864) y Karl Remegius Fresenius (1818-1897) y corre paralela a las últimas aportaciones descritas en el campo de la luminiscencia.

Heinrich Rose fue profesor de química en la Universidad de Berlín, desde donde realizó numerosas contribuciones a la química, entre ellas el descubrimiento del niobio. Su libro *Handbuch der Analytischen Chemie* apareció publicado en Berlín en 1829 y fue reeditado en numerosas ocasiones durante todo el resto del siglo. Al contrario de lo que había sido habitual hasta ese momento, Rose trató cada elemento en un capítulo separado en el que indicaba sus correspondientes reacciones analíticas, esquema que hemos conservado hasta la actualidad. El proceso de análisis de Rose se abría con el uso del ácido clorhídrico que permitía identificar plata, mercurio y plomo. Seguía la precipitación con ácido sulfhídrico para continuar con sulfato de amonio y, finalmente, hidróxido de potasio. La traducción castellana de esta obra de Rose fue realizada por el médico catalán Pere Mata i Fontanet (1811-1877), discípulo de Mateu Orfila quien realizó una notable producción en el campo de la toxicología.

K.R. Fresenius (1818-1897) estudió química en el laboratorio de Liebig en Giessen (Alemania). En 1841 publicó su *Anleitung zur qualitativen chemischen Analyse* cuya traducción castellana apareció en 1853. Tanto esta obra como la que dedicó más tarde al análisis cuantitativo, fue reeditada y traducida en numerosas ocasiones, con sucesivas revisiones del autor para recoger los últimos adelantos, lo que permite considerarla como una de las principales obras de química analítica del siglo XIX. También publicó la primera revista dedicada a la química analítica: *Zeitschrift für analytische Chemie* que comenzó a aparecer en 1862. Las traducciones al castellano más completas de la obra de Fresenius fueron publicadas en Valencia gracias a la labor del médico Vicente Peset y Cervera (1855-1945).

El comienzo de la Espectroscopía

Como datos históricos en relación a la instrumentación primitiva se puede aportar que Harvey, en su libro, cuenta que el pinhole y el dispositivo de prisma de Newton fueron usados por Zanotti (1748) y Dessaignes (1811) para estudiar "phosphor" inorgánicos y por Priestley (1767) para observar la electroluminiscencia. Ninguno de ellos fue capaz de obtener un espectro con los aparatos de Newton, siendo necesaria una mejor instrumentación para el estudio espectroscópico. De gran utilidad práctica para la observación de la luminiscencia fueron los espectroscopios de Willaston (1802) y de Fraunhofer (1814).

El fotómetro (y su antecesor visual: el colorímetro) fue un aparato basado en las leyes de la absorción de la luz habitualmente conocida como de "Lambert-Beer". En realidad, estos dos científicos nunca llegaron a colaborar puesto que un siglo separa el nacimiento de ambos. Lambert (1728-1777) realizó sus principales contribuciones en el campo de la matemática y la física y publicó en 1760 un libro titulado *Photometria*, en el que señalaba la variación de la intensidad luminosa al atravesar un rayo de luz un cristal de espesor "b" podía establecerse como $I = I_0 \cdot e^{-kb}$, siendo "k" un valor característico para cada cristal. En 1852, August Beer (1825-1863) señaló que esta ley era aplicable a soluciones con diversa concentración y definió el coeficiente de absorción, con lo que sentó las bases de la fórmula que seguimos utilizando actualmente: $\ln(I/I_0) = -kcb$

Esta propiedad comenzó a ser utilizada con fines analíticos gracias a los trabajos de Bunsen, Roscoe y Bahr, entre otros.

Se puede considerar que la espectroscopía moderna parte de los trabajos desarrollados en 1859 por Robert Wilhelm Eberhard Bunsen y Gustav Robert Kirchhoff, profesores de

química y de física en la Universidad alemana de Heidelberg, respectivamente. Kirchhoff estaba interesado por los problemas de la óptica, mientras que Bunsen había trabajado anteriormente en los análisis cualitativos de elementos basados en el color de la llama; En 1857, construyó un mechero de gas que producía una llama sin humo y que podía ser fácilmente regulada.

El uso del espectroscopio permitió a los químicos del siglo XIX detectar sustancias que se encontraban en cantidades demasiado pequeñas para ser analizadas con procedimientos químicos tradicionales. Los nombres de algunos elementos, como el rubidio, cesio, talio e indio, descubiertos gracias a la aplicación de esta nueva técnica de análisis, recuerdan el color de sus líneas espectrales características. En la lámina coloreada con los espectros de emisión de los elementos puede observarse la línea espectral característica del cesio que es de color azul celeste. A partir de esta propiedad, se acuñó el nombre de este elemento que procede del adjetivo latino *caesius* que significa "azul claro".

La luminiscencia molecular

La luminiscencia molecular es la parte de la espectroscopía de emisión en la que intervienen, fundamentalmente, los estados electrónicos de una molécula. Técnicas luminiscentes son aquellas en las que se mide la interacción entre la radiación electromagnética y la materia, existiendo procesos de absorción y/o emisión de dicha radiación. Concretamente, dentro del nombre de este colectivo se encuentran tres tipos de fenómenos luminiscentes relacionados entre sí: fluorescencia, fosforescencia y quimioluminiscencia. Estos tres fenómenos están basados en la emisión de radiación electromagnética tras la formación de una especie excitada mediante una reacción química (quimioluminiscencia) o bien mediante la absorción de fotones (fluorescencia y fosforescencia).

La absorción de luz es el resultado de la interacción del campo eléctrico de la luz excitante con los electrones débilmente asociados de la molécula a excitar, lo que provoca que la energía sea cedida por el campo eléctrico de la luz a la molécula, alterándose la distribución electrónica de la misma. La intensidad de luz absorbida viene dada por la Ley de Lambert-Beer.

La fluorescencia y fosforescencia se diferencian básicamente en las transiciones electrónicas implicadas en la emisión de radiación electromagnética, que confieren, a cada fenómeno, unas características determinadas. Así, si la molécula se desactiva desde el primer estado singlete excitado S_1 al estado fundamental S_0 emitiendo un fotón, se conoce como fluorescencia, mientras que si la desactivación es $T_1 \Rightarrow S_1$ se le conoce como fosforescencia. Esta última transición está prohibida por las reglas de selección y se caracteriza por su larga duración (10^{-6} - 10 s), mientras que la fluorescencia ocurre en tiempos del orden de 10^{-11} - 10^{-7} s.

De esta forma, se podría definir la fluorescencia como la emisión de luz producida por moléculas previamente excitadas mediante radiación electromagnética y la fluorimetría como la técnica analítica capaz de medir la cantidad de luz emitida por un compuesto tras la absorción de una radiación electromagnética de una determinada energía.

En 1935, Jablonskii, tras estudiar la luminiscencia de diversos colorantes, propuso el conocido diagrama de niveles electrónicos de energía de los estados singlete y triplete para

explicar los procesos de excitación y emisión de luminiscencia. El diagrama propuesto fue la base de la interpretación teórica de todos los fenómenos luminiscentes.

En él se muestran gráficamente las diferentes transiciones radiantes y no radiantes en una molécula después de su excitación a un estado singlete (A: absorción; RV: relajación vibracional, CE: conversión externa, CI: conversión interna; F: fluorescencia, CES: cruce entre sistemas y P: fosforescencia).

Cada estado electrónico molecular tiene varios estados vibracionales asociados. A temperatura ambiente, casi todas las moléculas se encuentran en el estado vibracional más bajo del estado electrónico fundamental. Al excitar con una radiación electromagnética de la zona del UV o el visible la molécula es promovida a un estado vibracional de un estado electrónico excitado ($S_0 \Rightarrow S_n$). La pérdida del exceso de energía vibracional y electrónica en la molécula ocurre inmediatamente y esta energía es absorbida por moléculas en fase condensada (moléculas del disolvente que se encuentran en constantes colisiones elásticas con el soluto excitado). Esta desactivación térmica se llama relajación vibracional (RV) cuando ésta pierde la energía vibracional dentro de un estado electrónico dado o conversión interna (CI) cuando sufre una transición sin radiación de un estado electrónico superior al estado electrónico excitado de la misma multiplicidad de espín de menor energía ($S_n \Rightarrow S_{n-1}$). Por tanto, la relajación vibracional y la conversión interna llevan a la molécula al nivel vibracional más bajo del estado singlete excitado de menor energía ($S_n \Rightarrow S_1$) Este proceso se lleva a cabo en un periodo de tiempo de 10^{-14} a 10^{-12} s.

Muchas moléculas regresan de nuevo al estado electrónico fundamental por desactivación térmica ($S_1 \Rightarrow S_0$), proceso denominado conversión externa (CE). Sin embargo, en algunas moléculas, concretamente aquellas con estructura rígida, el retorno desde el estado excitado singlete de menor energía al estado electrónico fundamental por conversión externa está desfavorecido (debido a bajas probabilidades o duración excesiva). En estas moléculas, el retorno al estado electrónico fundamental ocurre por mecanismos más lentos. Uno de éstos implica emisión directa de radiación ultravioleta-visible cuyas frecuencias y longitudes de onda vienen dadas por la diferencia de energía entre el estado excitado singlete de menor energía y el estado electrónico fundamental. La transición radiante entre estos estados se llama fluorescencia y ocurre entre 10^{-11} y 10^{-7} s después de la excitación inicial. El hecho de que el estado electrónico fundamental de la molécula tenga varios niveles vibracionales provoca que su fluorescencia no ocurra a una única longitud de onda. De hecho, la fluorescencia se manifiesta sobre un amplio rango de longitudes de onda las cuales corresponden a varias transiciones vibracionales que son componentes de una única transición electrónica.

Existe otro mecanismo por el cual una molécula se puede desactivar de su estado singlete excitado de menor energía y que, normalmente, ocurre al mismo tiempo que la fluorescencia. Este mecanismo se denomina cruzamiento entre sistemas (CES) y tiene lugar desde el estado singlete excitado más bajo al estado triplete excitado de menor energía de la molécula ($S_1 \Rightarrow T_1$). El cruzamiento entre sistemas está acompañado por un cambio en el espín del momento angular lo cual viola la ley de conservación del momento angular. El hecho de que esto ocurra es un millón de veces menos probable (más lento) que la conversión externa (cambio de estado singlete a singlete). El cruzamiento entre sistemas ocurre a una velocidad comparable a la de fluorescencia, por lo tanto, compite con ella por la desactivación del estado singlete más bajo. Las moléculas que se desactivan por medio del cruzamiento entre sistemas llegarán por relajación vibracional al nivel cuántico más bajo del estado triplete. Desde este estado, las moléculas pueden pasar al estado fundamental con o sin emisión de

radiación ($T_1 \Rightarrow S_0$). En este último caso a la emisión radiante se le llama fosforescencia, también es transición prohibitiva y se caracteriza por su larga duración (10^{-6} – 10 s).

Consideraciones fotofísicas de la fluorescencia

El hecho de que una especie molecular flourezca o no para eliminar la energía de excitación depende, sobre todo, de su estructura molecular. La fluorescencia se observa con mayor frecuencia en moléculas orgánicas conjugadas y con un esqueleto molecular parcialmente rígido. Cuanta menos libertad vibracional y rotacional tenga la molécula mayor será la posibilidad de que ésta emita fluorescencia.

Varios procesos compiten con la fluorescencia en la desactivación del estado singlete excitado. Como consecuencia, la intensidad de la fluorescencia (I_F) se obtiene al multiplicar la intensidad de luz absorbida (I_a) por la fracción de moléculas excitadas (ϕ_F) que logran flourecer.

En esta expresión ϕ_F es conocido como el rendimiento cuántico de fluorescencia o eficiencia de fluorescencia. Está relacionado con la constante de velocidad de desactivación fluorescente (k_F) y con todos los procesos unimoleculares competitivos que no producen radiación (k_d) por medio de la siguiente ecuación:

$$\phi_F = \frac{k_F}{k_F + k_d}$$

Por tanto, cuantos más procesos no radiantes se encuentren compitiendo con la fluorescencia por la desactivación del estado singlete excitado, más bajo será el valor numérico de ϕ_F y por tanto, la intensidad de fluorescencia se verá también disminuida.

Otra propiedad importante de las moléculas fluorescentes es la duración del estado singlete excitado (τ_F). Si la velocidad media de fluorescencia es el número de actos fluorescentes que ocurren por unidad tiempo, la vida media del estado singlete excitado más bajo es el recíproco de la velocidad; o sea, cuanto más rápidos ocurran los actos internos que producen radiación, menos tiempo durará la misma. El rendimiento cuántico de la fluorescencia y el tiempo de vida del estado excitado están relacionados por la siguiente ecuación:

$$\tau_F = \phi_F \cdot \tau_N$$

donde τ_N es el tiempo de vida del estado excitado y representa la vida de la fluorescencia de la molécula si ésta fuese la única manera por la cual la molécula se desactivara de nuevo desde el estado singlete excitado más bajo. Este parámetro es uno de los pocos que se pueden utilizar para deducir información acerca de la estructura de la molécula fluorescente.

Además de la estructura molecular de la especie fluorescente, el rendimiento cuántico de fluorescencia (ϕ_F) y, consecuentemente, el tiempo de vida de la fluorescencia (τ_F) se pueden ver alterados por el medio en el que se encuentra la molécula. Así, tan importante como la estructura molecular de los compuestos para definir su fluorescencia es el ambiente químico en el que se encuentre el fluoróforo. Como después veremos los principales parámetros

químicos a tener en cuenta en el desarrollo de fases sensoras fluorescentes son el pH y el soporte sólido; veamos algo de como influyen en la emisión.

La influencia del pH en el espectro de emisión fluorescente se deriva de la disociación de grupos funcionales ácidos o de la protonación de grupos funcionales básicos. Dichos procesos químicos pueden alterar la naturaleza y las velocidades de los procesos no radiantes que compiten con la fluorescencia y, por lo tanto, pueden afectar al rendimiento cuántico de la emisión fluorescente. Así, la protonación o disociación de las moléculas alteran las separaciones relativas entre el estado fundamental y el estado excitado de las moléculas y, por tanto, provoca un cambio en el espectro de fluorescencia.

La influencia del soporte sólido en el espectro de emisión fluorescente se debe fundamentalmente a dos factores. Por un lado la rigidez que el propio soporte aporta a la molécula, condicionando la libertad de movimiento de la misma y consiguientemente su intensidad de fluorescencia; así, soportes que inmovilicen adecuadamente al analito en su interior favorecerán la intensidad de emisión, puesto que a mayor rigidez estructural mayor emisión luminiscente. Por otro lado, hay que tener en cuenta la presencia de agentes desactivantes de la fluorescencia en el soporte sólido; estos agentes pueden favorecer la conversión externa, fenómeno en competencia con la fluorescencia.

Relación fluorescencia-concentración

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

$$F = B(I_0 - I)$$

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

Según la Ley de Lambert-Beer:

$$\log \frac{I_0}{I} = \epsilon bc; \quad I = I_0 10^{-\epsilon bc} = I_0 e^{-2.303 \epsilon bc}$$

siendo ϵ la absorptividad molar, cuando b se expresa en cm y c en mol.

Por tanto, la señal de fluorescencia resulta ser:

$$F = B(I_0 - I) = B(I_0 - I_0 e^{-2.303 \epsilon bc}) = BI_0 (1 - e^{-2.303 \epsilon bc})$$

Teniendo en cuenta que $e^{-2.303 \epsilon bc}$ equivale a una expresión del tipo e^{-x} , que puede desarrollarse en serie, resulta:

$$e^{-2.303 \epsilon bc} = 1 - 2.303 \epsilon bc + \left(\frac{(2.303 \epsilon bc)^2}{2!} \right) - \left(\frac{(2.303 \epsilon bc)^3}{3!} \right) + \dots$$

de manera que en una aproximación razonablemente válida se podrían despreciar todos los términos a partir del tercero, siempre que $\epsilon bc \leq 0.05$.

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

$$F = BI_0[1 - (1 - 2.303\epsilon bc)] = BI_0 2.303\epsilon bc$$

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

$$BI_0 2.303\epsilon b = cte = K \quad \text{y} \quad F = K \cdot c$$

Según esto, la señal de fluorescencia depende de la concentración c y de factores instrumentales (ángulo sólido visto por el detector, $f(a)$; factor de conversión cuántico del detector, $g(\lambda)$; paso óptico de la cubeta, (b) ; intensidad de la radiación incidente (I_0); así como de otros parámetros relacionados con la propia sustancia (absortividad molar, ϵ , y eficacia cuántica de fluorescencia, Φ_F). Es decir que:

$$F = f(a)g(\lambda)bI_0\epsilon\phi_F c = K \cdot c$$

en donde:

$$B = f(a)g(\lambda)\phi_F \quad K = BbI_0\epsilon$$

y

La proporcionalidad lineal entre la señal de fluorescencia y la concentración es la base de las aplicaciones cuantitativas de la fluorimetría, siempre y cuando el producto ϵbc sea menor de 0.05. Por tanto, la linealidad entre F y c se cumple sólo para concentraciones diluidas. La concentración máxima a determinar sería:

$$c_{\max} = \frac{0.05}{\epsilon b}$$

Todos los fundamentos teóricos hasta ahora aquí expuestos han sido utilizados durante un buen número de años de mi trayectoria investigadora en la elaboración de más de ochenta trabajos en revistas nacionales e internacionales y 6 tesis doctorales, en donde mucho tuvieron que ver mis maestros a los que ahora quiero recordar.

Del Prof. Capitán recuerdo: su forma maravillosa de explicar la Química Analítica, el dominio escénico de sus magistrales clases, su manera de conectar con los estudiantes, y su forma sabia de mezclar los aspectos teóricos con los prácticos. Pero fue su afán en el fomento de la investigación, el apego al dato bibliográfico y el amor que sentía por la prosa científica bien escrita y culta, lo que más me animo en mi carrera universitaria.

El Prof. Román, mi maestro más cercano y duradero en el tiempo, fue pionero en el uso de la medida de la emisión fluorescente con fines analíticos. En algunas de sus primeras oposiciones explicó como lección magistral la espectrometría de fluorescencia y a partir de ahí la aplicó en su investigación de tal forma, que suya fue la primera determinación fluorimétrica que se realizó en España y la dirección de la primera tesis doctoral analítica con experiencias de medida de emisión luminiscente. También firmó el primer cálculo de constantes de formación de un complejo por vía emisiva empleando los métodos de Bishop. Después algunos de sus colaboradores, entre los que me encuentro, continuaron, diversificaron y consiguieron resultados muy brillantes en este campo de la Química Analítica en donde todavía hoy se sigue publicando. A él le debo, en buena medida, mucho de lo que profesionalmente soy.

Stephen G. Schulman fue mi “adviser” americano en mi estancia en la Universidad de Florida y me ayudó a profundizar en los fundamentos teóricos del fenómeno luminiscente y en los de la transferencia de protones en el estado excitado; me encargó que escribiera junto con el Prof. Muñoz de la Peña un capítulo de su libro “Molecular luminescence spectroscopy” denominado “Determination of inorganic substances by luminescence methods”, que ha tenido una amplia difusión; en la búsqueda bibliográfica necesaria para su elaboración conocimos, con gran agrado por nuestra parte, las aportaciones de Nicolas Monardes a la historia de la luminiscencia.

De la luminiscencia a los sensores ópticos

De forma general, se puede denominar “sensor” a cualquier dispositivo robusto, de uso sencillo y preferiblemente portátil, capaz de transformar (transducir) la magnitud de un fenómeno cuya identificación resulta de interés en una señal física medible, proporcionando de forma directa y continua información de su entorno. Estos dispositivos se pueden dividir en dos grupos en función de que detecten cambios en parámetros físicos (presión, temperatura, etc.) o bien parámetros químicos (pH, concentración de oxígeno, etc.). También, los sensores diseñados para medir especies (bio) químicas se les conoce como sensores (bio) químicos.

Resulta difícil dar una definición exacta y universal de lo que es un sensor químico. Según Roe y col. un sensor químico ideal es un dispositivo capaz de detectar y/o cuantificar a tiempo real una especie química en un medio complejo (muestra de interés) a través de una interacción química selectiva.

La IUPAC propone otra definición según la cual un sensor químico es un dispositivo que transforma información química, variando desde la concentración de un componente específico de la muestra hasta el análisis total de su composición, en una señal analítica útil. La información química puede venir originada de una reacción química del analito o de una propiedad física del sistema investigado. Además, el sensor puede contener dispositivos que tengan las siguientes funciones: toma de muestra, transporte de muestra y procesamiento de señal y datos.

Idealmente, un sensor químico debe operar de forma continua y reversible, directamente sobre la matriz de la muestra y debe tener la capacidad de proporcionar información sobre la distribución espacial y temporal de una especie molecular o iónica a tiempo real. Otras condiciones que idealmente debería cumplir un sensor son las de ser portátil además de ser barato, tener mínimo mantenimiento y ser fácil de usar.

Las prestaciones de un sensor son derivadas de criterios analíticos generales así como de requerimientos específicos como son la estabilidad a largo plazo, miniaturización, estabilidad mecánica, tiempo de respuesta, estabilidad con el tiempo, compatibilidad con la presión, temperatura, explosividad, radiactividad, condiciones biológicas y esterilización.

En sentido amplio, podríamos acabar definiendo un sensor como cualquier dispositivo fácil de usar que sea para los instrumentos de medida lo que los sentidos son para los seres vivos es decir, un sistema que proporcione una determinada respuesta a un estímulo exterior, respuesta que es posteriormente analizada y procesada.

Un sensor capaz de informar sobre una especie química consta básicamente de tres partes:

1. Zona de reconocimiento o receptor: en la cual se produce la interacción selectiva con el analito (o analitos) de interés, lo que origina un cambio del sistema cuya magnitud está relacionada con la concentración de la especie a determinar.
2. Transductor: donde se transforma la energía que lleva la información química de la muestra en una señal analítica útil (se genera una señal óptica, eléctrica, etc.).
3. Elemento electrónico: de tratamiento y medida de señales eléctricas y que muestra los resultados.

Atendiendo al modo de reconocimiento, los sensores pueden clasificarse en sensores químicos o bioquímicos, y atendiendo a la naturaleza de la señal física que se genera y se mide, es decir, atendiendo al tipo de transductor, los sensores químicos se han venido clasificando en sensores electroquímicos, ópticos, térmicos, piezoeléctricos, etc.

Los sensores ópticos se basan en la utilización de zonas de reconocimiento o fases sensoras químicamente activas que al interactuar con el analito provocan un cambio en sus propiedades ópticas; cambio que es proporcional a la concentración del analito y que es registrado y medido por dispositivos adecuados.

La importancia y el potencial de los sensores han ido en aumento durante los últimos años. Los primeros trabajos desarrollados sobre sensores para especies químicas se enfocaron desde una perspectiva electroquímica. No obstante, el gran volumen de conocimiento del que se dispone hoy en día sobre métodos óptico-espectroscópicos y las amplias posibilidades que los mismos ofrecen, ha desarrollado la búsqueda e investigación de los sensores con detección óptica.

Así si tenemos en cuenta que en espectroscopia de absorción y emisión se han desarrollado buenos métodos caracterizados por su sensibilidad, selectividad y versatilidad, que la industria de las telecomunicaciones ha logrado la comercialización de fibras ópticas de bajo coste que permiten transmitir luz y cubrir amplias distancias, que se encuentran disponibles nuevas fuentes de radiación como láseres y diodos fotoemisivos (LEDs) permitiéndose la excitación del analito prácticamente en todo el intervalo de longitudes de onda de la región visible, que se han desarrollado fotodiodos y CCDs de bajo coste y que, por último, se dispone de nuevos métodos quimiométricos que junto con microprocesadores de alta capacidad y pequeño tamaño permiten almacenar y procesar datos, aún en el caso de relaciones complejas de señal-concentración, es fácil comprender el desarrollo espectacular que, en las últimas décadas, han sufrido los sensores ópticos para el análisis y/o control de parámetros de interés químico, ambiental, clínico, etc.

Una de las ventajas que ofrecen los sensores ópticos es que para unir la zona de reconocimiento con los dispositivos de medida se pueden usar fibras ópticas. Podemos afirmar, por lo tanto, que el uso de fibras ópticas permite “acercar el espectrómetro a la muestra”, mientras que el empleo de fases sensoras inmovilizadas permite llevar a cabo medidas en la propia muestra, in situ.

El desarrollo de sensores ópticos es muy importante en campos tan variados como el de las ciencias de la salud, el ambiental, el industrial, el biotecnológico, la domótica, etc.

En el campo biotecnológico, la posibilidad de miniaturización de los sensores ha dado muy buenos resultados, llegando a desarrollarse dispositivos muy económicos (desechables o reutilizables) que pueden ser separados del módulo principal. Así mismo, debido a su carácter miniaturizable y a su capacidad de medida continua e “in situ”, cada vez son más las

investigaciones enfocadas al desarrollo de sensores ópticos con aplicaciones médicas capaces de ser usados directamente en humanos.

En el campo del control ambiental, el empleo de sensores constituye una herramienta muy útil en la identificación y cuantificación de contaminantes de forma remota y continua, dando información muy valiosa a la hora de llevar a cabo una estrategia adecuada para remediar los efectos de la contaminación en áreas contaminadas o en zonas con desechos peligrosos para la vida.

También se ha producido un importante incremento en la demanda de automatización en procesos industriales. Las medidas de parámetros químicos son necesarias para seguir y controlar un proceso. Así, en la Química de procesos, los métodos para el análisis on-line están basados en la disponibilidad de sensores.

Los llamados envases inteligentes (Intelligent Packaging) surgen como respuesta a las demandas cada vez más exigentes de los consumidores sobre los alimentos. Los paquetes inteligentes se pueden definir como sistemas que controlan las condiciones de los alimentos empaquetados para dar información sobre la calidad de esos alimentos durante su transporte y almacenaje. En este sentido, el desarrollo de sistemas sensores que determinen la calidad de los alimentos en términos de frescura, deterioro microbiano u oxidación, se ha convertido en una tarea muy importante en la industria alimentaria. Las aplicaciones de los paquetes inteligentes en sistemas de trazabilidad y Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPC-HACCP) también se han puesto de manifiesto.

Las demandas más importantes en la industria en cuanto a las características de los sensores son precio, robustez, estabilidad con el tiempo o con la temperatura, además de ser biocompatibles con procesos biotecnológicos.

Con respecto a este campo, los sensores ópticos han despertado gran interés debido a que son dispositivos no invasivos o mínimamente invasivos, que no destruyen la muestra y, por tanto, su uso en este campo podría mejorar los dispositivos que se están utilizando en la actualidad. Principalmente, se puede decir que la aplicación estrella de los sensores ópticos en procesos biotecnológicos es el control de oxígeno en cultivos celulares así como directamente en el interior de las células, habiendo propuestas incluso para el uso de estos sensores en el tratamiento temprano contra el cáncer.

Otro de los últimos campos de gran aplicabilidad de los sensores ópticos es la domótica; cada vez la sociedad exige más sistemas de control de la calidad de vida en los hogares así como el disponer de dispositivos pequeños y automáticos que mejoren, sin un gran coste adicional, esta calidad de vida. En este ámbito, los sensores ópticos tienen mucho que decir debido a que son fácilmente miniaturizables y a que se pueden destinar al control de la calidad del aire, así como a ser dispositivos tipo alarma que detecten posibles contaminaciones y/o fugas de gases nocivos para la salud humana.

El empleo de sensores químicos en todos estos campos puede dar lugar a resultados cuantitativos o semicuantitativos rápidos, en la propia matriz de la muestra, es decir, in situ, reduciendo los costes de transporte y material de laboratorio, pues se minimiza el número de muestras requeridas en comparación con las necesidades para su análisis en el laboratorio, empleando los métodos clásicos para su confirmación. Además, la posibilidad de obtener medidas a tiempo real hace que su mayor campo de aplicación sea en aquellas situaciones en las que la muestra no se pueda llevar fácilmente al laboratorio y para análisis de rutina.

Fases sensoras ópticas

Como ya se ha dicho, todo sensor óptico tiene que contar con una zona de reconocimiento y detección del analito: la fase sensora o zona de reconocimiento óptico. Ésta puede ser una membrana polimérica, membranas nanoestructuradas formadas por un óxido metálico o un sol-gel, también se pueden utilizar nano o micropartículas orgánicas/inorgánicas o híbridas (partículas magnéticas tipo core magnético (Fe_3O_4)-shell polimérico) y nano o microfibras para inmovilizar un reactivo que actúe de la misma forma que la descrita en el caso anterior, una resina polimérica entrecruzada o un polímero de impronta molecular en cualquiera de los formatos (micro o nanopartículas esféricas, micro o nanofibras o membranas poliméricas de impronta molecular).

Las membranas poliméricas fueron, históricamente, los primeros soportes sólidos usados en el desarrollo de fases sensoras ópticas, debido a su amplio uso en el desarrollo de sensores electroquímicos y a la posibilidad de formar películas sensoras delgadas que contienen todos aquellos reactivos necesarios para llevar a cabo la reacción de reconocimiento de la especie de interés.

Así, para la obtención de la fase sensora se parte de un cóctel que no es más que una disolución, en un disolvente altamente volátil, de un polímero lineal y de todos los reactivos necesarios para la determinación. Tras la deposición de esta disolución y la evaporación del disolvente el polímero retiene los componentes sensores.

Existen diferentes técnicas para la obtención de estas películas sensoras, cuya selección se hará en función del espesor requerido o tipo de soporte inerte en el que se deposite la fase sensora.

Las matrices inorgánicas: Sol-geles y óxidos metálicos se han comenzado a usar en las últimas décadas. Los sol-geles suman a las ventajas típicas de los materiales inorgánicos (estabilidad, inercia química, rigidez, etc...) las de los polímeros orgánicos (variedad de monómeros, rutas de síntesis, etc...). Por otro lado, las grandes ventajas que ofrecen los óxidos metálicos nanoestructurados en multitud de campos, está haciendo que cada vez aparezcan nuevas membranas inorgánicas de tamaño, porosidad y transparencia perfectamente controlables y, por lo tanto, se tenga una mayor disponibilidad de estos materiales para su uso en el desarrollo de fases sensoras ópticas.

Mediante ambas tecnologías es posible la inmovilización en una matriz inorgánica de una o varias especies que se pueden incorporar a la matriz durante o después del proceso de obtención del material, actuando de igual forma que las membranas poliméricas comentadas anteriormente pero con las características de los materiales inorgánicos. Además, debido a que durante el proceso de síntesis se puede controlar su porosidad estos materiales proporcionan fases sensoras que aumentan su sensibilidad y estabilidad con respecto a las poliméricas.

La vía más común para la síntesis de un sol-gel consiste en emplear alcóxidos de metales, generalmente de silicio, tales como el TMOS (tetrametoxisiloxano), MTMOS (metiltrimetoxisiloxano) o TEOS (tetraetoxisiloxano), u otros organosilicatos para producir una suspensión coloidal (sol) que al condensar produce el gel y que tras su secado y pérdida de los disolventes produce un xerogel. La inmovilización de las moléculas óptimamente activas en la matriz del sol-gel se puede llevar a cabo por diversos métodos:

- Dopaje químico: la molécula que se quiere retener se añade junto a los monómeros al inicio de la polimerización quedando atrapada en el interior poroso del sol-gel.
- Inmovilización química: mediante la formación de enlaces covalentes entre la molécula a inmovilizar y los grupos silanol.
- Impregnación: sumergiendo el soporte poroso en una disolución concentrada de la molécula a retener que queda adsorbida físicamente en los poros del material inorgánico.
- Copolimerización: empleando monómeros alcoxisilanos modificados, los cuales contienen la molécula a retener enlazada covalentemente.

La obtención de óxidos metálicos nanoestructurados está ampliamente desarrollada debido al gran interés que despiertan estos materiales en campos tan relevantes como la microinformática, robótica, sensores electroquímicos, etc... permitiendo obtener multitud de materiales con características totalmente diferentes en función del óxido metálico usado así como el proceso de síntesis. Un tipo de óxido metálico muy concreto que ha dado muy buenos resultados en el desarrollo de fases sensoras ópticas ha sido desarrollado por la empresa Ilford Imaging Switzerland, el cual genera membranas nanoporosas en las que se puede controlar el tamaño, volumen y carga de los poros y se pueden incorporar reactivos selectivos a las especies a determinar, estabilizándolos, disminuyendo los tiempos de respuesta y mejorando su sensibilidad. Se ha demostrado que los óxidos metálicos incrementan la sensibilidad de reactivos luminiscentes hasta cuarenta veces con respecto a su sensibilidad cuando son incorporados en membranas poliméricas. Además, proporcionan gran estabilidad frente a la fotodescomposición y estabilidad en condiciones ambientales debido a la baja probabilidad de la formación de aglomerados y precipitación.

Los *polímeros de impronta molecular (MIPs)* se pueden definir como polímeros tridimensionales con huecos específicos inducidos por una molécula molde que sirven para el reconocimiento molecular y que dan lugar a un material donde el molde dirige la disposición y orientación de los componentes que lo forman mediante un mecanismo de autoensamblaje. Es decir, se trata de materiales biomiméticos que reproducen de un modo más básico el mecanismo de reconocimiento de los sistemas biológicos (hormona-receptor, enzima-sustrato, antígeno-anticuerpo). Por tanto, la tecnología MIP consiste en desarrollar un material polimérico capaz de interactuar selectivamente con una molécula o ion actuando como “cerradura” ante un analito “llave”.

Para preparar un MIP lo habitual es usar un proceso de polimerización radicalaria, donde uno o más monómeros funcionales junto con un entrecruzador y en presencia de la molécula molde forman lo que se conoce como el complejo de pre-polimerización.

Éste una vez que se inicia la reacción radicalaria, mediante la adición de un iniciador de radicales, da lugar a un polímero tridimensional y entrecruzado que contiene a la molécula molde en su estructura. Una vez finalizada la polimerización y tras la extracción del molde, se crean cavidades en el interior del polímero que son complementarias en tamaño, forma geométrica y orientación de grupos funcionales a la molécula usada como molde.

Las interacciones entre la molécula molde y los monómeros para dar lugar al complejo de pre-polimerización pueden ser básicamente de dos tipos: vía enlaces covalentes o bien mediante interacciones no covalentes (puentes de hidrógeno, interacciones π - π , fuerzas de Van der Waals, interacciones iónicas, etc.).

Mecanismos de reconocimiento

El mecanismo de reconocimiento óptico va a depender del tipo de fase sensora que se diseñe. Así, los principales mecanismos de reconocimiento de los sensores ópticos son los siguientes:

- **Mecanismo de coextracción o cambio iónico.** La fase sensora contiene un ionóforo (que interacciona con el analito), un cromoionóforo (cuyas propiedades ópticas serán sensibles al cambio de una propiedad química de la membrana, p.e. el pH) y en caso de cambio de carga en la membrana debido a la entrada o salida de especies cargadas, un aditivo aniónico lipofílico encargado de mantener la electroneutralidad dentro de la membrana. La interacción del analito de interés con el ionóforo provoca un cambio en una propiedad química de la membrana, por ejemplo la entrada de iones H^+ (coextracción) que modifican el pH de la membrana o la cesión de H^+ del ionóforo al cromoionóforo (cambio iónico) que al igual que en el caso anterior produce un cambio de pH de la membrana. Esta variación de una propiedad química de la membrana seguido, como en el ejemplo, de un cambio de pH, induce un cambio en las propiedades ópticas del cromoionóforo, cambio que se relaciona con la concentración del analito de interés. Por tanto, es un mecanismo de reconocimiento indirecto.
- **Mecanismo de interacción directa analito-cromoionóforo.** La fase sensora contiene un cromoionóforo que tras interactuar con el analito de interés (interacción física o química) cambia alguna de sus propiedades ópticas. Esta variación puede ser un aumento o una disminución de dicha propiedad, por ejemplo, desactivación de luminiscencia, que es proporcional a la concentración de analito.

Mecanismo de interacción directa analito-soporte. La membrana, que no contiene ningún aditivo ópticamente activo, interacciona con el analito que se retiene por interacciones físicas y/o químicas, preconcentrándose y produciendo una variación en las propiedades ópticas de la fase sensora que es proporcional a la concentración de analito. Este es el caso de fases sensoras basadas en resinas comerciales o polímeros de impronta molecular.

Biosensores

Un biosensor se define como un sensor que incorpora un elemento de reconocimiento biológico: ácido nucleico, enzima, anticuerpo, receptor, tejido, célula, etc.... siendo ésta la única diferencia que existe con los sensores químicos relatados anteriormente.

Así, el principio de detección de un biosensor se basa en la interacción específica entre la fase sensora bioquímica y el compuesto o microorganismo de interés. Como resultado de esta interacción se produce la variación en una de sus propiedades físico-químicas que es medida por el transductor.

El término biosensor aparece en la literatura científica a finales de los años 70, aunque el concepto básico e incluso la comercialización comenzaron antes. El primer biosensor fue desarrollado por Clark y Lyons en 1962 y comercializado por Yellow Spring Instrument Company en 1975 para la determinación de glucosa. Este biosensor se denominó "enzyme electrode" y se basa en el acoplamiento de la enzima glucosa oxidasa en un electrodo para oxígeno; la enzima oxida la glucosa y como consecuencia se produce un consumo proporcional de la concentración de oxígeno en la muestra, que es detectado y cuantificado por el electrodo.

El término biosensor empezó a usarse en 1977 cuando se desarrolló el primer dispositivo que utilizaba un microorganismo vivo en la superficie de un electrodo sensible a amonio. Este dispositivo se utilizó para detectar el aminoácido arginina y sus creadores lo denominaron “sensor bio-selectivo”. Posteriormente, para acortar el nombre de este tipo de dispositivos, se empezaron a denominar biosensores y este término ha permanecido desde entonces para designar la unión entre un sistema biológico y un transductor físico.

A partir de esos momentos, el desarrollo de biosensores empieza a crecer exponencialmente, siendo en su gran mayoría electrodos enzimáticos o biosensores electroquímicos con aplicación en el campo clínico. Las características más destacables que los convierten en opciones altamente atractivas en el mercado son: su especificidad, su alta sensibilidad, su corto tiempo de análisis, su capacidad de inclusión en sistemas integrados, su facilidad de automatización, su capacidad de trabajar a tiempo real, su versatilidad (que permite el diseño de dispositivos a la carta), y su bajo coste.

Al igual que ocurrió con los sensores químicos, los biosensores de transducción electroquímica son los que más se han desarrollado y los que más relevancia y comercialización tienen en la actualidad. No obstante, el auge que sufrieron los métodos ópticos y la demostración de las ventajas de usar estas técnicas en el desarrollo de sensores, empujaron el desarrollo de biosensores ópticos, que tras evidenciar sus enormes ventajas frente a métodos electroquímicos, han llegado a convertirse en el verdadero motor del incremento de dispositivos que usan estas técnicas de transducción.

En la actualidad, existe un gran número de dispositivos basados en interacciones de tipo bioquímico con aplicación en campos tan variados como la biomedicina, al análisis ambiental, la industria agroalimentaria, etc...

Los biosensores solo se diferencian de los sensores químicos en la zona de reconocimiento y por ello, en el mecanismo de interacción entre la fase sensora y el analito o especie de interés. Dos son los tipos de interacción que se pueden dar en este tipo de dispositivos:

- **Las interacciones de bioafinidad** se basan en la interacción del analito de interés con la fase biosensora sin que exista transformación catalítica. Se establece, por tanto, una sustitución de equilibrio en la que se forma un complejo analito-receptor. Para medir esta interacción, ya que no hay consumo de sustratos ni generación de productos, se suelen utilizar las características físico-químicas intrínsecas del receptor, el marcaje del receptor o bien la medida de un elemento que compita con el analito por la unión al receptor.

La principal desventaja de este tipo de interacción es que se requieren pasos posteriores de lavado y separación del exceso de moléculas marcadas previas a la detección. Además, este tipo de interacciones presenta en ocasiones un intervalo de operación de concentración estrecho, debido a que se puede producir una saturación del receptor y a menudo no permite una monitorización en continuo.

De los diferentes tipos de receptores de bioafinidad existentes, los más utilizados en el desarrollo de biosensores son: anticuerpos, lectinas, células completas y ácidos nucleicos.

- **Las interacciones biocatalíticas** son las más ampliamente usadas en el desarrollo de fases biosensoras. Se basan en la utilización de biocatalizadores, que son elementos que favorecen que ocurra una reacción química en la cual, a partir de uno o varios sustratos, se forman uno o varios productos conocidos sin consumo del biocatalizador, que se regenera y puede ser reutilizado.

Tales biocatalizadores pueden ser sistemas que contienen enzimas o sistemas multienzimáticos aislados, orgánulos celulares, células completas o tejidos animales o vegetales. Pueden usarse para detectar la presencia de alguno de los sustratos que participan en la reacción, la desaparición de algún co-sustrato conocido distinto de aquel que se quiere detectar o bien la aparición de algún producto conocido.

Todos los fundamentos teóricos y experimentales expuestos en las diferentes líneas de esta área de investigación han sido utilizados durante estos últimos años en la elaboración de unos 40 trabajos en revistas internacionales y en 5 tesis doctorales, en donde mucho tuvieron que ver mis actuales colaboradores en estas líneas a los que ahora recuerdo con agradecimiento y afecto.

Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919)

Siempre que hacemos una introducción histórica a las separaciones cromatográficas, comenzamos con una frase parecida a: “el término cromatografía fue empleado por primera vez por Tswett cuando en 1903...”; con el paso de los años, el recordatorio se ha simplificado y parece que todo el mérito de este investigador fue el de mero iniciador. La relevancia de sus hallazgos hace que hoy, sea necesario dedicarle parte de este discurso a recorrer brevemente su vida y trabajo y a desarrollar el concepto de cromatografía que en su día ideó.



Mikhail Semenovich Tswett

Mikhail Tswett nació en 1872 en Asti (Italia), donde sus padres viajaban con frecuencia. En 1891 obtuvo su Certificado de Madurez y animado por su padre decidió acceder a la Universidad de Ginebra. En 1893 se graduó y considerando que se había formado en el centro más activo de la moderna fisiología vegetal, dedicó su trabajo a la bioquímica y citofisiología de las plantas, y en 1896 presentó su tesis doctoral de título “Investigación en Fisiología Celular. Contribuciones al conocimiento de los movimientos de protoplasma, membranas plasmáticas y cloroplastos”. Tras un largo viaje para conocer los laboratorios italianos más relevantes de la época en su campo, tomó la decisión de dar un cambio a su vida, yéndose a Rusia.

Una vez allí comenzó a buscar trabajo, pero descubrió que su doctorado no era considerado válido y que debía realizar una nueva tesis doctoral, para la que eligió como objeto el estudio de las clorofilas y los cloroplastos. No se puede decir que Tswett fuera aceptado en Rusia. Pasó por las Universidades de San Petesburgo y Kazan, sin obtener un puesto fijo. En 1901 surgió la posibilidad de acceder a una plaza en esta última Universidad, pero la rechazó ya que por entonces había recibido la oferta de trabajar como ayudante en la Universidad de Varsovia, en un laboratorio mejor equipado para llevar a cabo sus experiencias. En esta Universidad presentó su segunda tesis doctoral.

De la separación de clorofila y xantofila a la idea de la Cromatografía

Siguiendo las etapas del método científico, antes de comenzar sus estudios sobre la clorofila, Tswett recopiló y estudió en profundidad la intensa investigación existente sobre el tema realizada por sus predecesores y contemporáneos, lo que conllevó una revisión de los principales periodos, métodos de estudio y descripciones de la clorofila. Aquella revisión dejó entrever que algunos autores de la época ya se planteaban las posibles modificaciones de la clorofila cuando era extraída de las plantas con la ayuda de reactivos químicos para purificar el compuesto en estado sólido.

Los esfuerzos de Tswett se encaminaron a eliminar las razones que podrían hacer cambiar la naturaleza del pigmento verde, por lo que utilizó hojas frescas y eliminó la calefacción. Esta búsqueda de un método más racional para la investigación de los pigmentos de las plantas llevó a Tswett a su principal logro científico: **el desarrollo de la cromatografía**, que abrió una nueva era en el estudio de estos pigmentos. Su trabajo entre 1898 y 1900, con catorce publicaciones en revistas británicas y rusas, se recopiló en un trabajo titulado “Composición físico-química de la partícula de clorofila. Investigación experimental y crítica”, que constituyó su Tesis Magistral en 1901.

Durante sus experimentos para intentar extraer la clorofila de las hojas sin modificar, Tswett justificó la falta de resultados cuando se utilizaba éter de petróleo y los resultados positivos cuando se añadía una pequeñísima cantidad de etanol a la presencia de fuerzas de adsorción entre los pigmentos y la matriz de los cloroplastos y encaminó sus esfuerzos a nuevos métodos físicos que permitieran el estudio de la clorofila en su estado natural. Esta idea de competir con las fuerzas de adsorción dio lugar a los experimentos sobre la identificación de materiales capaces de adsorber pigmentos existentes en las hojas verdes, desadsorbiendo de forma diferencial los componentes de la mezcla.

El 21 de marzo de 1903 fue un día memorable para la historia de la cromatografía. En la Sección de Biología de la Sociedad de Ciencias Naturales de Varsovia, Tswett presentó un trabajo titulado “Sobre la nueva categoría de fenómenos de adsorción y sus aplicaciones al análisis bioquímico”. En ella, por primera vez, se establece una clara definición del proceso en el que se basa la nueva técnica analítica: “En la actualidad, bajo el término adsorción se combinan varios fenómenos, que, aunque posiblemente diferentes en naturaleza, corresponden a la siguiente definición básica: concentración de gases, vapores, líquidos o compuestos disueltos sobre la superficie de cuerpos sólidos”.

En una posterior publicación en alemán en 1906, Tswett describió con detalle cómo obtenía los pigmentos de hojas frescas trituradas con éter de petróleo al que añadía pequeñas cantidades de alcohol, que posteriormente eran eliminadas por agitación con agua destilada. El extracto de pigmentos se separaba en sus componentes con ayuda del “cromatógrafo”. En su primera versión fue muy simple y después evolucionó a un sistema donde se aumentaba el número de experimentos. En sus trabajos hasta 1910 Tswett examinó hasta 128 adsorbentes en los que describió diferentes comportamientos.

Tras anunciar la invención de esta nueva técnica en 1903, Tswett la empleó para obtener muestras químicamente puras de las clorofilas a y b, y aportó la prueba incuestionable de la heterogeneidad del pigmento verde de las plantas, aunque no fue el primero en proponer esta heterogeneidad. Además descubrió una tercera forma de clorofila en algas, la clorofila c.

A Tswett se le ha considerado posteriormente el descubridor de todas las formas de clorofila, aunque él siempre atribuyó al científico inglés Sorby este descubrimiento, realizado treinta

años antes. De hecho, por este empeño, Tswett entró en polémica con L. Marchlewski, el principal investigador europeo de la hemoglobina y de la clorofila a principios del siglo XX, quien, junto con C. Schunk, se arrogó el descubrimiento de las dos formas principales. Tswett afirmó que los experimentos de Marchlewski y Schunk no eran sino meras reproducciones de los experimentos de Sorby, y en defensa de la novedad de su método y de sus resultados, Marchlewski declaró que Tswett mentía e incluso que los artículos de Tswett no merecían ninguna atención y además que el método cromatográfico sería algo que no tendría ninguna utilidad en el futuro.

En los años siguientes se mantuvo una agria polémica entre los dos investigadores, centrada en la existencia de las distintas formas de las clorofilas, que pareció zanjada cuando Marchlewski aceptó que la metodología de Tswett era adecuada y que Sorby había descrito previamente resultados como los suyos.

Las discusiones más intensas de Tswett fueron con el químico orgánico R. Willstätter, que sería premio Nobel en 1915, y principal discípulo del fundador de la moderna química orgánica alemana, A. Baeyer, premio Nobel de 1905.

Willstätter siguió una aproximación química para el estudio de la composición y naturaleza de los pigmentos vegetales, analizando y estudiando la estructura de varios derivados de esos pigmentos mediante la acción de determinados reactivos como ácidos, álcalis, etc.

La discusión se mantuvo durante muchos años, dado que Tswett mantenía que no se podía hacer ese análisis orgánico puesto que las sustancias no estaban suficientemente purificadas, porque las técnicas empleadas no permitían la total separación de los compuestos, mientras que Willstätter afirmaba que no se podía considerar purificación un proceso que no se basaba en la cristalización para dar lugar a un compuesto sólido. A pesar de estas polémicas, Tswett logró en vida un cierto reconocimiento a su trabajo, pues le llegaron a conceder en 1912 el premio Akhmatov (consistente en 1000 rublos), y fue incluso propuesto para la obtención del Premio Nobel de 1918.

A partir de 1910, su salud, que nunca había sido muy buena, empezó a deteriorarse y, por si ello fuera poco, Rusia, en plena Revolución, se involucró en la Primera Guerra Mundial. En una época convulsionada por profundos cambios, Tswett perdió todos sus archivos y fases adsorbentes, que cuidadosamente había recopilado durante años.

El 16 de junio de 1919 murió, a los 47 años, víctima de su debilitado corazón y de una vida siempre en condiciones de precariedad económica.

La actitud enormemente crítica hacia la investigación de Tswett sobre clorofilas y carotenoides por parte de sus colegas demuestra que sus innovaciones no encontraron gran apoyo. Las actitudes mayoritarias en aquellos años fueron predominantemente negativas y durante la primera década tras la muerte de Tswett el número de publicaciones en las que se usaba la cromatografía disminuyó radicalmente, principalmente porque los resultados obtenidos por el primer cromatografista del mundo fueron ignorados.

Uno de los motivos aducidos para esta falta de reconocimiento fue que la principal publicación de Tswett no fue accesible para los científicos de la Europa Occidental porque estaba escrito en ruso, y además porque era una rareza bibliográfica al ser una edición de su tesis doctoral. Aunque esto pueda ser cierto, no lo es menos que Tswett publicó numerosos artículos en revistas de otros países, y realizó demostraciones de su técnica en las distintas sociedades científicas europeas, pues sus conocimientos de francés, ruso, inglés y alemán le

permitieron estar en contacto con las sociedades internacionales de mayor prestigio. También se ha aducido para justificar esta falta de reconocimiento el que las publicaciones de Tswett fueran mayoritariamente dedicadas al campo de los pigmentos vegetales en revistas de botánica, aunque también presentó sus resultados en revistas de química francesas y alemanas.

El olvido en el que se mantuvo el descubrimiento de Tswett es posiblemente debido a la falta de confianza que alguno de los principales científicos de su tiempo mantuvieron acerca de la cromatografía, fundamentalmente Willstätter. Mientras vivió nadie, excepto Tswett, se atrevió a desafiar a Willstätter cuando afirmaba que él había sido el primero en obtener las clorofilas a y b químicamente puras, y tras la muerte de Tswett en 1919, la investigación sobre los pigmentos de las plantas fue prácticamente monopolizada por la escuela de Willstätter. Como Ettre y Horváth escribieron mucho más tarde, "...en este periodo Willstätter era el Papa (sic) en este campo" (el de las clorofilas), por lo que Synge llegó a afirmar en 1970 que "...el peso de la autoridad científica de Willstätter hizo que la sociedad científica ignorara las ideas de Tswett". En los años treinta revivió el interés por la técnica, para separar los distintos carotenoides de las plantas, por lo que se puede decir que se redescubrió en Alemania por Winterstein y Stein.

Existe una frase que Tswett reitero en varios escritos y cuya autoría ha sido atribuida a distintos personajes: "Cualquier avance en la ciencia es un avance del método". Esto resume muy bien lo que fue su vida y su principal descubrimiento: una técnica poderosísima para conocer más acerca de los pigmentos vegetales. Varios años tras su muerte, a su lápida se añadió el siguiente epitafio: **"Destinado a descubrir la cromatografía, la ciencia que separa moléculas y une personas"**.

El Proceso analítico. Técnicas continuas y discontinuas

Podemos afirmar que Tswett fue el descubridor de la cromatografía, técnica que hoy en día se usa en cualquier laboratorio de análisis del mundo. Dicha técnica está englobada dentro de lo que conocemos como técnicas de separación (técnicas separativas). Antes de hacer un recorrido descriptivo por estas técnicas, parece necesario definir el concepto de proceso analítico para así poderlas incluir en el mismo.

Un proceso analítico general consiste en un conjunto de procedimientos realizados para solucionar un determinado problema analítico, dicho de otro modo, el proceso analítico se define como el conjunto de operaciones que separan a la muestra sin tratar y sin medir de los resultados del análisis.

La definición del problema es la primera etapa, en ella se plantea el tipo de análisis que se necesita y la escala de trabajo. Tras ello, debe realizarse la elección del método analítico, aspecto clave para una resolución adecuada del problema. Una vez elegido el método, se procede a su ejecución. Posteriormente, se pasa a valorar los resultados obtenidos para establecer si el problema ha sido resuelto de forma satisfactoria. Si no es así, se debería reiniciar el proceso analítico y replantear el problema. El desarrollo práctico del método analítico consta de tres etapas:

- Las operaciones previas o preliminares, pueden descomponerse en dos subetapas. En la primera, se realiza una toma de muestra representativa del material a analizar. En la segunda, se lleva a cabo una transformación de la muestra o parte de la misma, de forma que la especie

o especies químicas de interés pasen a una forma medible inequívocamente. Esta transformación, de ser necesaria, podría requerir etapas de separación de sustancias interferentes y etapas de reacción química que hagan más sensible y específica la medición de la señal debida al analito.

- En la etapa de adquisición de datos tiene cada vez más importancia la instrumentación analítica. El proceso de medida instrumental puede separarse en tres etapas: la generación de un flujo de energía, la interacción de este flujo con la muestra, y la medición y procesado de la señal procedente de la muestra.
- Por último, la etapa de tratamiento de datos consiste en el procesado matemático de los datos para obtener unos resultados que den el valor más probable de la información buscada, así como la incertidumbre que la acompaña.

Las técnicas de separación se incluyen dentro de la primera etapa de este proceso analítico, es decir, dentro de las llamadas operaciones previas. Para llevar a cabo los procedimientos de separación, la Química Analítica dispone de numerosas técnicas que se basan en las diferencias existentes en las propiedades físico-químicas de los distintos componentes de una muestra.

Debido al gran número de técnicas de separación descritas, existen numerosos intentos de sistematización que resultan intuitivos y que, además, proporcionan una idea del funcionamiento de cada una y su interrelación.

De las distintas clasificaciones de las técnicas analíticas de separación, la más usada es aquella que permite la división de las mismas en dos grandes grupos:

- **Técnicas discontinuas:** aquellas que no comportan en sí mismas la detección o determinación de las especies separadas, es decir, la medición de la señal analítica se efectúa de manera discontinua respecto a la separativa. Tal es el caso de la precipitación, destilación, extracción líquido-líquido, etc.
- **Técnicas continuas:** aquellas que implican o pueden implicar la detección o determinación de las especies involucradas de manera continua después de ser separadas. Dentro de estas técnicas se encuentran dos grandes grupos, las cromatográficas y no cromatográficas.

Por lo que se refiere a las primeras, las de mayor aplicación hasta el momento han sido la cromatografía de gases y la cromatografía de líquidos, en las cuales, los sistemas de separación y detección están integrados, por lo que el cromatógrafo actúa globalmente como instrumento suministrando información cualitativa y cuantitativa. Dentro del grupo de las técnicas continuas no cromatográficas, se encuentra una de enorme interés y desarrollo actual que es la electroforesis capilar.

Antes de tratar más profundamente las técnicas continuas, nos detendremos someramente en aquellas técnicas discontinuas, que poseen notable importancia.

En general, la etapa de tratamiento de muestra puede considerarse como una de las más determinantes del proceso analítico y de ella va a depender en gran medida la calidad y fiabilidad de los resultados obtenidos. Se puede llevar a cabo con distintas finalidades; en primer lugar, con el objetivo de extraer los analitos de matrices complejas y convertirlo en un extracto compatible con la técnica analítica que se vaya a emplear, eliminando a su vez los componentes de la matriz que podrían interferir en el análisis. Por otro lado, en el caso de analitos que se encuentran en baja concentración, el proceso de extracción puede incluir un

paso de preconcentración para alcanzar los límites de detección de la técnica analítica aplicada.

Han sido descritos en bibliografía muchos procedimientos para la extracción de diversos analitos presentes en distintas matrices, en su mayoría utilizando extracción líquido-líquido y extracción sólido-líquido. En la extracción líquido-líquido se separa un componente de una mezcla líquida, con ayuda de un disolvente, que preferentemente lo disuelve. Con la extracción sólido-líquido se pueden extraer componentes solubles de sólidos con ayuda de un disolvente. En este tipo de extracciones juega un papel decisivo la solubilidad de los analitos en los disolventes utilizados. Esta solubilidad está condicionada por la naturaleza química del compuesto. Por este motivo no es posible hablar de procedimientos de extracción generales, sino que la elección de un procedimiento concreto dependerá de la matriz de la que se trate, de los compuestos que se quieran determinar y del tipo de información que se desee obtener (cualitativa o cuantitativa).

Dentro de la extracción sólido-líquido, conviene mencionar la extracción asistida por microondas, la extracción acelerada con disolventes, la extracción con fluidos supercríticos...entre otras; en todas ellas se emplean disolventes de alta difusividad elevando la temperatura y controlando la presión.

En el caso de muestras líquidas, además de la extracción líquido-líquido, la precipitación, la destilación, y la diálisis, tiene gran importancia la extracción en fase sólida (SPE), basada en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). Actualmente se pueden encontrar una gran variedad de materiales de relleno para SPE disponibles comercialmente como es el caso de sílice, sílice alquilada (C-18, C-8, etc.), fases basadas en carbono, materiales de cambio iónico, materiales poliméricos o fases de exclusión por tamaños para eliminar las macromoléculas. Aunque las fases de sílice modificada C-18 son las más ampliamente usadas, tienen importantes limitaciones como son su bajo poder de retención para los analitos polares, la inestabilidad a pH alto y la irreproducibilidad en las pérdidas de analito cuando el lecho se seca después del paso de acondicionamiento. Los materiales poliméricos han despertado un creciente interés en los últimos años, especialmente las resinas poliméricas funcionalizadas, que contienen grupos funcionales polares sobre un esqueleto polimérico no polar y ofrecen mejoras en la retención de los analitos polares. Estas fases poliméricas muestran también una mayor estabilidad a distintos valores de pH y son menos propensas a las pérdidas de analito cuando se seca el lecho.

Del mismo modo, antes de abordar las técnicas continuas, es bueno subrayar que el tratamiento de muestra puede llevarse a cabo usando una modalidad "*off-line*" (no acoplado a la técnica analítica que se vaya a emplear posteriormente para el análisis de dicha muestra) o una modalidad "*on-line*" (incorporado a la línea de la técnica analítica que se vaya a emplear para el análisis de dicha muestra).

Llegados a este punto, parece necesario ahondar un poco más en las siguientes técnicas separativas cromatográficas: de gases, líquida, y algo de fluidos supercríticos y la técnica no cromatográfica: electroforesis capilar.

Cromatografía de gases (GC)

La invención de la GC ha sido generalmente atribuida a A.T. James y a A.J.P. Martin, que publicaron un artículo en 1952 que fue la culminación del trabajo que habían presentado el 20 de octubre de 1950 en un congreso de la Sociedad de Bioquímica, y como conferencia en un congreso de la Sociedad de Química Industrial celebrado en Oxford (Septiembre de 1952). Los mencionados autores llevaron a cabo la separación de ácidos grasos volátiles mediante cromatografía de partición con nitrógeno y una fase estacionaria de tierra de diatomeas impregnada de aceite de silicona y de ácido esteárico.

Probablemente ninguna técnica de la Química Analítica se ha adoptado más rápida y extensamente que la GC. Los hitos más importantes en el desarrollo de esta técnica, han estado relacionados con el tipo de columnas empleadas, los sistemas de detección y los sistemas de introducción de muestra. Sin lugar a dudas, la creación de las columnas capilares y el abaratamiento de los acoplamientos GC-MS trajeron consigo un crecimiento del número de usuarios de la misma. Hoy en día esta técnica sigue progresando rápida y notablemente, pudiendo resaltar aplicaciones en GC bidimensional y el acoplamiento de GC con espectrómetros de masas de última generación.

En la GC se utiliza como fase móvil un gas portador inerte, que eluye los componentes de una mezcla a través de una columna que contiene una fase estacionaria inmovilizada. La forma más usual de hacer cromatografía de gases es utilizando como fase estacionaria un líquido que recubre la pared interna de una columna o un soporte sólido, lo que recibe el nombre de cromatografía gas-líquido (CGL). Existe otro tipo de cromatografía de gases menos utilizada, denominada cromatografía gas-sólido (CGS), en la que el analito se adsorbe directamente sobre las partículas sólidas de la fase estacionaria. El gas portador es un gas inerte, generalmente helio, nitrógeno o argón de elevada pureza, con un caudal conocido y controlado. La fase móvil no interacciona con el analito y su única misión es la de transportar la muestra. Las columnas pueden ser con *relleno*, en las que la fase estacionaria líquida está retenida sobre un sólido inerte (soporte) y *capilares*, en las que la fase estacionaria se fija sobre las paredes interiores del capilar. En la inmensa mayoría de los análisis se utilizan columnas capilares, largas y estrechas, hechas de sílice fundida (SiO_2) y recubiertas de poliimida como soporte y como protección de la humedad atmosférica. Los diámetros interiores típicos son de 0.1-0.53 mm y las longitudes típicas de 15 a 100 m.

Las partes esenciales de un cromatógrafo de gases son: fuente de gas portador (botella a presión), sistema de regulación de caudales (válvula reguladora y manómetro), bloque termostático de inyección de las muestras, columna termostática conteniendo la fase estacionaria, detector termostático con amplificador de señal y registro gráfico, y caudalímetro de precisión.

La muestra de un líquido volátil o de un gas se inyecta, a través de un septo, en la cámara de inyección donde se vaporiza y se arrastra hasta cabeza de columna. La temperatura inicial de la columna se fija en 40° C por debajo del punto de ebullición del disolvente, que condensa por tanto en la cabeza de la columna. Como los solutos van quedando atrapados lentamente en la porción de disolvente condensado, forman una estrecha banda al principio de la columna. Los analitos, en forma gaseosa, se hacen pasar a través de la columna, arrastrados por el gas portador, y por equilibrios sucesivos entre fase móvil y estacionaria cada componente se desplaza por la columna a velocidades diferentes. La columna debe estar suficientemente caliente a fin de que los analitos alcancen una presión de vapor suficiente para que se eluyan en un tiempo razonable. Finalmente, los analitos después de ser separados llegan al detector, cuya respuesta aparece en la pantalla de un ordenador o un registrador en

forma de cromatograma. El detector se mantiene a una temperatura más alta que la columna, de forma que los analitos se encuentran en forma gaseosa. Tal y como adelantábamos, existen dos tipos de cromatografía de gases:

- **cromatografía gas-sólido** tiene una fase estacionaria sólida en la cual se produce la retención de los analitos debido a la adsorción física sobre la superficie del sólido. Esta técnica ha tenido una aplicación limitada por la tendencia de los picos eluidos a formar colas y a la retención semipermanente de gases activos sobre la fase estacionaria.
- **cromatografía gas-líquido** se basa en la distribución del analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria líquida inmovilizada sobre la superficie de un sólido inerte (soporte) o en las paredes interiores de la columna, si ésta es capilar. Este tipo de cromatografía de gases es la más utilizada.

Cromatografía líquida

Los inicios de la Cromatografía, que la evolución convirtió en la actual HPLC, se centraron como mencionábamos antes en los trabajos que Tswett y Day realizaron en columnas abiertas con rellenos sólidos variados, predominantemente alúmina. Después de estos primeros hallazgos, pasaron unos veinte años, en los que la cromatografía no fue apenas objeto de estudio de interés; fue al inicio de la década de los treinta cuando parece redescubrirse y ya no deja de desarrollarse de modo prácticamente continuo.

Se comprobó entonces, con diversos trabajos experimentales, que disminuyendo el tamaño medio de la partícula de relleno, se conseguía, en líneas generales, mejorar la calidad de las separaciones. Sin embargo, este hecho, condicionaba enormemente los tiempos de análisis, haciéndolos del todo impracticables. Esta cromatografía en columna abierta se conoce como cromatografía clásica o gravitatoria, ya que la fase portadora (móvil) recorre el relleno por la simple acción de la gravedad. Dicha cromatografía clásica o a baja presión presentaba importantes inconvenientes desde un punto de vista práctico:

- Era lenta.
- Era poco eficaz, tanto en la capacidad de discriminación entre solutos, como en el número de solutos que podían separarse.
- Era tediosa por la necesidad de la intervención casi constante del operador, salvo que se dispusiera de colectores de fracciones automáticos, y
- No proporcionaba directamente el cromatograma al tener que aplicar una detección discontinua (off-line) a cada fracción del eluido.

Estos inconvenientes fueron restrictivos en el desarrollo de la cromatografía de líquidos en columna e hicieron que su evolución fuese más lenta que el espectacular desarrollo de la GC.

Empezaba a parecer evidente que la cromatografía de líquidos en columna necesitaba, para convertirse en una modalidad competitiva respecto a GC, trabajar a elevadas presiones en lugar de utilizar sólo la fuerza de la gravedad para hacer pasar la fase móvil líquida a través de la fase estacionaria. Así, la presión elevada (entre 500 y 5000 psi) de la fase móvil líquida:

- Permitiría reducir el tamaño de partícula de la fase estacionaria, que aunque muy empaquetada, deja que la fase móvil pase a su través. De este modo se podría aumentar espectacularmente la eficacia separativa.

- Reduciría drásticamente la duración de una separación cromatográfica (de 5 a 50 veces) en relación con la modalidad a baja presión, y se haría equiparable en este aspecto a la GC.
- Lograría una detección continua del eluido, por lo que un montaje de este tipo puede considerarse como un cromatógrafo de líquidos, es decir, un instrumento que separa y suministra información cualitativa y cuantitativa.

Lógicamente, esta nueva configuración a presión elevada comportaba complicaciones técnicas en comparación con la modalidad clásica, y un notable aumento del coste de adquisición y mantenimiento del instrumento. Pero este aspecto quedaba minimizado cuando se observaba la enorme potencialidad que presentaba, ya que podía cubrir aspectos inabordables o poco recomendables en GC (compuestos iónicos, muy polares, termolábiles, no volátiles, fases acuosas de muestra...). Su pleno desarrollo comercial se inició al comienzo de los años setenta.

Existen en la bibliografía muchas comparaciones entre las características de la LC clásica y la de alta eficacia que incluyen otros tipos de cromatografía que emplean columnas de diámetros internos menores y flujos de fase móvil muy reducidos (micro y nanocolumnas y columnas capilares).

Parámetros característicos de diferentes LCs en columna

Parámetro	LC clásica	HPLC	Micro LC	LC Capilar	Nano LC
<i>Diámetro interno de las columnas</i>	10-15 mm	1.5-4.5 mm	0.8 mm	0.18-0.32 mm	0.075-0.1 mm
<i>Longitud del lecho cromatográfico</i>	50-200 cm	3-30 cm	5-25 cm	5-25 cm	15-25cm
<i>Diámetro medio de partículas</i>	> 150-200 μm	3-40 μm	3-5 μm	3-5 μm	5 μm
<i>Flujo de fase móvil</i>	1-2 ml/min	0.2-2.5 ml/min	10-100 $\mu\text{l}/\text{min}$	1-10 $\mu\text{l}/\text{min}$	0.1-1 $\mu\text{l}/\text{min}$

La HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) (a veces sus siglas se asocian a High-Pressure Liquid Chromatography (Cromatografía Líquida de Alta Presión) e incluso, en ocasiones, a High-Efficiency Liquid Chromatography o High Speed Liquid Chromatography (tal vez, ésta última conlleva en sí alguna connotación particular)) es una técnica de separación en la que una mezcla de compuestos se distribuye entre dos fases (una fase móvil y una estacionaria), teniendo lugar la separación en función de las distintas afinidades que presente cada compuesto de la mezcla por las diferentes fases. La fase estacionaria es un sólido poroso, generalmente en forma particulada, o bien una fina capa de sustancia líquida ligada a un soporte sólido, contenido en el interior de un tubo habitualmente metálico que da lugar a la columna cromatográfica, auténtico “corazón” del cromatógrafo de líquidos. La fase móvil es un líquido, ya sea un disolvente o una mezcla de disolventes, a veces con un pH modificado mediante adición de ácidos, bases o disoluciones reguladoras.

Un instrumento HPLC está formado por: depósitos para las fases móviles, sistema de bombeo para proporcionar presión a la fase móvil, sistema de inyección de muestras, columna cromatográfica, horno termostático, detector y sistema de adquisición de datos. A veces la

columna cromatográfica va precedida de una pre-columna para impedir que lleguen a la columna componentes de la muestra que puedan dañar la fase estacionaria.

En una separación mediante HPLC, la fase móvil impulsada por la bomba, transporta una banda de muestra a través de la columna cromatográfica. Para la inyección se utiliza normalmente una válvula de seis vías que permite introducir en el flujo de disolvente la muestra contenida en un loop de volumen calibrado. Una vez en la columna, los analitos interaccionan con la fase estacionaria de tal forma que aquellos que sean más afines con la fase móvil, serán menos retenidos por la fase estacionaria y eluirán antes. Por el contrario, aquellos que tengan más afinidad por la fase estacionaria avanzarán más lentamente a través de la columna y eluirán, por tanto, más tarde. La fase móvil puede ser un disolvente puro o una mezcla de disolventes. Cuando se trata de una mezcla puede programarse la bomba para que tome disolventes de diferentes botellas en una proporción determinada y que la mezcla se realice en una cámara de mezclado. En el supuesto de que durante toda la separación se utilice siempre el mismo disolvente, se denomina isocrática. Sin embargo, es normal realizar un gradiente de composición del disolvente a lo largo de la cromatografía para mejorar la eficacia y acortar la duración del proceso. Una vez eluido cada compuesto debe ser detectado. Para ello, se colocan a la salida de la columna cromatográfica uno o varios detectores que proporcionarán una respuesta al paso de los analitos (absorbancia, fluorescencia, conductividad...). El procesado de esta señal produce el cromatograma, en el que se representa la respuesta obtenida por el detector frente al tiempo. La intensidad de cada pico será directamente proporcional al factor de respuesta y a la concentración del analito correspondiente en la muestra.

Atendiendo a la fase estacionaria activa que se emplee y al tipo de fenómeno físico que provoca la separación, encontramos diferentes tipos de cromatografía líquida.

Tipos de LC

Nombre	Fase estacionaria activa
<i>Partición</i>	Líquido retenido por un sólido soporte
<i>Adsorción</i>	Sólido con propiedades superficiales
<i>Cambio iónico</i>	Sólido con propiedades cambiadoras de iones
<i>Afinidad</i>	Sólido con propiedades de retención bioespecíficas
<i>Exclusión por tamaños</i>	Sólido con porosidad controlada
<i>Quiral*</i>	Reactivo quiral unido a fase móvil o al soporte sólido

*Muchos autores no la consideran como un tipo de Cromatografía *per se*, sino más bien incluida en la cromatografía de partición o reparto.

El conocimiento de la estructura molecular de los componentes de la muestra puede ser muy útil en la selección de un tipo de cromatografía líquida. En general, podemos decir que la cromatografía de partición o reparto se aplica a compuestos polares no iónicos; la de adsorción separa especies no polares, isómeros e hidrocarburos alifáticos; la de intercambio iónico permite analizar compuestos iónicos de peso molecular bajo; los analitos de peso molecular superior a 10.000 se separan mediante cromatografía de filtración sobre gel (de exclusión).

La cromatografía de partición o de reparto es el tipo de cromatografía de líquidos más ampliamente utilizado. El fundamento de este tipo de cromatografía es el reparto o distribución de los solutos entre una fase móvil líquida y otra estacionaria inmisible soportada sobre un sólido inerte; es decir, la causa de la discriminación entre los solutos se encuentra, de manera genérica, en las diferencias de solubilidad.

Considerando las polaridades relativas de las fases móviles y estacionarias, se distinguen dos tipos de cromatografía:

- *Cromatografía en fase normal (NP-HPLC)*: la fase estacionaria es polar, mientras que la elución se lleva a cabo con disolventes no polares, como etiléter, cloroformo o *n*-hexano.
- *Cromatografía en fase inversa (RP-HPLC)*: la fase estacionaria es no polar, tratándose normalmente de hidrocarburos tales como C₈ (n-octilo) o C₁₈ (n-octadecilo) y la elución se lleva a cabo con una fase móvil de polaridad elevada, como disoluciones acuosas conteniendo metanol, acetonitrilo o tetrahidrofurano.

La cromatografía de líquidos de partición o reparto en fase inversa es el modo de HPLC más empleado en la actualidad, ya que la mayoría de muestras de interés en diversos ámbitos tienen naturaleza hidrofílica. En esta modalidad de fase inversa, el tiempo de retención es mayor para las moléculas de naturaleza apolar, mientras que las moléculas de carácter polar eluyen más rápidamente.

En los últimos años la miniaturización se ha convertido en un área de investigación muy importante, con especial atención al estudio y desarrollo de métodos de separación miniaturizados realizándose especiales esfuerzos por conseguir una instrumentación de LC miniaturizada. La técnica de nanoLC fue introducida por primera vez en 1988 por Karlsson y Novotny y, desde entonces, ha ido emergiendo como una herramienta analítica potente, sobretodo en el campo de la proteómica, debido principalmente a la poca cantidad de muestra que requiere. Poco a poco se ha ido ampliando el campo de aplicación de esta técnica, y así podemos encontrar trabajos relacionados con la industria farmacéutica, el análisis ambiental y de enantiómeros e incluso con la industria alimentaria, aunque en mucha menos extensión. Generalmente se considera que cuando la separación cromatográfica se lleva a cabo en columnas de diámetro interno menor a 100 μm , la técnica se denomina nanocromatografía líquida, cuando se usan columnas de diámetro entre 100 y 500 μm aproximadamente se conoce como cromatografía capilar, y para columnas con diámetros alrededor de 800 μm se define como micro-cromatografía. Como es lógico, el utilizar columnas de diámetros internos comprendidos entre 10 y 100 μm hace que el consumo de fases móviles sea mínimo trabajando en este sentido a flujos muy reducidos.

Las columnas capilares que se suelen utilizar en nanoLC suelen ser de sílice fundida, empleando las mismas fases estacionarias que son utilizadas normalmente en otros tipos de cromatografía líquida. En cuanto al tamaño de partícula de estas fases estacionarias normalmente suelen estar comprendidos entre 3-5 μm . No obstante, hoy en día ya se están utilizando fases estacionarias con tamaños de partícula de 1.5-1.8 μm las cuales son comúnmente utilizadas en cromatografía líquida de ultra presión (UHPLC), ofreciendo ventajas importantes como son una mayor eficacia en la separación. También las fases móviles empleadas suelen ser las comúnmente utilizadas en LC.

Cromatografía de fluidos supercríticos

La cromatografía de fluidos supercríticos (SFC) es una técnica híbrida entre la cromatografía de gases y la HPLC, combinando lo mejor de ambas técnicas. Es importante porque permite la separación de mezclas en las que no es adecuada la aplicación de la GC ni de la HPLC. En concreto, se aplica a compuestos no volátiles o térmicamente inestables que no pueden ser separados mediante GC, o aquellos que contienen grupos funcionales que imposibilitan su detección en HPLC.

Debido a las características de la fase móvil (alta presión y temperatura) se emplean equipos parecidos a los de HPLC, con varias diferencias:

- El empleo de un horno termostático para poder controlar con precisión la temperatura de la fase móvil.
- El uso de un restrictor, empleado para poder mantener de una parte, la presión en el interior de la columna y, de otra, permitir la bajada de la presión a la salida para que el fluido supercrítico pase al estado gaseoso y el analito pueda ser detectado adecuadamente.

Básicamente, un restrictor es un tubo capilar de unos 2 a 10 cm de longitud y un diámetro interno menor al de la columna (típicamente 1/10 del diámetro), donde a la salida se expande el fluido supercrítico y pasa al estado gaseoso manteniéndose simultáneamente la presión en el interior de la columna.

Electroforesis capilar

La técnica de separación, que actualmente denominamos como Electroforesis Convencional (*electro* = electricidad y *foros* = llevar), fue introducida, por primera vez, como herramienta analítica, por el químico sueco Tiselius en 1930, aunque no fue hasta 1937 cuando se desarrolló el primer instrumento denominado “celda electroforética”, recibiendo por ello en 1948 el premio Nobel.

La electroforesis convencional es una técnica de separación en la que las sustancias a analizar se separan en función de su diferente movilidad, en sentido y velocidad, bajo la acción de un campo eléctrico. Estas separaciones electroforéticas, han sido y siguen siendo muy eficaces y de muy extensa aplicación, principalmente en la identificación o cuantificación de macromoléculas, especialmente, proteínas. Sin embargo, presentan una serie de inconvenientes: son técnicas lentas y laboriosas, tienen tendencia a ser poco reproducibles y no permiten la automatización.

Para evitar todos estos inconvenientes asociados a los fenómenos de convección térmica que se producían por llevar a cabo las separaciones en disolución, surgió una alternativa que consistió en emplear tubos capilares de diámetros muy pequeños como celdas electroforéticas, dando lugar a una nueva forma de electroforesis que se denominó Electroforesis Capilar (CE).

Las separaciones por electroforesis capilar están basadas en las diferencias en la movilidad electroforética de las especies a separar en los medios electroforéticos dentro de estos pequeños capilares. Esta técnica fue descrita originalmente como electroforesis libre en 1967, cuando Hjertén utilizó capilares de 3 mm de diámetro interno empleando campos eléctricos altos. En 1974, Virtanen describió las ventajas de usar capilares con diámetros tan pequeños.

Todos estos primeros trabajos sobre CE se llevaron a cabo con instrumentación adaptada de la electroforesis convencional y no fue hasta 1979 cuando Mikkers *y col.*, demostraron la bondad de usar capilares de teflón con diámetros internos de 200 μm en este tipo de separaciones.

A pesar de las ventajas que ya se vislumbraban del empleo de la electroforesis capilar en relación con la electroforesis convencional, estas publicaciones no despertaron gran interés hasta que se publicaron los trabajos de Jorgenson y Luckacs, en los que se empleaban capilares de diámetros de unos 75 μm hechos de vidrio pyrex; fue entonces cuando se puede considerar que comenzó la electroforesis capilar.

Los primeros estudios sobre los principios de funcionamiento de la técnica se deben a Tsuda *y col.* incluyendo el efecto del pH, densidad de corriente en el flujo electroosmótico, relaciones entre el tamaño de la muestra, corriente y el voltaje con la eficacia, etc.

La electroforesis capilar es, por tanto, una técnica bastante reciente cuyo desarrollo final tuvo lugar en los años 80; la aparición de los equipos comerciales de forma extendida se hizo patente, tan solo, hace unos 20 años.

Las principales características de la CE son: 1) Elevada rapidez de análisis, 2) altas eficacias separativas, de 10^5 - 10^6 platos teóricos por metro de columna, 3) requerimiento de pequeños volúmenes de muestra y reactivos, 4) gran variedad de posibles aplicaciones, y 5) facilidad de automatización.

Los componentes básicos de un equipo de CE son: generador de alto voltaje, viales fuente, destino y muestra, capilar (normalmente de sílice fundida recubierto de poliimida y con unas dimensiones que oscilan entre 10-100 cm de longitud y 25-100 μm de diámetro interno), sistema de termostatación, sistema de inyección de la muestra, sistema de detección y sistema de registro.

Los extremos del capilar se colocan en dos viales rellenos de disolución de separación que contienen cada uno de ellos un electrodo, ambos conectados a una fuente de alto voltaje (hasta 30 kV). La muestra se inyecta dentro del capilar a través de un vial que sustituye temporalmente el vial inicial aplicando un potencial eléctrico (inyección electrocinética) o una presión externa (inyección hidrodinámica) durante unos segundos. Después se vuelve a reemplazar el vial de muestra por el inicial, conteniendo la disolución tampón, y se aplica un potencial eléctrico a lo largo del capilar que produce la separación. Los analitos pueden ser detectados directa o indirectamente con detección óptica (UV-visible, fluorimétrica, fosforimétrica, quimioluminiscente o infrarroja) a través de la ventana del capilar que habitualmente se encuentra cerca del extremo opuesto a donde se hizo la inyección (normalmente cerca del cátodo) -detección on-columna-, o al final del capilar mediante el uso de otros sistemas de detección como la espectrometría de masas o las técnicas eléctricas -detección off- o post-columna-.

De forma básica se puede decir que la migración de las especies químicas dentro del capilar se rige por dos fenómenos, que tienen lugar simultáneamente: electromigración y electroósmosis.

La **electromigración** consiste en el movimiento neto de las especies cargadas que forman la muestra a través de la disolución tampón dentro del capilar, bajo la influencia del campo eléctrico.

La **electroósmosis** es un fenómeno que se produce siempre que se aplica un campo eléctrico a un sistema líquido (como es el medio electroforético) que esté en contacto directo con una superficie cargada (como es el interior del capilar de sílice fundida). La pared interna del capilar tiene grupos silanoles que, en contacto con la disolución reguladora de separación, se ionizan. El grado de ionización se controla principalmente mediante el pH del electrolito de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones de pH superior a 2.5-3).

Modos de separación o trabajo en electroforesis capilar

Es ampliamente reconocido que la CE es una técnica muy versátil, y esto es causado en parte por los distintos modos de separación disponibles. Además, y a diferencia de la cromatografía líquida donde el cambio de un modo a otro suele requerir el cambio de columna y fase móvil, en electroforesis capilar suele implicar únicamente el cambio de la composición de la disolución reguladora empleada. Los modos de CE más comunes son: electroforesis capilar en zona, electrocinética micelar, isotacoforesis capilar...entre otros.

Los diferentes mecanismos de separación empleados hacen que estos modos sean complementarios entre sí. En algunos casos, una separación puede ser realizada satisfactoriamente por más de un modo electroforético.

Modos de separación en electroforesis capilar

<i>Modo de separación</i>	<i>Acrónimo</i>	<i>Principio de separación</i>
Zona	CZE	Carga/tamaño
Electrocinética micelar	MEKC	Interacción hidrofóbica/iónica con micelas del surfactante
Quiral	CCE	Formación de complejos estereoespecíficos
Por afinidad	CAE	Interacciones moleculares entre ligando y analito "objetivo"
Electrocinética micelar con microemulsiones	MEEKC	Mecanismos electroforéticos y reparto cromatográfico
En gel	CGE	Tamaño molecular
Isoelectroenfoque capilar	CIEF	Punto isoelectrónico
Isotacoforesis capilar	CITP	Capacidad de migración entre tampones de distinta naturaleza
Electrocromatografía capilar	CEC	Movilidad en una solución libre y retención cromatográfica

La electroforesis capilar en zona es el más versátil y simple de los modos en CE. Fue la primera modalidad que se desarrolló, merced a los trabajos pioneros de Jorgenson y Luckas y continúa siendo la más utilizada, con un gran número de aplicaciones en diferentes campos. En el interior del capilar sólo se encuentra la disolución reguladora que se emplea para llevar

a cabo el análisis. De este modo, una vez inyectada la muestra, la separación de las diferentes sustancias se basa en su distinta relación carga/masa. Tiene la limitación de ser útil sólo para la separación de especies cargadas, no permitiendo separar las neutras.

Puesto que las muestras son introducidas normalmente desde el ánodo y el detector se encuentra al lado del cátodo, el orden de elución, determinado por la relación carga/tamaño de los analitos, es: cationes, sustancias neutras y aniones.

El hecho de que éste sea el orden de elución se debe a que los cationes se mueven a través del capilar en la misma dirección que el flujo electroosmótico (EOF), por lo que sus velocidades de migración serán más rápidas que el propio EOF. Las moléculas neutras, que se mueven a través del capilar empujadas sólo por el EOF, eluyen después de los cationes, pero sin separarse. Los aniones, por último, al poseer carga negativa, tenderán a moverse hacia el ánodo en sentido opuesto al EOF, pero generalmente éste es mayor que las velocidades electroforéticas de los aniones, por lo que estos se desplazan hacia el cátodo eluyendo en último lugar.

Sistemas de detección

De forma general, cuando se acopla un detector a un sistema de separación, el analista persigue que el detector cumpla una serie de requisitos que le aseguren que los analitos previamente separados sean detectados adecuadamente:

- Presentar una buena sensibilidad.
- Proporcionar límites de detección bajos (combinación de una alta sensibilidad con una baja fluctuación en la señal de fondo).
- Presentar una determinada selectividad a una serie de analitos o a uno determinado, evitando así posibles interferencias en la señal por parte de otras sustancias presentes en la muestra.
- La respuesta debe ser rápida ante un cambio en la concentración de analito.
- La presencia del detector no debe perjudicar a la eficacia de la separación.
- Proporcionar señales fiables: reproducibles y estables en el tiempo.
- Idealmente, la señal debe ser nula en ausencia de analito.
- Proporcionar cambios en su señal en el margen más amplio posible de concentración o masas del analito, es decir, que presente un amplio intervalo lineal.

Son varios los detectores que se pueden acoplar a las técnicas de separación descritas y se pueden clasificar en tres categorías: técnicas ópticas, electroquímicas y “otras”, que incluiría las técnicas radioquímicas y la espectrometría de masas. De entre todas ellas, la Espectrometría UV es la más utilizada por las razones ya bien conocidas y la Espectrometría de Masas es, sin duda, la que posee mayor relevancia en la actualidad. por lo que es conveniente que la describamos.

Espectrometría de masas

Corría el año 1912 cuando el científico J. J. Thomson (Premio Nobel en 1906) se las ingenió para crear el primer espectrómetro de masas. Pero el mérito no fue solo de él, ya que la espectrometría de masas comenzó a ver la luz en el año 1886 cuando Goldstein descubrió los

iones positivos; siguió tomando forma con W. Wien que consiguió analizarlos por deflexión magnética en 1898; y dio un paso definitivo cuando W. Kaufmann consiguió analizar los rayos catódicos usando campos eléctricos y magnéticos paralelos en 1901. Todos estos avances permitieron a la privilegiada mente de J. J. Thomson idear el primer espectrómetro de masas.

A partir de ese día se comenzó a usar en los laboratorios de química para separar iones atómicos y moleculares en función del cociente masa/carga con la unidad Thomson (Th) como unidad fundamental. Y aunque su avance era firme, podemos decir que su espectacular desarrollo no se produjo hasta el final de la década de 1960, cuando Dole y *col.* describieron el primer uso analítico del electrospray (ESI), y alrededor de 1980, cuando Fenn y *col.* llevaron a cabo el principal desarrollo de la técnica ESI para su uso con espectrometría de masas, lo que le valió a este último la obtención del Premio Nobel.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica que se basa en ionizar moléculas gaseosas, acelerarlas en un campo eléctrico, y luego separarlas de acuerdo con su relación masa-carga. El proceso de ionización, a veces, suministra suficiente energía para que las moléculas se rompan en diversos fragmentos. La corriente total de todos los iones generados se registra en un intervalo amplio seleccionado de masas. El cromatograma que representa la corriente iónica total frente al tiempo de elución se denomina TIC (Total Ion Current o Total Ion Chromatogram). También se puede hacer un seguimiento de un ión seleccionado, si se busca un compuesto o una clase de compuestos determinados (EIC o EIE, Extract Ion Chromatogram o Extract Ion Electropherogram). El eje de abscisas de un espectro de masas es m/z , la masa del ión (m , en unidades de masa atómica) dividida por el número de cargas que lleva (z). La mayoría de los iones tienen una sola carga, de modo que m/z es equivalente a la masa del ión en unidades de masa atómica.

La MS es probablemente, de entre todas las herramientas analíticas al alcance del científico, la de aplicación más general. Recientemente, se ha utilizado no sólo en investigación, sino también en análisis de rutina de los procesos industriales, en control de calidad, etc.

Sus principales cualidades son:

- Capacidad de identificación, ya que proporciona un espectro característico de cada molécula.
- Poder cuantitativo: permite medir la concentración de las sustancias.
- Gran sensibilidad: habitualmente se detectan concentraciones del orden de ppm o ppb
- Universal y específica.
- Proporciona información estructural sobre la molécula analizada.
- Suministra información isotópica.
- Es una técnica rápida, ya que se puede realizar un espectro en décimas de segundo y por ello puede monitorizarse para obtener información en tiempo real sobre la composición de una mezcla de gases.

Se puede utilizar directamente sin necesidad de poner delante una técnica separativa (experimentos de infusión directa), sin embargo, la combinación de una técnica de separación de alta eficacia (GC, LC y CE) con la espectrometría de masas como sistema de detección, da lugar a una herramienta muy útil en el análisis de muestras complejas.

Los analitos salen de la técnica separativa correspondiente y se introducen en la fuente de ionización donde se evaporan, se ionizan y se aceleran. Los iones acelerados pasan a uno de los numerosos tipos posibles que hay de analizadores de masas donde se separan, de modo

que diferentes tipos de iones llegan al detector a diferentes tiempos. Esta pequeña corriente de iones se amplifica y da la señal de salida que se registra y procesa a través de un sistema informático. La versatilidad de la MS se debe en parte al amplio abanico de posibilidades de cada una de las tres secciones de un espectrómetro de masas: fuente de ionización, analizador y detector. El resultado que se obtenga de un espectrómetro de masas, depende notablemente de cuáles sean la interfase (o fuente de ionización) y el analizador utilizados.

El mayor problema que surge a la hora de acoplar las diferentes técnicas separativas con la MS está relacionado con la forma de introducir la mezcla en la fuente de ionización. Para ello se han descrito diversos tipos de **interfases** donde se produce la evaporación y/o ionización de las moléculas. Como característica general a todas ellas podemos señalar que una ionización exitosa requiere que una cierta energía sea transferida al analito. Se suelen clasificar atendiendo al grado de fragmentación que provoquen en la estructura del compuesto a estudiar en: técnicas de ionización fuertes, como impacto electrónico (EI) y otras más suaves, entre las que se pueden encontrar electrospray (ESI), ionización química a presión atmosférica (APCI), fotoionización a presión atmosférica (APPI), ionización química (CI), bombardeo atómico (FAB), desorción/ionización láser asistida por matriz (MALDI), etc.

Si alguna de ellas requiere especial atención, es sin duda: **electrospray (ESI)**. En el proceso de formación del electrospray, el cual se lleva a cabo a presión atmosférica, intervienen diversos mecanismos al mismo tiempo. La muestra, procedente del capilar de separación, y con la ayuda de un gas nebulizador, se carga y dispersa simultáneamente.

El disolvente se va evaporando de las microgotas formadas (desolvatación) y éstas van aumentando su densidad de carga eléctrica. Como consecuencia, las gotas se encogen y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a aproximarse entre sí debido al campo electrostático que se aplica entre la salida del capilar y la entrada al espectrómetro de masas ($\pm 2-5$ kV). En cierto momento, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión de la superficie que mantiene unidas las gotas en forma esférica, y las pequeñas gotas se rompen. Debido a fuerzas de repulsión coulombica, aumenta la tensión superficial de las microgotas y éstas acaban “explotando” (“explosiones de Coulomb”), formándose así una serie de pequeñas gotas cargadas que seguirán sufriendo procesos de evaporación y explosión sucesivos hasta que, finalmente, se forman iones cargados desnudos que pasan a fase gaseosa con una o más cargas y son atraídos hacia la entrada del espectrómetro de masas como consecuencia del voltaje aplicado.

En el proceso de ionización se pueden formar iones mono- o multicargados, lo que permite detectar compuestos con pesos moleculares muy altos empleando analizadores de masas que trabajan con un intervalo limitado de valores m/z .

La ionización se puede llevar a cabo en el modo positivo o negativo. En el modo positivo, se podrán formar iones múltiplemente protonados $[M+nH]^{n+}$ donde n es el número de protones cargados positivamente en la molécula. Del mismo modo, es posible también la formación de aductos con iones sodio, litio, potasio, amonio, etc. En el modo negativo, se observa normalmente la desprotonación de las moléculas, pudiéndose formar también iones múltiplemente desprotonados $[M-nH]^{n-}$.

En lo que concierne al **analizador de masas**, el analista puede encontrar disponibles numerosas opciones, entre las que podemos señalar como más comunes: cuadrupolos (Q), trampas de iones (IT), triples cuadrupolos (QQQ), tiempos de vuelo (TOF), transformada de fourier-resonancia de ión ciclotrónica (FT-ICR), orbitrap (OT), acoplamientos entre varios de

los mencionados, etc. Todos ellos se distinguen en la exactitud que ofrecen al determinar la masa molecular de los analitos (error entre la masa exacta determinada y el valor teórico), la capacidad o incapacidad para determinar distribuciones isotópicas (True isotopic pattern), el poder llevar a cabo experimentos MS^n (de gran utilidad para determinar estructuras químicas), la velocidad de scan, el rango de masas en el que pueden medir, y la resolución (el valor de la masas dividido entre la diferencia de masa Δm entre dos iones muy próximos).

Hablaremos algo más en detalle acerca de TOF y IT, por poner un ejemplo de un analizador con gran exactitud y capacidad para determinar distribuciones isotópicas, y otro con capacidad de hacer análisis MS^n .

Tiempo de vuelo (TOF)

El analizador de tiempo de vuelo (TOF) separa los iones según la distinta velocidad que adquieren en su interior en función de su relación m/z . En primer lugar, los iones son extraídos de la cámara de ionización y acelerados hacia el tubo de vuelo mediante un campo electrostático que les aporta una elevada energía cinética. Los iones de mayor m/z “volarán” a menor velocidad que los de menor m/z . La resolución entre los iones de diferente m/z será mejor cuanto mayor sea longitud del tubo (habrá una mayor separación de los iones en el tiempo) y cuanto menor sea la dispersión en energías de los iones formados en la fuente.

La muestra disuelta entra en la cámara de nebulización donde tiene lugar la formación del spray. Los iones formados atraviesan la unidad de desolvatación, que separa las zonas a presión atmosférica de la primera zona de alto vacío, y que consta de un calentador del gas de secado y un capilar de cristal. Se llega a través de ella a la zona de transmisión o transferencia óptica que consta de tres módulos que están a alto vacío, separados entre sí por varios skimmers. Los dos hexapolos son los que transfieren los iones hasta la zona de alto vacío, mientras que las lentes enfocan o dirigen dichos iones. La zona de aceleración ortogonal contiene dos de estas lentes y acelera los iones hacia el tubo de vuelo aplicando un campo eléctrico intermitente.

En función de su masa, los iones se introducen en mayor o menor medida en el reflector. Detrás del mismo hay zonas de tensión que repelen los iones que le llegan; lógicamente, se repelen los iones pequeños con más facilidad.

El detector es un detector de impacto electrónico que consiste en una serie de placas a alto voltaje que convierten el impacto de los iones en señales eléctricas. En el detector hay millones de poros muy pequeños que están internamente recubiertos con una capa semiconductor; cada uno de ellos trabaja como un multiplicador de electrones independiente. También hay un detector de referencia.

Este analizador de tiempo de vuelo (TOF) es rápido y sensible, permite la determinación de masas exactas empleando TIP (True Isotopic Pattern) para el análisis en dos dimensiones, y da óptimos resultados en un rango muy amplio sin requerir tediosos procesos rutinarios de recalibración. Es decir, aporta una mayor fiabilidad de los resultados aplicando un método analítico casi bidimensional: combinando la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica.

A diferencia del TOF en el que solamente se pueden llevar a cabo análisis de masas (MS), el analizador híbrido Q-TOF tiene la característica adicional de poseer un cuadrupolo y una celda de colisión previa al TOF con lo que tiene la capacidad de realizar tanto análisis de MS

como de MS/MS, es decir producir fragmentos de iones precursores (Q) y determinar posteriormente las masas exactas de dichos fragmentos (TOF). En este sentido podemos tener una información mucho más completa, sobre todo en el caso de que se obtengan isómeros de masa.

Trampa de iones (IT)

En una trampa de iones se pueden diferenciar las siguientes partes: la interfase (ESI en este caso), la denominada zona de “transporte y convergencia” de iones con los skimmers, octopolos y lentes; el analizador (IT); y el detector.

La primera zona es la cámara de formación del spray (la interfase), donde se nebuliza la solución de la muestra y se ioniza a través de un proceso de desolvatación. La zona de “transporte y focalización” de iones posee cuatro zonas de alto vacío. Los iones a través del capilar de vidrio pasan a la zona de transporte y focalización. El skimmer elimina el gas de secado, entonces los iones pasan al octopolo que los transporta y guía desde detrás del skimmer hasta el detector atravesando una serie de lentes.

Los iones formados en la fuente entran en el analizador donde se aplican diferentes voltajes generando un campo eléctrico tridimensional en la cavidad de la trampa. Este campo atrapa y concentra los iones dada su trayectoria de oscilación estable. La naturaleza de la trayectoria depende del potencial y de la relación masa/carga (m/z) de los iones. Durante la detección, los potenciales de los electrodos se alteran sometiéndolos a una rampa lineal de radiofrecuencia (RF) para provocar inestabilidad en las trayectorias de los iones y expulsarlos en la dirección axial en función de su relación m/z dando lugar a un espectro de masas.

Una vez que los iones se encuentran atrapados dentro de este analizador se puede llevar a cabo bien el análisis de sus masas (obteniéndose el espectro de MS) o bien el aislamiento de uno o varios iones precursores y su posterior fragmentación (dando lugar a lo que se denomina espectros de MS/MS o espectros MS²). Después del analizador, los iones pasan al detector, que tiene también una serie de lentes y un sínodo que dirigen los iones hasta del propio detector.

En nuestro grupo de investigación, una de las aportaciones más importantes alcanzada mediante el uso del tipo de instrumentación aquí descrita, ha sido la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos funcionales. Nuestro trabajo se ha visto respaldado por un gran número de publicaciones en este campo. Es por ello, que ahora sea adecuado dedicar parte de este discurso a hacer algunas consideraciones sobre alimentos funcionales, compuestos bioactivos y el concepto de biodisponibilidad.

Alimentos funcionales y nutracéuticos

Desde los orígenes de las primeras civilizaciones se ha sospechado la relación existente entre los hábitos alimenticios y la salud. Ya en el siglo V a. C., Hipócrates afirmaba: “*deja que el alimento sea tu medicina, y que la medicina sea tu alimento*”, sin ser consciente de cómo su principio seguiría teniendo vigencia 2500 años después. No obstante, las conexiones concretas no han sido fundamentadas hasta el siglo XIX. Durante la época decimonónica y

mitad del siglo pasado, la observación médica y la experimentación animal y bioquímica han ido demostrando el importante papel que juega la alimentación en diversos procesos bioquímicos. Por un lado, la dieta suministra los nutrientes necesarios para satisfacer los requerimientos metabólicos de un individuo. Por otro, más allá de los beneficios nutricionales aceptados, la alimentación produce una serie de efectos fisiológicos beneficiosos al modular funciones específicas; de ahí que puede no sólo ayudar a alcanzar una salud óptima, sino además reducir los riesgos de padecer determinadas enfermedades.

Ciertas tendencias de nuestra sociedad actual han favorecido el desarrollo de la investigación centrada en el efecto fisiológico de una alimentación equilibrada, como son:

- El creciente costo sanitario.
- El aumento paulatino de la esperanza de vida con el consiguiente aumento de la población mayor de 65 años.
- El deseo de una mejor calidad de vida.
- Un mayor conocimiento de la relación dieta y salud.

Como consecuencia de estos cambios en la ciencia de la nutrición surge toda una nueva generación de productos, así como de conceptos, muy similares entre sí como son los alimentos funcionales, nutracéuticos, complementos alimenticios, alimentos enriquecidos, medicinales y saludables, entre otros. La terminología relativa a este tipo de alimentos no se ha consensuado hasta hace poco, lo que ha dado lugar a que el ámbito de estos de conceptos se superponga y pueda dar lugar a confusiones. Los factores que diferencian unos términos de otros son: la propia naturaleza del alimento, el efecto esperado sobre la salud, la forma de presentación, a quién va dirigido y su procesado.

En Europa, el primer documento consensuado sobre conceptos científicos en relación con los alimentos funcionales fue elaborado en 1999 por un grupo de expertos coordinados por el ILSI (Internacional Life Sciences Institute), según el cual se define un *alimento funcional* como aquél que contiene un componente, nutriente o no, con efecto selectivo sobre una o varias funciones del organismo, con un efecto añadido por encima de su valor nutricional y cuyos efectos positivos justifican que pueda reivindicarse su carácter funcional o incluso saludable. Debe resaltarse que los alimentos funcionales son considerados como alimentos, demostrando su efecto en cantidades que se encuentran de forma normal en la dieta y que se consumen como parte de unos hábitos alimenticios comunes.

Los *complementos alimenticios* quedan definidos en el Real Decreto 1275/2003 como productos alimenticios cuyo fin es complementar la dieta normal; de modo que son fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados de forma que permitan una dosificación determinada del producto, debiendo tomarse en pequeñas cantidades unitarias. Se distinguen de los alimentos funcionales, tanto en que son complementos de alimentación, y no sustitutivos de ésta, como en que su forma es parecida a la de los medicamentos, ya que se comercializan de forma que permitan una dosificación determinada del producto.

En 1996 la Fundación para la Innovación en Medicina (FIM) definió el término *nutracéutico* como un alimento, o parte de un alimento que proporciona beneficios médicos o saludables, incluyendo la prevención, y/o tratamiento de enfermedades. Estos productos pueden ir desde nutrientes aislados, complementos alimenticios, alimentos diseñados genéticamente o alimentos funcionales, hasta productos herbales y alimentos procesados. De la definición anterior puede deducirse que cualquier alimento o parte de un alimento puede ser un nutracéutico si presenta beneficios para la salud. Sin embargo, el concepto de nutracéutico ha

sido recientemente reconocido como aquel suplemento dietético que proporciona una forma concentrada de un agente presumiblemente bioactivo de un alimento, presentado en una matriz no alimenticia y utilizado para incrementar la salud en dosis que exceden a aquellas que pudieran ser obtenidas del alimento normal. Según esta definición, englobaría a los complementos alimenticios pero no a los alimentos funcionales. Aunque existe gran confusión respecto a las diferencias entre estos dos términos, el ámbito de los nutracéuticos puede considerarse significativamente distinto al de los alimentos funcionales por varias razones. En primer lugar, porque mientras que los nutracéuticos participan en la prevención y el tratamiento de enfermedades, los alimentos funcionales son relevantes sólo en la reducción de enfermedades. Por otro lado, mientras que los nutracéuticos incluyen complementos alimenticios, así como otro tipo de alimentos, los alimentos funcionales se presentan en forma de alimento ordinario.

Según el Codex Alimentarius, un *alimento medicinal* es aquél que está especialmente procesado o formulado, y presentado para el tratamiento con una dieta específica de diversas enfermedades. Estos alimentos están destinados para su uso únicamente bajo supervisión médica para satisfacer requerimientos nutricionales en condiciones médicas específicas.

En las últimas décadas, los investigadores han comenzado a identificar de forma aislada los componentes que hacen que un alimento sea funcional, y a determinar los beneficios concretos que éstos proporcionan a nuestro organismo. Sin embargo, es importante resaltar que los estudios sobre componentes individuales, o mezclas de los mismos suelen dar resultados distintos a los que aporta el alimento que los contiene, debido a que las interacciones entre componentes son muy complejas. Algunos de los efectos de dichos componentes pueden ser aditivos, sinérgicos, potenciadores, inhibidores, enmascaradores, neutralizadores, o incluso antagonistas.

Los componentes funcionales más destacables son: fibra, azúcares de bajo aporte energético, aminoácidos, ácidos grasos insaturados, fitoesteroles, vitaminas y minerales, bacterias ácido-lácticas, sustancias estimulantes o tranquilizantes y antioxidantes. Dentro de los antioxidantes naturales cabe destacar la importancia de los compuestos fenólicos o polifenoles, que están siendo objeto de numerosos estudios durante las últimas décadas.

Problemática en la determinación de compuestos bioactivos

Los nutrientes que proporcionan los alimentos son de dos tipos: *macronutrientes*, que se requieren en mayor proporción (proteínas, carbohidratos y lípidos), y *micronutrientes*, que, aunque se necesitan en menor cantidad, son fundamentales para el organismo por intervenir en funciones vitales (vitaminas, minerales, ácidos grasos y aminoácidos esenciales). La funcionalidad de un alimento está muy relacionada con alguno de los componentes “no nutrientes”, como por ejemplo los *compuestos bioactivos* (también llamados *fitoquímicos* cuando se trata de compuestos de origen vegetal), cuya presencia y concentración va a estar en función de diversos factores (climatológicos, agronómicos, tecnológicos o culinarios, entre otros).

A pesar de no tener una función nutricional clásicamente definida, o no considerarse esenciales para la salud humana, los compuestos bioactivos poseen cierta actividad biológica dentro del organismo, que se traduce en bienestar para el individuo y en menor riesgo de padecer determinadas enfermedades. Son los que le confieren al alimento aquellas características específicas que lo convierten en funcional.

Los compuestos bioactivos, y especialmente los polifenoles naturales constituyen un grupo de gran complejidad que abarca desde moléculas simples, como ácidos fenólicos, hasta compuestos altamente polimerizados, como los taninos. A esta complejidad se suma el hecho de que en la naturaleza se presentan principalmente en forma conjugada, con uno o más residuos de azúcar unidos a los grupos hidroxilo. Además, los azúcares asociados pueden presentarse como monosacáridos, disacáridos, e incluso oligosacáridos. Aunque la glucosa es el residuo de azúcar más común, también pueden unirse a galactosa, ramnosa, xilosa y arabinosa, así como a ácidos glucurónico y galacturónico y a muchos otros. Son comunes también las asociaciones con otros compuestos, como ácidos carboxílicos y orgánicos, aminas y lípidos, así como las uniones con otros fenoles.

De esta forma, teniendo en cuenta que los más de 8000 compuestos fenólicos conocidos pueden conjugarse fundamentalmente con cinco azúcares en distintas posiciones queda patente que las posibilidades son muy elevadas. En consecuencia, la identificación de los compuestos fenólicos presentes en una matriz de origen vegetal es una tarea sumamente compleja que requiere el empleo conjunto de técnicas analíticas sofisticadas, que nos aporten información complementaria.

Para evaluar los efectos biológicos de estos compuestos, así como de cualquier fármaco o componente alimenticio, uno de los aspectos más importantes a tener en cuenta es su **biodisponibilidad**. En ella influyen factores tales como estructura química, absorción, distribución, metabolismo y eliminación. El término biodisponibilidad ha sido tomado del campo de la farmacología, donde fue definido originariamente como “proporción y extensión de un principio activo determinado que alcanza el sitio de acción”. Ahora bien, dado que este concepto es generalmente, física y éticamente inalcanzable en humanos, la definición farmacológica ha sido reformulada como “la fracción de una determinada dosis oral (compuesto original, o sus metabolitos) de una preparación determinada que alcanza la circulación sistémica”.

Concepto de Bioanalítica

Iniciamos esta intervención allá por el 1500 con Monardes y nos introdujimos en el campo de las separaciones con Tswett en los principios del siglo XX; para ajustarnos al título de este discurso, y enlazar con las aplicaciones de interés que se van a exponer, hemos de definir ahora el concepto de Bioanalítica.

Numerosos autores han resaltado la posición central que ocupa la Química en el desarrollo del conocimiento científico y cómo en el marco de su proceso de construcción surge paralelamente una integración dialéctica con otras Ciencias que ha dado pie a la aparición de los ámbitos de la Química-Física, la Bioquímica, la Química Ambiental, la Química Clínica, etc.

Sabemos que la **Química Analítica** se ha definido como una ciencia metrológica, que desarrolla, optimiza y aplica herramientas de tipo material, estratégico o metodológico de muy distinta naturaleza (química, física, matemática, bioquímica, biológica, etc.), las cuales se materializan en procesos de medida para obtener información de calidad, ya sea de naturaleza parcial (presencia, concentración, estructura de los analitos o especies (bio)químicas), o bien de naturaleza global acerca de sistemas de variada naturaleza (química, bioquímica y biológica) en el espacio y en el tiempo, con la finalidad de resolver los problemas según demanda la sociedad, los científicos o los técnicos. A esta definición se ha

llegado tras considerar que las metodologías analíticas aportan información multidimensional, normalmente gracias al empleo de diferentes técnicas analíticas individuales. En estos últimos años, el avance producido en el campo científico de las ciencias de la vida se debe, en gran parte, al hecho de poder disponer de nuevas técnicas analíticas.

Para alcanzar el concepto de la Bioanalítica, podría resultar muy interesante relacionar la definición de Química Analítica con la de Bioquímica. La **Bioquímica** es el estudio químico de los seres vivos, especialmente de la estructura y función de sus componentes químicos específicos, como son las proteínas, carbohidratos, lípidos y ácidos nucleicos, además de otras pequeñas moléculas presentes en las células. La Bioquímica puede también ser definida como la Química de las reacciones mediadas por las enzimas, en el interior de los seres vivos, o en el tubo de ensayo con enzimas naturales o artificiales y otros agentes químicos.

En este contexto, el uso de herramientas analíticas avanzadas aplicadas al estudio y comprensión de procesos bioquímicos, podría definirse como Bioanalítica. Dicho de otro modo, la **Bioanalítica** es la aplicación de las técnicas y/o métodos instrumentales utilizados en Química Analítica para el estudio, de las sustancias presentes en los organismos vivos, y de las reacciones químicas en las que se basan los procesos vitales. Otra posible definición sería: la Bioanalítica es la Química Analítica en la era de las “Ciencias ómicas”. El concepto “ómicas” recoge aquellas disciplinas como la genómica, la proteómica, la transcriptómica, la metabolómica, además de la epigenómica, nutrigenómica, etc. Todas ellas aportan grandes avances en el conocimiento básico de las cuestiones biológicas. Además, suponen un enorme desarrollo en el campo del análisis de la funcionalidad celular y en sus aplicaciones biotecnológicas.

Se denomina genómica al conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio integral del funcionamiento, el contenido, la evolución y el origen de los genomas. Proteómica es, sin embargo, el estudio a gran escala de las proteínas, en particular de su estructura y función. Las proteínas son partes vitales de los organismos vivos, ya que son los componentes principales de las rutas metabólicas de las células. El término proteómica fue acuñado en 1997 como una analogía con la genómica, el estudio de los genes. La palabra “proteoma” es la fusión de “proteína” y “genoma”, y fue acuñada por Marc Wilkins en 1994, mientras trabajaba en ese concepto como estudiante de doctorado. La transcriptómica, por su parte, estudia y compara transcriptomas, es decir, los conjuntos de ARN mensajeros o transcriptos presentes en una célula, tejido u organismo. Cuando hablamos de metabolómica, nos referimos al conjunto de ciencias y técnicas dedicadas al estudio completo del sistema constituido por el conjunto de moléculas que constituyen los intermediarios metabólicos, metabolitos, hormonas y otras moléculas señal, y los metabolitos secundarios, que se pueden encontrar en un sistema biológico. Otro término relacionado con los que acabamos de definir es, por ejemplo, la epigenética, que ha surgido como un puente entre las influencias genéticas y ambientales. La definición más comúnmente encontrada del término epigenética es “el estudio de cambios heredables en la función génica que se producen sin un cambio en la secuencia del ADN”.

Parece interesante en este punto, definir otros conceptos importantes en el contexto de las ciencias ómicas, como son los de foodomics (término tan reciente, cuya traducción idónea al castellano aún no ha sido acuñada), nutrigenética y nutrigenómica. Foodomics puede entenderse como una nueva disciplina en la que los alimentos son estudiados desde una perspectiva global, incluyendo sus múltiples conexiones con la nutrición y la salud, mediante el empleo de técnicas ómicas. El interés en Foodomics coincide con una clara tendencia en

medicina y biociencias hacia la prevención de enfermedades futuras, y podría mejorar el bienestar y la confianza de los consumidores y asegurar el cumplimiento de la legislación. Es posible encontrar una estrecha relación entre Foodomics, la genómica nutricional, la nutrigenómica y la nutrigenética. La nutrigenética estudia la distinta respuesta de los individuos a la dieta en función de sus variaciones específicas en el genoma (hipo-, normo- e hiper- respondedores). Incluye la identificación y caracterización de variantes genéticas que se relacionen con una respuesta diferente a los componentes de la dieta para los fenotipos de interés, y su objetivo es generar recomendaciones específicas sobre la mejor composición de la dieta para el óptimo beneficio de cada individuo. Se denomina también “nutrición personalizada” o “dieta a la carta”. La nutrigenómica estudia la interacción de los nutrientes con los genes. Ya se sabe que hay muchos genes cuya expresión es sensible a la presencia de determinados ingredientes en los alimentos. Combinando el estudio de sólo aquellos genes clave en patologías concretas (o el estudio de la expresión de genes de forma general) con marcadores de punto final (proteínas y/o metabolitos), sería posible diseñar un sistema de evaluación de eficacia de alta fiabilidad (y bajo coste relativo). La nutrigenómica se centra en el estudio de los mecanismos moleculares y celulares que explican los efectos de los nutrientes. En concreto, examina la interacción entre nutrientes y la expresión génica. También se centra en la caracterización de nuevas proteínas derivadas de la expresión de dichos genes y de las funciones fisiológicas de estas proteínas, incluyendo el estudio de metabolitos derivados de la actividad de dichas proteínas.

Todas las “ómicas” tienen en común que se basan en análisis de un gran volumen de datos, por lo que hacen uso de la Bioinformática y aquellas técnicas automáticas en la interpretación de datos. Su integración genera un conocimiento que permite estudiar organismos que son ahora desconocidos así como sus funciones, todo a través de su rastro genético.

En nuestro grupo de investigación, dentro de las “ómicas”, nos interesamos especialmente por la Metabolómica, que tal y como hemos dicho, se define como el análisis exhaustivo en el que todos los metabolitos de un sistema biológico son identificados y cuantificados. Debido a la enorme dificultad de llevar a cabo un estudio metabolómico completo, suelen emplearse distintas aproximaciones analíticas que pueden ayudar a resolver ciertas cuestiones específicas. Estas aproximaciones contribuyen al objetivo de la metabolómica e impulsan el crecimiento de mejoras tecnológicas y metodológicas. Incluyen los perfiles metabólicos, la huella dactilar metabólica y la metabolómica.

En la actualidad, destaca en este campo la elaboración de perfiles metabólicos que abarcan la identificación y cuantificación mediante un procedimiento analítico concreto de un conjunto predefinido de metabolitos de identidad conocida o no, y pertenecientes a una ruta metabólica seleccionada. Dentro del ámbito de los perfiles metabólicos se ha prestado una atención considerable a los compuestos fenólicos y los productos de su metabolización, debido a los diversos estudios *in vitro* e *in vivo*, así como a los ensayos clínicos y estudios epidemiológicos que han mostrado su bioactividad a distintos niveles. Pero para poder establecer la capacidad preventiva de estos compuestos frente a ciertas dolencias, es necesario esclarecer cómo y en qué medida se produce la absorción de dichos compuestos, su biodisponibilidad, las rutas metabólicas que siguen, así como su mecanismo de actuación, ya sea a nivel celular en ensayos *in vitro* o bien a un nivel superior en ensayos *in vivo*.

También quiero aquí indicar que todos los fundamentos teóricos-experimentales expuestos en esta parte, que podíamos denominar de “técnicas analíticas separativas avanzadas”, han sido utilizados, durante estos últimos quince años, en la elaboración de unos 110 trabajos SCI y 9

tesis doctorales, en donde, como anteriormente expresé, mucho tuvieron que ver mis actuales colegas de grupo en estas líneas y a los que ahora también recuerdo agradecidamente.

Hasta este momento del discurso, hemos hecho un recorrido histórico y descriptivo del estado actual del arte de lo que han sido las dos grandes líneas de investigación de nuestro grupo. Como consecuencia del trabajo de muchísimos años, ha habido innumerables aportaciones de todo tipo a la comunidad científica, algunas de las cuales ya han sido comentadas. En los últimos años, la mayor parte de éstas aportaciones, se pueden incluir en el ámbito de lo que anteriormente hemos definido como Bioanalítica.

A continuación se exponen ejemplos muy actuales, algunos de ellos tan recientes que están en vías de publicación o concreción de patente, de lo que hoy en día podemos considerar Bioanalítica, empleando principios y fundamentos de la parte luminiscente y de (bio)sensores y de lo relativo a la caracterización de compuestos bioactivos en alimentos mediante el empleo de técnicas separativas actuales.

Ejemplos de aplicaciones bioanalíticas aportadas por nuestro grupo

1) Sensor luminiscente para la determinación de O₂ en líquido ocular.

El **oxígeno molecular** juega un papel muy importante en la vida, ya que está presente en multitud de reacciones (bio) químicas. Por tanto, su determinación rápida y directa tiene especial interés en muchos casos, entre otros, en la demanda química de oxígeno (DQO), en el tratamiento de aguas residuales, en los estudios de metabolismos celulares y fisiológicos, en el tratamiento de enfermedades como el glaucoma o la diabetes, en el control de calidad de envases al vacío y atmósferas inertes, y en el control del crecimiento de bacterias de uso alimentario.

La mayor parte de los **sensores ópticos de oxígeno** desarrollados se basan en la medida del decaimiento de la luminiscencia de un complejo organometálico, inmovilizado en un soporte sólido, cuando es desactivado por el oxígeno molecular. Estos sensores ofrecen particulares ventajas ya que las interacciones indicador-oxígeno son rápidas y reversibles y la muestra queda inalterada al no existir reacción que consuma el analito. Son muchos los complejos organometálicos (OMCs) que se han desarrollado y evaluado para desarrollar fases sensoras ópticas, siendo los de Ir(III) y Ru(II) los que mejores características presentan.

Desde el año 2006, venimos colaborando con el Multi-Scale Lab (MSRL) del Instituto de Robótica y Sistemas Inteligentes (IRIS) de la ETH de Zürich con la idea de desarrollar y optimizar un micro-robot inalámbrico controlado mediante campo magnético para el control *in vivo* de la presión de oxígeno en el interior del ojo humano mediante atenuación de la luminiscencia de estos **complejos de Ru(II) y/o Ir(III)** y medidas de tiempo de vida en fase resuelta.

La retina del ojo necesita la suficiente aportación de oxígeno para realizar sus funciones primarias de visión. Sin embargo, la influencia del oxígeno en muchas enfermedades no se conoce por completo, lo cual hace necesario las medidas *in vivo* de este gas. La aportación insuficiente de oxígeno se relaciona con gran variedad de enfermedades, como diferentes

tipos de retinopatía diabética, glaucoma, degeneración macular y oclusiones de la vena retinal. La hipoxia retinal también parece responsable de iniciar angiogénesis del ojo, la cual es una de las principales causas de ceguera en el mundo desarrollado. Por tanto, la medida del oxígeno tanto en el humor acuoso como en el humor vítreo del ojo humano, tiene gran interés en oftalmología para un mejor diagnóstico y tratamiento de estas enfermedades.

El campo de los micro-robots aplicables a la medicina presenta un gran futuro, tanto para mejorar la habilidades de los cirujanos como para realizar un correcto diagnóstico y tratamiento de una forma mínimamente invasiva. Es posible pensar en un dispositivo óptico inalámbrico con una fase sensora capaz de medir la concentración de oxígeno disuelto en zonas del cuerpo humano normalmente poco accesible, como es el caso del ojo humano. Así, en el IRIS se ha desarrollado un micro-robot capaz de navegar dentro de los fluidos corporales que podría llevar a cabo una gran variedad de aplicaciones biomédicas. El prototipo es una estructura ensamblada en tres dimensiones. Este diseño híbrido permite crear cada geometría planar de forma individual con métodos MEMS (microelectromecánicos estándares). Un campo magnético externo es el encargado de alinear y empujar el robot a lo largo de sus ejes, del mismo modo que una aguja siempre se magnetiza en su eje más largo. Además, esta forma en ala reduce los efectos de deriva lateral que el flujo produce en el robot.

El dispositivo final consistiría en la deposición de la fase sensora a oxígeno, creada por nuestro grupo, que se integra en una plataforma controlada magnéticamente. Este micro-robot podrá ser introducido en el ojo mediante una pequeña incisión y su control se realizaría mediante campos magnéticos aplicados y seguimiento visual a través de la pupila. Ya se han llevado a cabo algunas experiencias que demuestran la viabilidad de este proyecto. Así, se han diseñado dos configuraciones: una primera que consiste en depositar una membrana polimérica en la superficie del nano-robot y una segunda que consiste en el diseño de nanopartículas sensibles a O_2 , que posteriormente se depositan en la superficie del nano-robot. Se ha demostrado que la utilización de nanopartículas poliméricas incrementa la sensibilidad y la rapidez de la determinación de oxígeno, por lo que es muy interesante el que continuemos investigando en esta línea.

Además, se ha puesto de manifiesto que un problema que presenta este dispositivo es la sensibilidad del detector al estar la fase sensora lejos del sistema de detección y separada por diferentes medios que dispersan la luz y expuesta mucha radiación parásita. Esto hace difícil su aplicación real, ya que el dispositivo tiene que ser pequeño, para que pueda ser inyectado en el ojo, sin que cause ningún daño. Por ello, se ha comenzado a evaluar la posibilidad del uso de herramientas avanzadas de comunicaciones para incrementar la sensibilidad del dispositivo de medida, poder disminuir el tamaño del robot sin perder con ello sensibilidad y evitar los fenómenos de dispersión y radiación parásita.

2) Biosensores luminiscentes para O₂ y pH

Uno de los grandes problemas del desarrollo de **biosensores ópticos** es la inmovilización de biomoléculas así como la implementación de estas fases sensoras en los dispositivos normales de medida, es decir, en el extremo de una fibra óptica. Para resolverlos hemos realizado el estudio de la síntesis de **nanopartículas multifuncionales**, que incluyesen, simultáneamente, tanto propiedades magnéticas, como la capacidad de unir covalentemente una biomolécula, de forma simple y en condiciones suaves.

Para incluir propiedades magnéticas en un material se pueden utilizar muchos recursos. El más simple y ampliamente usado consiste en el uso de nanopartículas de magnetita recubiertas con ácido oleico (Fe₃O₄-OA), para que puedan ser adecuadamente dispersadas en membranas poliméricas hidrofóbicas. Nuestro grupo de investigación comenzó en el año 2008 la incorporación de propiedades magnéticas en fases sensoras ópticas. Actualmente contamos con la tecnología y el conocimiento necesario para el diseño de nanopartículas magnéticas con diferentes grados de entrecruzamiento. También disponemos de la tecnología y conocimientos para la caracterización de este tipo de materiales. Hemos desarrollado **nanomateriales y/o nanopartículas tipo core-shell**, donde el corazón (core) posee las propiedades magnéticas y la cubierta (shell) posee las propiedades sensoras.

Para la inmovilización de biomoléculas de forma simple se hace uso de la reactividad de grupos tioles o amino de las biomoléculas con un grupo vinilsulfona, que está soportado en la superficie de la nanopartícula. Por tanto, se necesita diseñar partículas bien organizadas tipo “core-shell”, donde el *core* tenga propiedades magnéticas y el *shell* o cubierta tenga este grupo funcional, de modo que permita la unión de una vinilsulfona y posteriormente, la inmovilización de la biomolécula. Esto se puede conseguir uniendo la tecnología puesta a punto en nuestros laboratorios, con el diseño de nuevos monómeros funcionales que posean un grupo amino. Así, tras su copolimerización con etilen glicol dimetacrilato (EDMA), se obtienen nanopartículas híbridas súper-paramagnéticas (SP-HNPs: super-paramagnetic hybrid nanoparticles). Estas partículas, además de tener propiedades magnéticas, tienen la propiedad de contener grupos amino secundarios en su superficie, que tras reacción con una vinil-sulfona (SP-HNPs-VS) y una adición de Michael, permiten la inmovilización covalente, de forma simple y en condiciones suaves, de biomoléculas (SP-HNPs-VS-Biomolécula). Así, se ha conseguido inmovilizar covalentemente de forma exitosa enzimas ampliamente usadas en el desarrollo de biomateriales: avidina, invertasa y peroxidasa de rábano picante.

Por último, para que esta tecnología se pueda usar en el desarrollo de biosensores ópticos es necesaria la incorporación-coinmovilización de un transductor óptico, siendo los más usados la transducción óptica de O₂ y pH.

Incluir un transductor óptico de oxígeno supone acoplar un sensor óptico de esta especie gaseosa con el sistema de reconocimiento bioquímico anteriormente descrito. La mayor parte de los sensores ópticos de oxígeno desarrollados se basan en la medida del decaimiento de la luminiscencia de un complejo organometálico (inmovilizado en un soporte sólido) cuando este es desactivado por el oxígeno molecular. Estos sensores ofrecen particulares ventajas ya que las interacciones indicador-oxígeno son rápidas y reversibles y la muestra queda inalterada al no existir reacción que consuma el analito.

La inclusión de un transductor óptico de pH, sin embargo, no es tan trivial, ya que estos indicadores suelen ser poco estables y se degradan fácilmente, bien por fenómenos de fotodegradación, bien por fenómenos de precipitación dentro de la membrana, etc... Para solventar este problema nuestro grupo de investigación ha puesto a punto una nueva

metodología para la síntesis de polímeros ópticos sensibles a pH con pKa ajustable. Estos polímeros contienen un monómero sensible a pH y un ambiente químico que ajusta el valor de su pKa y, por tanto, el intervalo de pH útil del polímero en cuestión. Así, actualmente se dispone de polímeros sensibles a pH cuyo pKa varía de 6.5 a 9.5.

3) Luminiscencia como sistema de detección de biomoléculas

De todas las técnicas separativas, la **electroforesis capilar** es una de las que más ventajas ha demostrado para la separación de biomoléculas, concretamente de proteínas. Para ello, disponemos de diversos sistemas de detección óptica (absorción UV-Visible, fluorescencia, fosforescencia), y de espectrometría de masas, electroquímicos, RMN, etc... De todos ellos el que más se ha usado para la determinación y cuantificación de proteínas, tras una separación electroforética, es la absorción UV-Visible, ya que no requiere derivatizar los analitos y, por tanto, se puede usar directamente para la detección de un gran número de proteínas. No obstante, este detector presenta graves inconvenientes, de los que cabe destacar su alto ruido de fondo, su baja selectividad y su inadecuada sensibilidad. Por ello, a finales de la década de los 90, se comenzó a usar la detección fluorescente inducida por láser (LIF) como sistema de detección de biomoléculas en CE. Este sistema de detección presenta un bajo ruido de fondo, una alta selectividad y sensibilidad y ha permitido la determinación de muy diversos analitos en muestras biológicas complejas; se puede decir que es hoy en día un método de referencia en los laboratorios bioanalíticos para la determinación de biomoléculas en fluidos biológicos.

Pero también, este sistema presenta una serie de desventajas, de la que cabe destacar su baja versatilidad y su alto costo; es decir, para poder excitar las moléculas hay que usar un láser, que además de tener un precio alto es monocromático, por lo que solo es viable la excitación de pocas moléculas si no se han derivatizado previamente. En contraste con estas características de los láseres, a comienzos del siglo XXI consiguieron un gran auge los diodos fotoemisivos o LEDs. Estos nuevos sistemas de iluminación, además de ser baratos y pequeños (fáciles de miniaturizar), para su funcionamiento necesitan de baterías de baja potencia, y en el mercado se pueden encontrar LEDs que emiten en todo el intervalo del espectro visible, UV cercano. Así, se pensó que este nuevo sistema de iluminación podría usarse para el desarrollo de un nuevo detector más versátil, aunque menos sensible, para la detección de proteínas tras una separación electroforética. Por ello, en el año 2005, desarrollamos este detector.

Usamos para ello una **fuentes LED** como lámpara de excitación, una fibra óptica bifurcada para transportar la luz desde el LED hasta la ventana de detección y para recolectar la emisión luminiscente desde el capilar al sistema de detección, y un **espectrómetro CCD** como detector lumínico. Para poder enfocar adecuadamente la fibra óptica con el capilar de separación se diseñó una celda de medida, que regulaba tanto la posición del capilar con respecto a la fibra óptica como la distancia entre ambas. Para aumentar la potencia óptica de la excitación se usó un haz de fibras ópticas de excitación compuesto por 12 fibras de 200 μm de diámetro cada una, y para aumentar la potencia óptica de la luz recolectada se usó una fibra óptica de 600 μm dispuesta de forma concéntrica con las 12 fibras usadas para la excitación. De esta forma, el cono de excitación que proporcionaban las fibras de excitación iluminaba todo el cono de recolección de la fibra óptica central, encargada de recolectar la emisión luminiscente y transportarla al detector. Detector compuesto por una rendija de entrada de 500 μm , una red de difracción y un CCD de 2048 píxeles. Este dispositivo, además de ser pequeño y relativamente barato, permitía la posibilidad de excitar a una amplia gama

de longitudes de onda, simplemente cambiando el diodo LED, además de permitir medir toda la emisión desde 200 a 800 nm a tiempo real.

De las diversas aplicaciones en las que se puede usar este dispositivo, una de las más interesantes es la determinación de ficobiliproteínas: **R-ficoeritrina (RPE)** y **B-ficoeritrina (BPE)**. Las ficobiliproteínas son producidas por cianobacterias y son proteínas altamente fluorescentes. Se pueden distinguir tres clases de ficobiliproteínas: ficoeritrinas, ficocianinas y aloficocianinas. Esta familia de proteínas constituye el 60% de las proteínas solubles que se pueden encontrar en células de cianobacterias, y su interés analítico radica en la importancia de este tipo de bacterias en las ciencias marinas. Además, debido a su alto rendimiento cuántico de luminiscencia, las ficobiliproteínas son ampliamente usadas como marcadores luminiscentes en biotecnología.

Así, para la detección y determinación de estos analitos se dispuso un LED cuyo máximo de emisión estaba en 470 nm (ya que la emisión de las ficobiliproteínas se da a 508 nm) y se midió la emisión como la integral del espectro de emisión entre 550 y 650 nm, con un tiempo de integración de 200 ms y llevando a cabo 10 barridos para cada medida; es decir, una medida cada 2 s. En cuanto a la separación electroforética se llevó a cabo tras la inyección hidrodinámica a 55 mbar durante 20 s, aplicando un voltaje de 20 kV y llevando a cabo la separación a pH 8.4 usando una disolución reguladora 50mM de borato/bórico y en presencia de 10mM de ácido fítico como modificador de la disolución reguladora de separación. De este forma se consiguió resolver la separación electroforética y la detección de RPE y BPE, consiguiendo un límite de detección de 0.64 y 0.5 µg/mL respectivamente, una repetibilidad interdía con desviaciones estándares relativas cercanas al 1%, repetibilidad interdía del 1.5% y reproducibilidad cercana al 2%. Con estos resultados se demuestra, pues, la versatilidad y simplicidad de este nuevo detector para la determinación de biomoléculas que posean elevados rendimientos cuánticos de luminiscencia.

4) De la caracterización de un alimento funcional a la comprensión del metabolismo de sus compuestos bioactivos

He seleccionado un ejemplo que lleva consigo, tanto la caracterización amplia de los compuestos bioactivos presentes en un alimento funcional como el estudio del metabolismo de los mismos, intentado explicar su posible efecto beneficioso sobre la salud humana. El alimento funcional es el **aceite de oliva** y los compuestos bioactivos a los que me refiero, los **compuestos fenólicos**.

El aceite de oliva es una matriz compleja compuesta principalmente por triglicéridos, por una menor proporción de ácidos grasos libres y por un 0.5-1.5% de constituyentes no glicéricos (fracción insaponificable). Su composición varía en función de múltiples factores, tales como la variedad de aceituna, la exposición solar, la localización geográfica, las características del olivar, la forma de extracción y la conservación del aceite, etc. La fracción insaponificable contiene un gran número de compuestos que se encuentran en concentraciones del orden de miligramos por kilo de aceite (ppm) por lo que también se denominan “componentes minoritarios”. Esta fracción es, en parte, la responsable de la estabilidad oxidativa y de las características organolépticas excepcionales de estos aceites. Este grupo de compuestos incluye a los hidrocarburos, esteroides, tocoferoles, pigmentos, alcoholes grasos, compuestos volátiles y aromáticos y compuestos fenólicos.

La fracción fenólica del aceite de oliva es una mezcla heterogénea de compuestos (ácidos fenólicos, alcoholes fenólicos, secoiridoides, flavonoides, lignanos...), cada uno de los cuales posee unas propiedades distintas y ejerce diversa influencia sobre la calidad del aceite. Una propiedad muy descrita para los compuestos polifenólicos del aceite de oliva es su actividad antioxidante, aunque estudios *in vitro* han demostrado que posee otras muchas propiedades biológicas que sugieren que podría tener efectos beneficiosos para la salud. Además, los polifenoles son los responsables de las características organolépticas excepcionales que presentan los aceites de oliva vírgenes.

En un principio, los efectos saludables del aceite de oliva se atribuyeron principalmente a su alto contenido en ácidos grasos monoinsaturados, sin embargo, poco a poco ha ido aumentando la hipótesis de que los efectos beneficiosos del aceite de oliva en la dieta Mediterránea podrían no ser enteramente debidos a su composición lipídica, y componentes minoritarios como los polifenoles, podrían estar jugando un papel muy importante. Varios estudios han intentado dilucidar la contribución de los compuestos fenólicos a los efectos positivos en la salud atribuidos al aceite de oliva virgen. Por todo esto, el estudio de la fracción polifenólica del aceite de oliva nos pareció un tema interesante a desarrollar.

A pesar de la abundante bibliografía existente acerca de los fenoles del aceite de oliva, todavía hay muchos compuestos “desconocidos” en este interesante conjunto de antioxidantes y algunas familias de fenoles, como los secoiridoides, no han sido aún completamente estudiadas a causa de la complejidad de su estructura química y la de la matriz en la que están presentes. Por lo tanto, con objeto de conocer más sobre la fracción más polar del aceite de oliva, nos propusimos llevar a cabo un **estudio bidimensional (HPLC-CE-ESI-TOF MS)** en el que se unieran el poder de separación de las técnicas de HPLC y CE, con la capacidad de ESI-TOF MS para obtener una información estructural adecuada. La idea era en un primer paso aislar diferentes fracciones polifenólicas de extractos de una mezcla de aceites de oliva comerciales, empleando HPLC semipreparativa como primera dimensión. Un segundo paso lo constituiría el análisis de estas fracciones aisladas en una segunda dimensión utilizando CE acoplada a espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo (ESI-TOF MS). Se utilizó la interfase ESI por ser el modo de ionización más versátil y el que se emplea normalmente para la detección de los iones separados mediante CE.

Pensamos que al utilizar estas dos técnicas, concebidas como complementarias, podríamos mejorar la caracterización de la fracción polifenólica del aceite de oliva, identificando no sólo los compuestos ya conocidos que habían sido descritos con anterioridad, sino también nuevos compuestos presentes en esta fracción que no habían sido mencionados antes en la bibliografía. Además, el uso del TOF como sistema de detección, facilitaría la identificación, combinando la determinación de masas exactas con el análisis de la distribución isotópica.

Procediendo tal y como se ha descrito, se aislaron 17 fracciones y se identificaron unos 70 compuestos en las mismas, algunos de los cuales no habían sido descritos con anterioridad en el aceite de oliva. Particular importancia tiene la información que se obtuvo sobre los isómeros de algunos secoiridoides.

Una vez que conocíamos en profundidad la composición del aceite de oliva, intentamos continuar la investigación estudiando su biodisponibilidad. Para poner de manifiesto la acción antioxidante de los polifenoles y su papel en la prevención de enfermedades, es crucial conocer en qué extensión son absorbidos y metabolizados, su destino en el organismo (interacción con los tejidos diana) y la forma en que son excretados, es decir su biodisponibilidad. Este concepto es, como ya se avanzaba previamente, la fracción de una

determinada dosis oral (compuesto original o sus metabolitos) de una preparación determinada que alcanza la circulación sistémica.

Investigaciones llevadas a cabo con animales y humanos han demostrado que algunos compuestos fenólicos del aceite de oliva como hidroxitirosol (Hyty) y tirosol (Ty) son biodisponibles. Sin embargo, todavía se conoce poco sobre los mecanismos de absorción y rutas de biotransformación de otros polifenoles presentes en la matriz, como lignanos y secoiridoides, que además han demostrado elevados efectos anticancerígenos *in vitro*. Será necesario investigar si dichos compuestos pueden ser absorbidos por el organismo para ejercer su efecto protector después de la ingestión y cuáles son los derivados metabólicos, producidos a partir de las moléculas parentales, que podrían presentar efectos biológicos diferentes a los de sus precursores.

Por lo tanto, el objetivo del trabajo que aquí se resume fue estudiar la biodisponibilidad (absorción, metabolismo y excreción) de compuestos fenólicos del aceite de oliva pertenecientes a diferentes familias, analizando muestras de orina humana tras la ingesta forzada de aceite de oliva virgen. En este trabajo se siguieron los cuatro pasos comunes en cualquier estudio metabólico:

- 1) *Diseño del estudio*. Elegir los voluntarios para el estudio, establecer la dieta baja en polifenoles que se va seguir durante el mismo, las condiciones de la ingesta, así como la recolección y el almacenamiento de muestras.
- 2) *Procedimiento analítico*. Este apartado incluye el procedimiento de extracción de los polifenoles de las muestras de orina, además del método analítico desarrollado mediante LC-ESI-TOF MS para el análisis de los extractos obtenidos.
- 3) *Estudio estadístico*. Una vez obtenidos los cromatogramas y dada la complejidad de interpretación de los datos procedentes de muestras biológicas, el uso de técnicas quimiométricas (PCA, PLS) puede resultar muy interesante para discriminar entre las muestras de orina antes y después de la ingesta y mostrar los compuestos responsables de esta discriminación (posibles biomarcadores).
- 4) *Identificación de biomarcadores y otros metabolitos*. Usando toda la información disponible (polaridad de los compuestos, información del TOF, bases de datos) se procederá a la identificación de los posibles biomarcadores y de otros metabolitos presentes en las muestras de orina.

Se identificaron 10 biomarcadores y otros 50 metabolitos de polifenoles del aceite de oliva pertenecientes a distintas familias, lo que demuestra que todos los compuestos son absorbidos en mayor o menor medida. Sin embargo, la biodisponibilidad difiere mucho dependiendo de la estructura del compuesto; así compuestos con estructura orto-difenólica como el Hyty y sus derivados secoiridoides parecen ser los más absorbidos y metabolizados. Los compuestos fenólicos fueron sometidos a diferentes tipos de reacciones metabólicas (Fase I y Fase II), pero las más frecuentes fueron la metilación y glucuronidación. El método desarrollado se ha aplicado para el estudio cinético de los biomarcadores tras la ingesta, encontrando el nivel más alto de la mayoría de los compuestos 2 horas después de la administración.

5) *Polifenoles del olivo y cáncer de mama: Estudios "in vitro"*

El **aceite de oliva (*Olea europea*)**, como antes se indicó, está constituido por una fracción minoritaria de compuestos insaponificables que especialmente en el caso del aceite virgen extra contiene una importante variedad de familias de **compuestos fenólicos**. Estos compuestos proceden de la **aceituna** y están presentes también en otras partes del olivo como son la **hoja**, si bien en el fruto y las hojas acumulan únicamente formas glucosídicas de los componentes fenólicos. Los principales compuestos fenólicos descritos para las plantas *Olea europea* son la oleuropeína, un éster heterosídico del ácido elenólico con el 3,4-dihidroxifenetil alcohol (hidroxitirosol); la demetil-oleuropeína, el ácido derivado de la oleuropeína; el ligustrósido, un éster heterosídico del ácido elenólico con el 4-dihidroxifenetil alcohol (tirosol); y el verbascósido, un éster heterosídico del ácido cafeico con hidroxitirosol. El contenido de la oleuropeína disminuye con la maduración del fruto, mientras que su ácido es el principal componente de las aceitunas negras. El ligustrósido presente en las aceitunas verdes pequeñas, no se encuentra en las de tamaño normal. El verbascósido, descrito en las hojas del olivo, aparece a nivel de trazas en el fruto. Se dispone de menos información sobre otros constituyentes fenólicos, como es el caso de las flavonas (7-glucósido luteolina, 7-glucósido apigenina, 5-glucósido luteolina), flavonoles (3-rutinósido quercetina). Otros compuestos fenólicos que normalmente aparecen en las tablas de composición polifenólica del aceite de oliva son: oleuropeína, ácido cafeico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido o-cumárico, ácido protocatecúico, ácido sinapínico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxifenilacético y ácido homovanílico. También se incluyen como compuestos fenólicos del aceite de oliva, a los ácidos cinámico, elenólico, siquímico, aunque a estos les falta un grupo fenólico e incluso un anillo aromático.

El **cáncer de mama** es el tipo de cáncer más frecuente en las mujeres occidentales y representa alrededor del 30% de todos los tumores, y aproximadamente el 20% de todas las muertes relacionadas con esta enfermedad. En España, el cáncer de mama ha pasado a constituir en las últimas décadas un problema sanitario de primera magnitud. Cada año se diagnostican más de 15.000 nuevos casos, lo cual supone un aumento de la incidencia de un 3% anual desde los años ochenta. Aunque, los datos de prevalencia de cáncer de mama para los países de la Unión Europea ponen de manifiesto cierta distribución heterogénea, en países como Italia, Grecia, Portugal y España, y en general los países localizados en la franja mediterránea, presentan un número de casos de cáncer de mama significativamente menor que el resto de países integrantes de la Unión Europea (con reducciones de hasta el 25% en el riesgo de padecer cáncer de mama cuando se comparan mujeres que consumen grandes cantidades de aceite de oliva virgen con aquéllas que consumen otro tipo de aceite o grasa).

Los biocompuestos polifenólicos presentes de forma natural en aceites de oliva virgen extra y otros subproductos derivados de la fabricación de aceite o derivados de la hoja de olivo son reguladores directos o indirectos de la expresión y/o actividad de genes y/o proteínas claves en los procesos de transformación maligna, invasión y metástasis del cáncer de mama. Ya hemos comprobado y analizado en investigaciones que hemos desarrollado con el Instituto de Oncología de Cataluña y con la Universidad Miguel Hernández de Elche, los efectos de los compuestos fenólicos en la expresión y actividad del oncogén HER2 (ERBB2), del enzima lipogénico sintasa de los ácidos grasos (SAG; Antígeno Oncogénico-519), y del Receptor de Estrógenos (RE), tres marcadores moleculares de riesgo, progresión y respuesta al tratamiento del cáncer de mama que se interrelacionan funcionalmente.

La bioactividad del aceite de oliva virgen extra ha sido demostrada mediante diferentes ensayos in vitro en líneas celulares SKBR3, MCF-HER+ y JIMT-1. Mediante cromatografía

preparativa se han aislado una serie de compuestos polifenólicos del aceite de oliva, ácidos fenólicos, secoiridoides, lignanos,... y se han adicionado a medios de cultivo poniendo en contacto los compuestos bioactivos con las células cancerígenas. Se puede comprobar fácilmente que concentraciones terapéuticas del orden de micromolar son capaces de producir un apoptosis de las células cancerígenas a las pocas horas de contacto. Compuestos como el pinosresinol o el ligustrósido producen la muerte celular con concentraciones bastante bajas del orden de 50 micromolar.

6) *Polifenoles de hibiscus y obesidad: Estudios "in vivo" en ratones*

El *Hibiscus Sabdariffa*, comúnmente conocida en inglés como rosella y en árabe como **karkade** crece mayoritariamente en África Central y del Oeste, en el Sur y el Este de Asia. Forma un género amplio de alrededor de 220 especies de plantas de la familia Malváceas. *Hibiscus sabdariffa* incluye plantas anuales o perennes desde pequeños arbustos a pequeños árboles. Las hojas son alternas y simples y las flores son largas, conspicuas, con forma de trompeta, y con cinco pétalos, de tonos rojos o morados. La planta se utiliza mundialmente como bebida refrescante o como infusión y sus extractos se han usado tradicionalmente en medicina popular en aplicaciones que incluye la hipertensión, fiebre, enfermedades hepáticas y también por sus efectos antiinflamatorios y mutagenéticos. Se puede considerar como una variedad de té que apenas contiene sustancias excitantes, por lo que su ingesta es muy recomendable en todo tipo de personas. El alto contenido del té hibisco en flavonoides es lo que le dota de esa capacidad reguladora de la hipertensión, pero además esta sustancia tiene otras funciones ya que es un potente antimicrobiano y anticancerígeno. Estos bioactivos dotan al karkade de un alto poder medicinal pues nos protegen frente a ataques bacterianos aumentando nuestras defensas para combatirlos. Su color rojo característico se debe a los antocianos, 3-O-sambubiosil-delfinidina y 3-O-sambubiosil-cianidina entre otras. Las antocianinas que contiene son usadas como colorantes naturales en comidas. La composición química del *Hibiscus Sabdariffa* se conoce relativamente. Ensayos con TLC y HPLC han revelado la presencia de quercetina, luteolina y sus glicósidos, ácido clorogénico, gosipetin, hibiscetin y sus glicósidos, fenoles y ácidos fenólicos (ácido protocatecuico y pelargonidínico), eugenol y los esteroides β -sitoesterol y ergosterol entre otros. El ácido hidroxícitrico y su lactona, son también dos importantes componentes de esta planta.

Como es bien conocido la Organización Mundial de la Salud ha considerado la obesidad como un problema de salud pública de carácter mundial, catalogándose como enfermedad crónica caracterizada por presentar numerosas complicaciones y que ha cobrado un interés preponderantemente en los últimos años por las consecuencias que conlleva directamente en aquellos que la padecen; esto es evidente, especialmente, por la predisposición a presentar enfermedades tales como las cardiovasculares, osteoarticulares, diabetes, hipertensión, alto colesterol, hiperlipidemias, algunos tipos de cáncer y afecciones respiratorias.. Por lo anteriormente citado y aunado a su alta prevalencia, que aumenta de manera sostenida en el mundo, se ha llegado a considerar como una indudable epidemia.

Con anterioridad se estimaba que este problema de obesidad era exclusivo de sociedades desarrolladas, sin embargo, ahora esta contingencia es patente en países de bajos ingresos y pobres. A pesar de los inconvenientes que conlleva la medición de la obesidad en la población, la información actualmente disponible por los organismos internacionales de salud, agricultura y alimentación, pone de manifiesto un problema de creciente tendencia y magnitud. En la actualidad se estima el número de personas obesas en el mundo en más de 300 millones, con una amplia distribución mundial y una prevalencia mayor en países

desarrollados o en vías de desarrollo. Este incremento en la prevalencia de proporciones epidémicas está relacionado con factores dietéticos y con un incremento en el estilo de vida sedentario. La grasa corporal o tejido adiposo es un tejido con actividad metabólica y endocrina propia que produce hormonas, citoquinas inflamatorias y otras moléculas que influyen en la salud. La obesidad es el resultado de la acumulación de grasa en forma de triglicéridos en los adipocitos que, como cualquier célula, puede proliferar o entrar en procesos apoptóticos. Estos procesos pueden ser afectados por compuestos presentes en la dieta, entre los que cabe destacar a los polifenoles.

Los polifenoles tienen varias vías de actuación para controlar y prevenir la obesidad, como son la inhibición de la enzima alfa-glucosidasa presente en el intestino y por tanto, impidiendo la absorción de los carbohidratos, inhibiendo la acumulación de grasas en el proceso de maduración de los adipocitos e induciendo apoptosis de las ya existentes, activando la lipólisis y la termogénesis corporal, oxidando las grasas, activando otras rutas de señalización celular que desemboquen en uno de los casos anteriores. Nuestro grupo de investigación está colaborando desde hace varios años en la utilización de extractos de *Hibiscus Sabdariffa* en la prevención y tratamiento de la obesidad en modelos.

La demostración de la bioactividad de los extractos de *Hibiscus Sabdariffa* se ha realizado en modelos de ratones transgénicos LDL en un estudio de 16 semanas de duración. Durante las primeras semanas todos los ratones fueron alimentados con una dieta normal y a partir de la semana 10 hasta la semana 24 se alimentaron con una dieta rica en grasa y suplementada con colesterol al 25%. A su vez, los ratones control tomaron como placebo agua mientras que los otros tomaron una disolución acuosa de extracto polifenólico de *Hibiscus Sabdariffa* al 5% ad libitum. El índice de masas corporal de los ratones que sólo tomaban agua se incrementó para pasar de 24 a 34 gramos, más o menos lo que en una persona sería pasar de 60 a 90 kilogramos en dos años. Sin embargo, el peso corporal de los ratones que tomaron el extracto de *Hibiscus* se mantuvo casi constante.

Pero es especialmente en el hígado donde se observan las mayores diferencias. Si observáramos dos cortes tisulares de ambos hígados, se ve claramente que la cantidad de adipocitos en los ratones que sólo tomaron agua es bastante mayor así como el tamaño de las vacuolas. Igualmente, el número de macrófagos como indicadores de inflamación es bastante mayor en dicho tejido.

7) *Polifenoles de Hierba Luisa y procesos inflamatorios en articulaciones: Estudios "in vivo" en humanos*

La *Lippia Citriodora*, comúnmente conocida como **Hierba Luisa**, es un arbusto caducifolio originario de Sudamérica, donde crece de forma silvestre, que se introdujo en Europa a finales del siglo XVII y que ahora se cultiva en la región mediterránea. Perteneció al género *Lippia*, dentro de la familia Verbenaceae que a su vez forma parte del orden de las lamiales. Las hojas y tallos de la *Lippia Citriodora* son ricos en un aceite esencial cuyo componente principal es el citral (neral y geranial), responsable de su aroma. Las hojas contienen además diversos compuestos fenólicos como flavonoides, ácidos fenólicos y fenilpropanoides, que se consideran responsables en gran medida de las propiedades medicinales de esta planta. Estas potenciales aplicaciones hacen de este producto un nutraceutico de gran interés. Por otro lado, si bien esta actividad se atribuye en gran medida al verbascósido, no puede obviarse el hecho de que su composición es algo más compleja y también estarán presentes las moléculas

polares de la hoja, es decir, compuestos fenólicos, principalmente flavonoides, ácidos fenólicos y otros fenilpropanoides.

La **Osteoartritis (OA)**, también conocida como artritis degenerativa o enfermedad articular degenerativa, es una condición degenerativa común de las articulaciones asociada con el envejecimiento que conduce a una disminución en la movilidad con, incremento del dolor, que afecta aproximadamente a un 10% de la población de la Unión Europea (cerca de 20 millones de personas). **La Artritis Reumatoide (AR)** es una condición inflamatoria crónica que afecta a varias articulaciones en ambos lados, especialmente a las manos, muñecas, rodillas y pies. Es una enfermedad autoinmune en la que el sistema inmune ataca principalmente a las articulaciones y que según la Fundación Americana de Artritis, padecen cerca de 2.1 millones de americanos. La enfermedad tiene un impacto 2.5 veces mayor en las mujeres que en los hombres. En Europa, los números son bastante similares, con 2.5 millones de personas que la sufren, de las cuales las mujeres constituyen casi el 75% de los casos. Varios estudios han demostrado que los aniones superóxido y otras especies reactivas de oxígeno pueden ser responsables de daños en el cartílago y en la estructura del tejido sinovial tales como la destrucción de la estructura del colágeno, despolimerización del fluido hialurónico sinovial y daño mitocondrial, hechos que pueden contribuir decisivamente a la pérdida de la funcionalidad del condrocito relacionada con el envejecimiento. El cartílago y los tejidos sinoviales contienen varios sistemas de defensa antioxidante para combatir el estrés oxidativo. Algunos de estos sistemas son de carácter enzimático e intracelular (superóxido dismutasa, catalasa y peroxidasa), en cambio, en el espacio intracelular donde existe una menor defensa antioxidante, las moléculas antioxidantes pueden jugar un papel importante. Estos antioxidantes incluyen el ácido ascórbico, el alfa-tocoferol, beta-caroteno y otros carotenoides y los polifenoles antioxidantes. La presencia de estos antioxidantes en la sangre y en los tejidos está influenciada en primer lugar por su asimilación en la dieta. Por lo tanto, parece razonable establecer que un incremento de estos nutrientes antioxidantes en ella puede proporcionar protección adicional contra el daño tisular, por ejemplo, en articulaciones y contra algunas enfermedades relacionadas con el envejecimiento. Dado que existen evidencias que la suplementación con antioxidantes parece ser beneficiosa frente a enfermedades como las cataratas o la arteroesclerosis, es lógico pensar que puedan conferir beneficios para enfermedades como la artrosis.

Varios compuestos fenólicos fuertemente antioxidantes presentes en el olivo (verbascósido, hidroxitirosol, etc...) y en otras especies vegetales, como el ácido caféico, han demostrado poseer también capacidad inmunomoduladora, la cual pudiera estar relacionada con su capacidad antioxidante. Estos compuestos han puesto de manifiesto, en modelos de rata, que existe un efecto dosis dependiente con la oleuropeína, polifenol presente en el aceite de oliva y en la hoja del olivo, que tiene características antiinflamatorias y antioxidantes. El extracto de *Lippia Citriodora* y su principal compuesto bioactivo, el verbascósido, han demostrado tener capacidad antioxidante y antiinflamatoria en varios ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*. Esta actividad antiinflamatoria hace viable su uso para el tratamiento de diversas enfermedades puesto que la inflamación continúa siendo una de las principales dianas terapéuticas en una gran variedad de ellas, como son la osteoartritis y la artritis reumatoide entre otras.

En nuestro caso de la *Lippia Citriodora* se ha llevado a cabo un ensayo clínico en personas con problemas en las articulaciones. Se ensayó que la dosificación de extracto de Hierba Luisa enriquecido en uno de sus polifenoles más activos, el verbascósido, mejoraba los síntomas de dichos pacientes. Así parámetros como dolor y rigidez de la articulación y otros parámetros como funcionalidad se puede ver que mejoraban sustancialmente a partir de tratamientos de seis

semanas con respecto al grupo que tomaba placebo. Este efecto también lo hemos trasladado a nivel bioquímico, ya que proteínas con capacidad antioxidante como son la catalasa y el superóxido dismutasa, en diferentes células aisladas de la sangre como son linfocitos y neutrófilos, mejoraban sus niveles en los pacientes que tomaban el extracto de hierba luisa.



Excmo. Señor Presidente, Excmas. e Ilmas. Autoridades y Señores Académicos, con su venia, quisiera acabar personalizando mi agradecimiento, en primer lugar, en los valedores de mi candidatura, que fueron citados al principio, al igual que en mis maestros. En segundo lugar, dejando constancia de los orígenes intelectuales del contenido de este discurso que nació de varias reuniones mantenidas con mis actuales y cercanos colaboradores, a los profesores Antonio Segura, Jordi Fernández Sánchez y Alegría Carrasco, porque sus ideas y aportaciones están muy presentes en este texto, aunque la responsabilidad de los posibles errores es exclusivamente mía.

Asimismo, es obligado referirme a los colegas con quienes discutí y trabajé estos y otros temas de investigación durante mis muchos años de enseñanza e investigación en la Universidad de Granada, así como en las de Extremadura, Florida y Almería, en particular a los Profesores: Carmen Cruces, Arsenio Muñoz de la Peña, Mari Carmen Mahedero, José Luis Martínez Vidal y David Arráez.

Este discurso también lleva la marca de las aportaciones experimentales de investigadores de otras instituciones. En particular, quiero reconocer las aportaciones de los Doctores Spichiger, Cifuentes, Lercker, Menéndez, Micol, Klimant, y Dinelli.

Finalmente en este acto tan especial para mí, tengo también un recuerdo científico para mis hijos, a los que tanto quiero, los Profesores Alberto e Ignacio Fernández de las Nieves, que siempre me exhortan, con su rigor científico, entusiasmo y trabajo, a seguir haciendo Ciencia e Investigación de excelencia.

**CONTESTACIÓN DEL
ILMO. SR. D. PEDRO LUIS MATEO ALARCÓN**

Sr. Rector Magnífico

Excelentísimo Señor Presidente

Excelentísimos e Ilustrísimos Señores Académicos

Señoras y Señores

Como bien recordará el Exmo. Sr. Presidente de la Academia, supuso en su día para mí un honor inesperado el que se me asignara la preparación y posterior lectura del Discurso de contestación en nombre de la Academia al Discurso de ingreso en el Acto de Recepción de un nuevo Académico, dentro de la Sección de Físico-Químicas de la misma. Designación que desde este momento agradezco explícitamente, tanto más teniendo en cuenta mi ingreso relativamente reciente en la Academia. Más allá de eso, el honor de dirigirme ahora a esta ilustre audiencia supone además un placer y una satisfacción personal y profesional por la propia personalidad del Profesor Alberto Fernández Gutiérrez, Catedrático de Química Analítica de la Universidad de Granada, a quien me unen muchos años de trabajo académico por la afinidad y cercanía de nuestras respectivas materias universitarias. Se trata aquí de la docencia de disciplinas troncales, Química Analítica y Química Física, en la carrera de Química, tantos años Licenciatura y hoy día ya Grado y Máster. Compañero y colega durante tanto tiempo y, a pesar de eso, amigo, parafraseando aquí la ironía de aquel singular crítico de cine, Alfonso Sánchez, en la ya lejana televisión en blanco y negro de aquella España de una época, eso sí, mucho más negra que blanca. Presento pues, formalmente y con especial placer, al nuevo Académico, le transmito la afectuosa felicitación de la Academia y le ofrezco en su nombre la más cordial bienvenida.

Hablaba de honor, placer y satisfacción al referirme a mi cometido en este Acto por las razones comentadas, a las que ahora, y en justicia, quiero añadir además las basadas en sus méritos profesionales, científicos y universitarios, dados su currículo y categoría profesional, algo, por otra parte, bien sabido, pero que a lo largo de esta Contestación será nuevamente un placer ilustrar.

Realmente, si en la trayectoria profesional del Prof. Fernández Gutiérrez quisiera destacar alguna característica desde el principio sería ésta la combinación fructífera de su larga y rica actividad docente e investigadora con la no menos fecunda de alta gestión universitaria. Y hablo así precisamente con la libertad que me da el que siempre haya defendido la buena docencia y la buena investigación como los argumentos fundamentales en

los que, en su caso, se basan el prestigio y la excelencia de una universidad. En este sentido me parece significativo y reseñable el hecho de que tras más de diez años de servicios especiales, desempeñando importantes labores de alta gestión universitaria y educativa, es decir, a partir de 1997 y hasta la fecha, el protagonista de este Acto se enorgullezca de haber multiplicado casi por cuatro los parámetros usuales que caracterizan la actividad y producción científica, ya sean cantidad y calidad de proyectos y contratos de investigación, de artículos publicados en revistas reconocidas o de tesis dirigidas.

Aún añadiría otra faceta en su labor investigadora: se trata de que dentro de una disciplina, la Química Analítica, que *a priori* podría prejuzgarse de fundamentalmente “aplicada”, su actividad investigadora incluya tanto la denominada ciencia básica como la aplicada. Algo de agradecer, añadiría, en tiempos de crisis y cambios en los que no parece sino que sin desarrollo, innovación y transferencia no es posible considerar a un investigador o a un grupo de investigación como de excelencia, sin importar la posible excelencia de la propia investigación que desarrolle. Recuerdo en este contexto las palabras del recientemente fallecido William N. Lipscomb, Premio Nobel de Química en 1976 concedido por su trabajo sobre la estructura de los boranos, cuando decía: “*El proceso creativo requiere, primero, unas buenas nueve horas de sueño por la noche. Segundo, no debe estar bajo la presión de producir aplicaciones prácticas*”. No sabría si es hoy día más difícil para un investigador trabajar sin esas presiones o permitirse a diario esas nueve horas de sueño reparador que aconsejaba el Premio Nobel.

Precisamente el contenido del Discurso del nuevo Académico incluye las dos líneas de investigación actuales de su grupo; dicho brevemente, luminiscencia molecular y sensores ópticos, y técnicas analíticas separativas avanzadas en el estudio de alimentos funcionales, ya que como él mismo dice: “... *me decidí por no renunciar a ninguna de ellas, partiendo desde sus orígenes y recordando con pasión, respeto y agradecimiento a los que pueden ser considerados como “padres” de las mismas: Nicolás Monardes y Mikhail Tswett*”. En el recorrido histórico y el desarrollo instrumental expuesto en el Discurso hemos escuchado cómo ambas líneas confluyen en el ámbito de lo que hoy se conoce como Bioanalítica.

He de reconocer mi interés por el citado recorrido histórico, algo que personalmente agradezco, como a partir de ahora resultará evidente. Así, en el caso de la fluorescencia, se describe con detalle la contribución pionera del médico sevillano Nicolás Monardes, estudioso de las drogas medicinales que se importaban de América, quien en su estudio de plantas exóticas observó en 1565 el tinte azul luminoso en el agua debido a la presencia de las “maderas luminosas”, como en el caso del *Lignum nephriticum*, es decir, la fluorescencia. Existe aquí una interesante historia paralela, también protagonizada por un español, el franciscano leonés Bernardino de Sahagún, que partió a Nueva España en 1529 para no regresar y en donde tuvo la oportunidad de estudiar *in situ* estos fenómenos. Así, en su *Historia General de las Cosas de Nueva España*, formada por varios libros conocidos hoy como *Códice Florentino*, se encuentra en uno de ellos que data de 1558 la referencia al árbol *coatli*, utilizado para las enfermedades de riñón, que, además del uso medicinal en infusión, presentaba la propiedad de colorear el agua de un azul luminoso. Tuvieron que pasar muchos años hasta que los científicos reconocieran que el remedio curativo de origen mexicano conocido en Europa como *Lignum nephriticum* no era otro que el de la planta medicinal *coatli*. De hecho, tanto el citado nombre latino, como el original azteca, se corresponden en realidad con el de una madera medicinal o remedio vegetal y no con el de una planta, y no fue hasta principios del siglo XX cuando se identificó como correspondiente a la madera del árbol mexicano *Eysenhardtia polystachya*. Posteriormente se demostró que aquella luminosidad azul, observada en las infusiones de esta planta, se debe a la fluorescencia de una oxazina que, aunque no inicialmente presente en la madera, es el producto final de una

compleja reacción espontánea que tiene lugar en medio acuoso, ligeramente alcalino y en presencia de oxígeno.

En la descripción histórica posterior que se nos presenta sobre el tema de la fluorescencia, con nombres propios que representan cumbres en su desarrollo experimental y teórico, me ha parecido interesante detenerme en uno de ellos por razones que explicaré a continuación. Me refiero a Robert Boyle, uno de los indudables “padres” de la Química, que supo unir la nueva física y el nuevo paradigma científico que surge con la Revolución Científica al estudio de procesos y sistemas de interés químico. Así, en su texto de 1664, *Experiments and Considerations touching Colours*, probablemente la primera descripción científica de la fluorescencia, Boyle, revisando los trabajos previos del citado Monardes sobre el *Lignum nefriticum*, reconoce no haber encontrado una explicación física del “*deep and lovely ceruleos color*”, aunque sí estudió la influencia del pH sobre la fluorescencia de la infusión. En el estudio concluye que el color azul desaparece en medio ácido (debido a un proceso de *quenching*, como podríamos hoy añadir nosotros) aunque puede ser reversiblemente restaurado por adición de álcalis, como él mismo literalmente escribe (“*I have hinted to you a New and Easy way of discovering in many Liquors (for a I dare not to say in all) wether it be an Acid or a Sulphureous Salt*”). Y ésta es la razón a la que me refería antes, pues es probable que se trate de la primera descripción de una aplicación analítica de un indicador fluorescente. De hecho, el mismo Boyle utilizó en 1684 (*Short Memoirs for the Natural History of Mineral Waters*) la emisión de esta infusión como una prueba de la acidez de una disolución.

La fluorescencia tiene lugar frecuentemente en moléculas aromáticas. Un ejemplo singular, por ser probablemente el primer fluoróforo molecular conocido, es la quinina. Recordando las cumbres históricas citadas, podría uno referirse brevemente a los importantes trabajos relacionados con esta molécula de John F. W. Herschel y George G. Stokes, publicados en ambos casos en la no menos histórica revista *Philosophical Transactions*. Stokes, el *Lucasiano* profesor de Cambridge, se interesó e investigó sobre la quinina precisamente a raíz de lo publicado por Herschel (“*a beautiful celestial blue color*”) en su trabajo de 1845 (*On a case of superficial colour presented by a homogeneous liquid internally colourless*). La quinina, como es sabido, se encuentra en el agua tónica y su fluorescencia aumenta cuando disminuye la polaridad del medio, por ejemplo, añadiéndole alcohol. Así, quién no ha percibido ese azul fluorescente al beberse un gin-tonic (después de varios, es posible que cualesquiera colores pudieran ser vistos dentro y fuera del vaso; no debe confundirse este fenómeno con la fluorescencia).

Finalizada la visión histórica, se nos enmarca la fluorescencia como una parte de la espectroscopia de emisión, incluyendo consideraciones fotofísicas tales como el instructivo diagrama de Jablonki, los rendimientos cuánticos o su dependencia con la concentración de fluoróforo, de tan importante y variada importancia práctica. Qué duda cabe de que, para quien suscribe, este terreno resulta particularmente familiar, al ser la espectroscopia tan cercana a la formación de un químico físico, en este caso desde la fluorescencia en estado estacionario a la de polarización o la resuelta en el tiempo. Se trata aquí, sin embargo, de su indudable y enorme importancia analítica, en gran parte debida a su muy alta sensibilidad. Valga como anécdota ilustrativa que esta alta sensibilidad sirvió para demostrar, allá por 1877, que los ríos Danubio y Rin estaban conectados por corrientes de agua subterráneas. Esta conexión se verificó al añadir fluoresceína, otro conocido fluoróforo, al Danubio y observar, unas sesenta horas más tarde, la característica fluorescencia verde de esta molécula en un pequeño río que desemboca en el Rin.

De forma natural, y tras la explicación precedente, surge una aplicación tecnológica de especial relevancia: los sensores ópticos. Aquí la explicación de sensor químico o físico, entendido según la IUPAC como dispositivo que transforma información química o física en

señal analítica, permite distinguir entre los electroquímicos, ópticos, térmicos, etc, según la naturaleza de la señal monitorizada. Aunque los primeros sensores químicos desarrollados fueron los electroquímicos, la sensibilidad, versatilidad y selectividad de los métodos luminiscentes, unido al desarrollo tanto de las fibras ópticas como de la fotónica, han originado recientemente un aumento espectacular de los sensores ópticos con multitud de aplicaciones en muy diversos campos. Dentro de esta variedad se incluirían los denominados biosensores, término acuñado en el último tercio del siglo pasado y en el que el sensor incorpora un elemento de reconocimiento biológico, ya sea una proteína, un ácido nucleico, un anticuerpo, etc. Nuevamente, si los biosensores electroquímicos, o de primera generación, se desarrollaron inicialmente, son aquí también los ópticos los que muestran un avance significativo en años recientes, debido a sus claras ventajas frente a aquellos una vez que los avances tecnológicos los hicieron factibles. Los biosensores ópticos aparecen en la bibliografía a comienzos de los pasados años 80, mientras que el primer biosensor fluorescente fue desarrollado en 1984 por S. Mansouri y J. S. Schultz para la determinación de glucosa (*A miniature optical glucose sensor based on affinity binding*). Desde entonces el número de publicaciones sobre estos dispositivos no ha hecho más que aumentar, incluyéndose aquí las innovaciones tecnológicas aportadas por el grupo de Prof. Fernández Gutiérrez.

La segunda línea de investigación presente en el Discurso incluye, para empezar, la historia, desarrollo y clasificación de las técnicas de separación cromatográficas, con especial énfasis en la cromatografía líquida. Estas técnicas, en cualquiera de sus versiones, están presentes en todo laboratorio de análisis y, me atrevería a decir, en casi cualquier laboratorio de química hoy día en el mundo. Quien suscribe, por ejemplo, dispone en el laboratorio de equipos de HPLC y FPLC como herramientas indispensables para la obtención de muestras biológicas de alta pureza.

Apartándonos ahora del rigor del Discurso, nos podríamos permitir especular, literariamente hablando, acerca de que en el nacimiento de esta técnica formidable no se cumple el provocador aforismo de Oscar Wilde de que “*la Naturaleza imita al Arte*”, si nos tomamos además la libertad de reemplazar Arte por Ciencia, una y otra actividades creativas. Así, las “separaciones” son tan antiguas como nuestro propio planeta en donde, remontándonos unos, pongamos 4500 millones de años, podemos pensar, aunque sea de forma muy simplista, que de los primitivos materiales presentes en la prototierra, los elementos más pesados se unieron y condensaron para formar el germen del planeta, mientras que elementos ligeros como hidrógeno y helio lo abandonaban y se perdían en los confines interplanetarios. En el núcleo informe y caliente comenzó entonces un fraccionamiento adicional, en el que elementos densos y pesados como hierro y níquel quedaban en su interior, permitiendo a otros más ligeros desplazarse para flotar en la superficie y cristalizar en los diferentes estratos minerales que conforman la corteza. Los elementos gaseosos emergieron formando una primera atmósfera y el agua comenzó a condensarse formando mares y océanos. Las capas de la tierra, núcleo, manto, corteza, hidrosfera, atmósfera,... se estructuraron de acuerdo con fuerzas directoras de separación, eso sí, a muy gran escala. En este sentido, las técnicas y artes separativas habrían “imitado” aquí a la Naturaleza, aunque de acuerdo, en este caso, con fuerzas que adquieren protagonismo en la escala molecular.

Volviendo al rigor del Discurso, nos encontramos con la introducción histórica del método, con mención especial a su inventor, el fisiólogo vegetal Mikhail S. Tswett, reconocido padre de la cromatografía. Este científico ruso, que fue experto en la separación e identificación de pigmentos vegetales, siendo el primero, por ejemplo, en obtener muestras químicamente puras de las clorofilas *a* y *b* y descubrir la forma *c* en algas, dio nombre además a la técnica al acuñar los términos cromatografía y cromatograma. Etimológicamente cromatografía procede del griego como combinación de “color” y “escribir”, algo así como

“escrito en color”; es muy curioso que en ruso el apellido Tswett (en ruso Цвет) signifique literalmente color (e incluso flor, цветóк), por lo que, atendiendo a este significado del apellido en ruso, bien podría el término cromatografía entenderse como “escrito por Tswett”. La enorme labor de este científico no se vio suficientemente recompensada en vida debido a desencuentros con poderosos y quizás envidiosos colegas, aunque también pudiera ser esto debido a que algunas de sus grandes publicaciones lo fueran en ruso, idioma desconocido entonces (y no sólo entonces) para la gran mayoría de los científicos europeos. De ser así, no sería este el primer caso, pues, por citar un conocido ejemplo, muchas de las contribuciones del gran científico y también gran humanista ruso Mikhail V. Lomonosov, quien da nombre a la Universidad de Moscú, no fueron reconocidas en su momento por este motivo; sirva como ilustración su principio de conservación de la materia posteriormente universalizado por Antoine Lavoisier. Quizás merece la pena, para finalizar estos comentarios sobre la figura de Tswett, que, aunque interesado fundamentalmente en su obra por los aspectos prácticos de la cromatografía, tratara también los procesos de separación como debidos a fenómenos interfaciales originados por fuerzas de adsorción, utilizando entre otras las publicaciones de Josiah W. Gibbs, cuya capital importancia era todavía prácticamente desconocida para la colectividad científica.

El posterior comentario sobre de la electroforesis capilar, como poderosa técnica separativa, me ha hecho también recordar pasados encuentros en la Facultad de Ciencias con el Prof. Fernández Gutiérrez y su preocupación, o más bien ocupación, con vistas a obtener financiación para la adquisición de la instrumentación relativa a esta técnica, labor inevitable del líder de un grupo de investigación y que, obviamente en este caso, dio sus frutos en su momento.

Toda la instrumentación descrita, incluyendo la espectroscopia de masas, se viene utilizando aquí para el estudio de alimentos funcionales, tema reciente de singular impacto además en la opinión pública, que muchas veces se pregunta cuáles serían entonces los alimentos no funcionales o bien por qué unos “funcionan” y otros no. Todo esto va quedando aclarado en el Discurso, donde junto con la definición de alimento funcional aparecen y se aclaran otros conceptos menos coloquiales, tales como nutracéuticos, complementos alimenticios, alimentos enriquecidos, medicinales y saludables, componentes funcionales, macro y micronutrientes o compuestos bioactivos. Una verdadera nomenclatura específica para un nuevo campo de conocimiento, al que podríamos globalmente denominar como Ciencia y Tecnología de los Alimentos y bajo el cual estarían la Bromatología, Nutrición y Dietética, otras biociencias y la propia Bioanalítica. Algo así, y salvando las obvias distancias, como lo que el mismo Lavoisier en 1787 hizo con su *Método de la Nomenclatura Química (Méthode de Nomenclature Chimique)* para la que entonces surgía como una nueva ciencia fundamental, la Química.

Así como no tenemos por qué ser expertos en fluorescencia, cromatografía, espectroscopia de masas o en el diseño de biosensores, todos los aficionados, por ejemplo, se creen expertos en fútbol y saben, naturalmente, cuál debería ser la alineación correcta del equipo sin, por supuesto, tener que haber estudiado la carrera de Ciencias de la Actividad Física y del Deporte, haber hecho un Máster sobre el tema o los cursos oficiales de entrenador. Algo análogo ocurre con los alimentos y la salud, en donde todos somos expertos, quizás porque todos llevamos ya mucho tiempo comiendo, afortunadamente, y estamos de vuelta del asunto. Valgan pues algunos comentarios sobre un tema aparentemente tan asequible y, nuevamente, sobre su introducción histórica.

Así, puede uno remontarse al presocrático Hipócrates, como se cita en el Discurso, quien en su consejo (*Sobre la dieta*, en la *Colección Hipocrática*) de favorecer la propia dinámica de la *Physis* del ser humano para recuperar y conservar la armonía, es decir, la salud, fue el primero que destacó la importancia de los aspectos ambientales, tales como la

higiene, el clima, la actividad física y sexual y, en particular, la dieta. Esta influencia de la dieta en la salud la encontramos posteriormente, por citar sólo unos pocos ejemplos, en los grecorromanos Dioscórides y Galeno, en el persa Avicena (*Canon medicinae*), el cordobés Maimónides (*Régimen de la salud*) o, ya en la Edad Media, siglo XIV, en Arnau de Vilanova con su *Regimen sanitatis*. Probablemente la Nutrición científica comienza en 1780 con los estudios de la energética del metabolismo de Lavoisier (el padre de la nutrición moderna, según la *Encyclopedia Britannica*) y Pierre-Simon de Laplace con su primer calorímetro de hielo (*Mémoire sur la chaleur*), demostrando además que la respiración no es sino una lenta combustión. Posteriormente, François Magendie en 1816 y su discípulo Claude Bernard descifran el papel de las proteínas en el organismo. Sería luego Justus von Liebig quien en 1842 revoluciona la producción del alimento con su obra *La química orgánica en la fisiología y la patología*, mientras Gustav von Bunge, en las últimas décadas del siglo XIX, describe la importancia de las sustancias inorgánicas en la dieta. Es ya en la primera mitad del siglo XX cuando se descubren las 13 vitaminas esenciales y finalmente, con el desarrollo y aplicación de las técnicas químico físicas en el análisis, se han llegado a conocer los cientos de componentes, nutritivos o no, de los alimentos, así como el papel que ejercen en la salud los llamados 40 componentes esenciales.

Sobre la asociación alimentación-salud se sabe en la actualidad que de las diez causas principales de muerte, seis tienen a la dieta como factor en su etiología, patologías que en su conjunto disminuyen la calidad de vida y originan mayores costos en atención sanitaria. Valga como ejemplo Estados Unidos, en donde casi el 15% de la población es mayor de 65 años pero demanda un 40% del gasto total destinado a Sanidad, con cifras similares en la Unión Europea. En España, la esperanza de vida es de las más altas del mundo, de hecho la tercera después de Japón y Suiza, así como presenta un índice muy bajo de natalidad, lo que obviamente provoca el envejecimiento estadístico de la población y un consecuente aumento de enfermedades degenerativas. De ahí la necesidad de promover prácticas alimenticias saludables para lograr, en el argot de la OMS, una longevidad de “viejos sanos” con un “atardecer metabólico” que demore la aparición de esas patologías.

Para comprender la importancia de los alimentos, y en particular los funcionales, sería conveniente conocer los cambios que ha experimentado la ciencia de la nutrición en el último siglo, algo que podría ilustrarse con la comparación entre nutrición óptima vs nutrición tradicional. Aunque ese apasionante desarrollo quede aquí fuera de lugar, digamos al menos que en épocas pasadas se consideraba que una alimentación nutricionalmente equilibrada era la que prevenía las carencias, mientras que, actualmente, en las sociedades prósperas, naturalmente, el concepto de alimentación equilibrada significa el consumo de una dieta óptima a base de alimentos que promuevan la salud y disminuyan el riesgo de enfermedades crónicas relacionadas con la dieta. En cualquier caso, el fundamento científico de una alegación de salud es una tarea compleja y lenta, pues para probar con certeza que ciertos componentes alimenticios pueden mejorar una función o reducir el riesgo de enfermedad se requiere una sólida base científica. No debe olvidarse, sin embargo, que este impacto de la ciencia debe medirse no tanto por el volumen de venta de ciertos productos, que pueden alcanzar los cientos de millones de euros, sino muy especialmente por los beneficios reales que brindan a la comunidad en materia de salud pública. En cualquier caso, es crucial que la ciencia esté siempre al servicio del interés público, por encima del interés comercial, y de ahí la necesidad de una correcta legislación en la materia.

Se finaliza este punto con un comentario sobre la Bioanalítica, una nueva biociencia que englobaría la aplicación de los métodos y técnicas de la Química Analítica al estudio de los procesos y sistemas presentes en los seres vivos. Y es en este contexto donde surgen a su vez nuevos conceptos dentro de lo que se conoce como “ómicas”, tales como genómica, proteómica, transcriptómica, metabolómica, etc., entendidas como nuevos métodos y técnicas

de análisis global. El grupo de investigación aquí representado se interesa particularmente por la metabolómica, dirigida a la exploración de las complejas relaciones entre nutrición y metabolismo, investigando el papel que juegan los componentes de la dieta en el mantenimiento de la salud o en el desarrollo de enfermedades. En un plano más general, en la metabolómica se estudian las modificaciones del metaboloma (conjunto de metabolitos presentes en las células, tejidos y biofluidos) bajo el efecto de factores genéticos, fisiológicos o ambientales. Se trata así de una estrategia que incluiría un sistema analítico de alto rendimiento asociado con tratamientos estadísticos multivariantes.

Dentro de las previsiones actuales en alimentación funcional, parece interesante finalizar este apartado mencionando algunas de las tendencias clave que para 2011 propone en sus números recientes la revista *New Nutrition Business*, de las cuales resaltaría al menos dos de ellas. Por una parte, el tema de los antioxidantes, como es el caso de los polifenoles de los que se nos habla en las aplicaciones bioanalíticas incluidas en el Discurso. Parece ser, sin embargo, que existe alguna incertidumbre en su futuro, ya que resulta necesario mejorar los mensajes demasiado habituales actualmente, como el de “rico en antioxidantes”, al requerirse un mayor soporte científico para que estos productos sean más específicos y rigurosos a la hora de alegar sus beneficios. Estoy seguro de que también aquí la investigación del grupo del nuevo Académico será relevante a estos fines. Por otra parte, estaría el control del peso, algo que no debe considerarse ya como una simple frivolidad estética, pues el número de obesos en el mundo se ha duplicado en tres décadas, según estudios de la OMS, que ha calificado ya la obesidad como la pandemia del siglo XXI. Aunque esto último sea, naturalmente, de aplicación inmediata a los países prósperos, es significativo que en aquellos de economías emergentes comience ya a darse esta situación, especialmente entre la población infantil, debido a la importación de insanas modas alimenticias procedentes del llamado primer mundo, extrañas a la tradición local, y cuyo objetivo único en este caso es el puramente comercial, ajeno a cualquier consideración ética o científica. A título personal, y aún reconociendo la afirmación de la OMS acerca de la obesidad, creo que, por otra parte, el mayor “problema de alimentación” sigue siendo el *hambre*, como endemia todavía presente en tantos lugares y asignatura pendiente del citado primer mundo.

Me gustaría finalizar este comentario al Discurso de ingreso con una mención a los muchos y nuevos términos que incluye para designar nuevos campos de conocimiento de lo “bio”, desde los biosensores a la categorización de los alimentos, las “ómicas” o la propia Bioanalítica. Me he declarado siempre crítico con la creciente parcelación del conocimiento y de aspectos diferenciados del mundo natural en espacios etiquetados en tanto que presumibles compartimentos estancos de acceso frecuentemente restringido solo al legalmente iniciado (algo que me recuerda, en otro contexto, la antigua canción folk de Pete Seeger, *Little Boxes*). En último extremo, la naturaleza y el conocimiento no saben de etiquetas, suelo decir recordando aquí también al admirado Prof. Richard P. Feynman, Premio Nobel de Física. Otra situación, naturalmente, es cuando ese carácter estanco o esas dificultades de acceso están ausentes y esas etiquetas son simples y útiles recursos “operativos”, que no “realistas”, por usar términos ya acuñados. Me consta que este es precisamente el caso del nuevo Académico, para quien ese bagaje de términos supone la herramienta que permite llegar al abordaje multidisciplinar del que, en sus palabras, “*es firme defensor*”, actitud deseable que, más allá de eso, percibo hoy día como inevitable por entender que esa multi, inter y transdisciplinariedad serán obligados lugares comunes en la investigación del siglo XXI. Sirva como referencia aquí por su publicación muy reciente, de hecho, unos pocos días, lo que sobre este punto reivindica también en su último libro, *La Nueva Ilustración: ciencia, tecnología y humanidades en un mundo interdisciplinar*, el científico, historiador y también académico de la RAE, Prof. José Manuel Sánchez Ron.

He dejado conscientemente para el final un comentario acerca de la personalidad humana y profesional del Prof. Fernández Gutiérrez, qué duda cabe, un granadino de pro, quien inició su formación humanística en el Instituto Padre Suárez, con la suerte y la fortuna de tener profesores de la talla de D. Antonio Domínguez Ortiz, D. Emilio Orozco, D. José Martín Recuerda y D. Rafael Martínez Aguirre, así como D^a Pilar García Subero, quien tuvo mucho que ver con su temprana “vocación química”. Cuántas de estas vocaciones tempranas en tantos campos del conocimiento se han debido a la dedicación y competencia de profesores científica o humanísticamente bien preparados y vocacionalmente entregados; aquí es en donde, en mi opinión, realmente radica la calidad o, si se prefiere, la excelencia de un profesor o profesora: formación y conocimientos, vocación y cariño por la enseñanza, y respeto, en el mejor y más amplio sentido, por el alumno, al margen, claro está, de la buena investigación, necesaria en el nivel universitario. En estos casos, las virtudes pedagógicas vienen dadas por añadidura.

Paralelamente se formó también en los movimientos juveniles de la Compañía de Jesús, en donde, como él dice, “*aprendió tantas cosas que, en buena medida, lo que es hoy en día, en lo profesional, político y sociológico, se lo debe a esa etapa de su vida*”. Entre otras cosas, aprendió allí también música y a tocar la armónica, formando parte de la agrupación musical Strauss, de forma que su amor actual por la música sinfónica tiene su origen en aquella época.

Ya como estudiante universitario, el nuevo académico vivió tiempos de cambios en los que participó activamente como delegado estudiantil y fundador de sindicatos universitarios granadinos, así como fue uno de los primeros estudiantes que formó parte de la Junta de Gobierno de la Universidad de Granada, cuando el Prof. Federico Mayor Zaragoza era Rector de la misma. Acabada la carrera y posterior tesis doctoral, y tras un periodo en la universidad de Granada, obtuvo la plaza de Profesor Adjunto en la Universidad de Extremadura, donde permaneció ocho años hasta 1982. Marcha entonces como Profesor Invitado durante un año a la Universidad de Florida en Estados Unidos, para regresar a la de Granada en 1984 y obtener la Cátedra de Química Analítica dos años después. Comienza entonces un periodo de servicios especiales de unos diez años, primero como Delegado de Educación y Ciencia en Granada y luego como primer Rector en la Universidad de Almería, para regresar de nuevo a la de Granada en 1998, donde permanece desde entonces compartiendo dedicación entre el Departamento de Química Analítica y el Instituto de Nutrición de esta Universidad en la que, desde 2010, es además Director del Centro de Investigación y Desarrollo del Alimento Funcional.

Como vemos, periplo profesional y humano entre tres universidades españolas y una americana, algo siempre deseable para cualquier profesional y tanto más para un profesor e investigador. De esos años, y en su Discurso, destaca su agradecimiento y admiración por tres profesores a quienes considera sus maestros y a quienes dedica palabras de cariñoso recuerdo: el Prof. Fermín Capitán García, cuyas cualidades legendarias como gran docente aún perduran y que introduce a nuestro nuevo académico en el mundo de la investigación, siendo además uno de los relevantes fundadores de esta Academia; el Prof. Manuel Román Ceba, pionero en España en el uso de la fluorescencia con fines analíticos y a quien tanto debe en su formación en esa línea de trabajo, y el Prof. Stephen G. Schulman, su “adviser” americano en la Universidad de Florida, con quien publica un capítulo de libro de posterior trascendencia en el campo.

De su época como Rector en la Universidad de Almería tengo un recuerdo personal de un acontecimiento “histórico”. El 30 de mayo de 1994 se defendió en esa joven universidad la primera tesis doctoral de ciencias, “*Desarrollo y aplicación de la calorimetría isotérmica de reacción a las interacciones proteína-efector*”, una tesis de Química Física de cuyo tribunal formé parte bajo la presidencia, no podía ser menos para la ocasión, del propio

Rector de la Universidad. Recuerdo muy bien el acto académico y la posterior celebración, compartida con el nuevo doctor, directores y el magnífico presidente. Una tesis en la que, no casualmente, aparecen las palabras calorimetría y proteína, y de la que me sentí orgulloso por haber sido el director de tesis de los directores de la misma. Y decía antes lo de acontecimiento histórico porque, de hecho, en el periódico local apareció una amplia reseña del acto, primera tesis de ciencias en la Universidad de Almería, con una foto del tribunal y el nuevo doctor.

Hablar a estas alturas del currículo investigador del nuevo académico supondría una enumeración prolija. Baste mencionar sus cerca de 250 artículos en revistas nacionales e internacionales, aparte libros y capítulos de libros, o sus más de 30 proyectos y más de 20 contratos de investigación, así como las más de 20 tesis doctorales dirigidas. Datos escuetos pero significativos a los que habría que añadir los variados cargos de responsabilidad en la gestión investigadora y académica en diferentes universidades. Todo esto por no hablar de su amplia experiencia docente. Aquí me quedo con su propia autoevaluación como *“buen docente que disfruta de la clase bien dada y de su sentirse afortunado por haber podido formar a tantos profesionales y futuros investigadores, de los que cuatro son ya catedráticos y seis profesores titulares de universidad”*. Como él mismo también dice: *“no es buen maestro el que no consigue que a los cinco años de trabajar estrechamente con un colaborador, éste no esté en disposición de enseñar a su maestro”*. En su caso esto parece ser una realidad, porque, nuevamente según sus palabras, *“gran parte de lo que ha conseguido en investigación ha sido gracias a ellos”*. Defensor, por último, del trabajo en equipo, se enorgullece también de sus múltiples colaboraciones con profesionales de otras áreas de conocimiento, así como con los de otras nacionalidades, evidencia todo ello de su actitud abierta hacia nuevos horizontes y desafíos intelectuales en su labor investigadora.

Y finalizo aquí repitiendo las palabras que decía al comienzo: es un placer y una satisfacción transmitirle al nuevo Académico de Número la afectuosa felicitación en nombre de la Academia de Ciencias Matemáticas, Físico-Químicas y Naturales de Granada y también en su nombre, y en el mío propio, darle la más cordial bienvenida a su seno.

Eso es todo.

Muchas gracias.