



UNIVERSIDAD DE BURGOS

Departamento de Química

Área de Química Analítica

Trabajo Fin de Grado

DETERMINACIÓN ANALÍTICA DE ANTIBIÓTICOS

Autor: Abraham Saldaña Botín

Tutora: M. Asunción Alonso Lomillo

Junio de 2015



Universidad de Burgos
Facultad de Ciencias

VISTO BUENO PARA PRESENTACIÓN DE LA MEMORIA DEL TRABAJO
FIN DE GRADO

GRADO EN: Química

CURSO: 2014/15

Dña. M. Asunción Alonso Lomillo informa de que el alumno D. Abraham Saldaña Botín, ha realizado el trabajo "Determinación Analítica de Antibióticos" bajo su tutela, y considera que la Memoria es adecuada para su presentación pública:

SI

NO *

(*) En caso negativo, indiquense los motivos:

OBSERVACIONES:

--

Burgos, a 15 de junio de 2015

Fdo.: M. Asunción Alonso Lomillo

ÍNDICE

1.- Summary.....	3
2.- State of the art.....	5
2.1.- Aquaculture.....	5
2.2.- Sulfonamides.....	6
2.2.1.- Sulfamethoxazol.....	6
2.3.- Analytical determinations of SMX.....	7
2.3.1.- Electrochemical determinations.....	7
3.- Objective.....	8
4. - Experimental.....	8
4.1.- Reagents.....	8
4.2.- Apparatus.....	8
4.3.- Measuring procedure.....	8
5.- Discusión y resultados.....	10
5.1.- Determinación voltamperométrica de SMX utilizando SPCEs.....	10
5.1.1.- Voltamperometría de onda cuadrada.....	10
5.1.2.- Voltamperometría diferencial de impulsos.....	13
5.2.- Determinación de SMX utilizando SPC _{TTF} Es mediante voltamperometría diferencial de impulsos.....	15
5.3.- Determinación de SMX en muestras de agua mediante voltamperometría diferencial de impulsos.....	17
5.3.1.- SPCEs.....	17
5.3.2.- SPC _{TTF} Es.....	19
6.- Conclusiones.....	21
7.- Referencias.....	21

1.- SUMMARY

Annual global aquaculture production has more than tripled within the past 20 years, and by 2015, aquaculture is predicted to account for 40 % of total global seafood production by weight. As production surges, aquaculture facilities increasingly rely on the heavy input of formulated feeds, antibiotics, antifungals and agrochemicals, which could have potential impacts on public health [1].

In particular, the risk of bacterial infections among aquacultured fish is high as a result of the non-hygienic and stressful conditions present in aquaculture facilities, including high fish densities, high farm densities in coastal waters and lack of appropriate barriers between farms. Therefore, heavy amounts of antibiotics, which kill bacteria or inhibit their growth, are administered in fish feed for prophylactic (disease prevention) and therapeutic (disease treatment) purposes in aquaculture facilities worldwide [1]. However, the antibiotics can contribute to resistance among bacteria [2]. Thus, it is necessary to develop analytical methods that can detect antibiotics with the greatest sensitivity and selectivity possible.

In this way, electroanalytical sensors provide an achievable opportunity to perform biomedical, environmental and industrial analyses away from a centralized laboratory. In particular, screen-printed electrodes (SPEs) can combine ease of use and portability with simple, inexpensive fabrication techniques. Although early SPEs sensors focused on the determination of glucose in blood samples, since then applications have broadened to include the determination of other biomolecules, pesticides, metals, anions and potential pollutants [2-4].

Thus, this work has been guided to the development of analytical procedures based on the use of SPEs for the detection of the above-mentioned antibiotics in water samples.

2.- STATE OF THE ART

2.1.- AQUACULTURE

Aquaculture is the farming of aquatic organisms, including finfish and shellfish, by individuals, groups or corporations using interventions (e.g., feed, medications, controlled breeding or containment) that enhance productions. Although the details of the early history and nature of aquaculture are unclear, people have been farming fish for millennia and there is evidence of aquaculture in Egypt and China as early as 2500 B.C. and 1100 B.C., respectively (Landau, 1992). Practiced for centuries, traditional aquaculture was characterized by minimal added inputs, small farm size and low stock density. However, coinciding with the rapid population growth of the 20th century, there has been a sharp increase in demand for seafood products, including finfish and shellfish (particularly in the past 50 years). Initially, much of this demand was met by wild-caught fish, but as world fisheries continue to be over-exploited and depleted, aquaculture systems have undergone unprecedented growth, evolving as a significant contributor to meet demands for seafood [1].

As demand for aquaculture products rises, the overwhelming majority of the world's aquaculture systems continue to intensify cultivation methods. These methods are characterized by high stock density and volume; the heavy use of formulated feeds containing antibiotics, antifungals and other pharmaceuticals; and the heavy application of pesticides, and disinfectants. In some instances, particularly in developing countries where the majority of aquaculture production takes place, additional materials such as human and animal excreta are also utilized in the aquaculture environment. These production methods raise a number of potential food safety and human health concerns associated with aquacultured seafood products [1].

The latter is illustrated by the widespread and unrestricted use of prophylactic antibiotics in this industry, especially in developing countries, to forestall bacterial infections resulting from sanitary shortcomings in fish rearing. The use of a wide variety of antibiotics in large amounts, including non-biodegradable antibiotics useful in human medicine, ensures that they remain in the aquatic environment, exerting their selective pressure for long periods of time. This process has resulted in the emergence of antibiotic-resistant bacteria in aquaculture environments, in the increase of antibiotic resistance in fish pathogens, in the transfer of these resistance determinants to bacteria of land animals and to human pathogens, and in alterations of the bacterial flora both in sediments and in the water column. The use of large amounts of antibiotics that have to be mixed with fish food also creates problems for industrial health and increases the opportunities for the presence of residual antibiotics in fish meat and fish products [5].

Thus, it appears that global efforts are needed to promote more judicious use of prophylactic antibiotics in aquaculture as accumulating evidence indicates that unrestricted use is detrimental to fish, terrestrial animals, and human health and the environment [1, 5].

2.2.- SULFONAMIDES

Sulfonamides, or sulfa drugs, are synthetic antibiotics derived from sulfanilic acid that act by inhibiting the bacterial growth rather than directly affecting the bacteria. Despite the discovery and wide use of other antibiotics, sulfonamides are among the most widely employed antibacterial agents in both human and veterinary medicine, including the treatment of bacterial and protozoan infections in aquaculture, due to their low cost and efficiency in this kind of diseases [6-8].

Sulfonamides which persist in the environment for a long time due to their low biodegradability, can be accumulated in various organisms [7]. Thus, undesirable concentrations of these compounds could become part of human food [9], causing resistant bacteria [10]. So that the European Union has fixed the maximum residue limits of total sulfonamides at 100 µg/Kg in muscle, liver, kidney, milk and other edible products (Commission Regulation (EU) No 37/2010, 2009) [11, 12]. Moreover, aquaculture waters must be analytically controlled in order to decrease the environmental contamination provoked by antibiotic leaching from faeces and/or uneaten antibiotic feed [13].

2.2.1.- Sulfamethoxazol

Sulfamethoxazole (4-amino-N-(5-methyl-3-isoxazolyl)benzenesulfonamide) (SMX) is one of the most effective sulfonamides, with a broad spectrum of antibacterial activity against both Gram-positive and Gram-negative aerobic bacteria, as well as against protozoa (Figure 2.1).

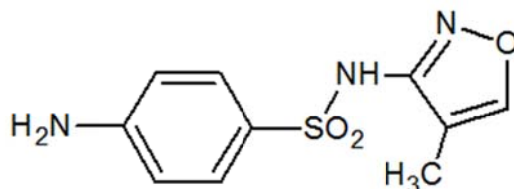


Figure 2.1.- Chemical structure of SMX.

SMX has been successfully used for the treatment of bacterial infections, including those of the respiratory and urinary tract, as well as in the treatment of opportunistic infections in transplantation and for AIDS-related complications [6, 7, 14]. Nevertheless, SMX can produce a variety of side effects that include gastrointestinal disturbances, hypersensitivity reactions, and a number of haematological abnormalities such as thrombocytopenia, agranulocytosis, megaloblastosis, eosinophilia, and sulfhemoglobinemia [14].

SMX can be classified in the group of “Pharmaceutical & Personal Care Products” (PPCPs). Like many representative PPCPs, SMX can be found in sewage treatment plants, because of its refractoriness to conventional treatments. Several works have reported the presence of SMX in sewage treatment plants effluents up to several

$\mu\text{g L}^{-1}$, and even in drinking water in the low ng L^{-1} range. SMX can persist in the environment for more than a year, which poses risks like bacterial resistance; accordingly, it is classified as having a high environmental impact [7].

2.3.- ANALYTICAL DETERMINATIONS OF SMX

Owing to concern over the analytical determination of sulfa drugs in pharmaceuticals and residues in food products, various methods have been proposed, including high-performance liquid chromatography (HPLC) [15-22], gas chromatography [23] and capillary electrophoresis [24-34]. These methods have proven to be sensitive and suitable for sulphonamide determination [6].

However, few electroanalytical methods have been reported for the determination of sulphonamide compounds, most probably due to issues related to electrode deactivation or fouling. Despite this drawback, electrochemical methods offer certain advantages, such as not requiring sample preparation, not being time-consuming and offering a sensitivity and dynamic range comparable to other analytical methods [6].

2.3.1.- Electrochemical determinations

Electroanalytical chemistry encompasses a group of qualitative and quantitative analytical methods based on the electrical properties of a solution of the analyte when it is made part of an electrochemical cell [35]. Potentiometric [9, 36-41], specially ion-selective membrane sensors [9, 38-41], and voltammetric [6, 14, 42-48] methods have been mainly developed for SMX determination.

Voltammetric methods are particularly convenient, accurate and precise in the analysis where the active ingredient, oxidizable or reducible, can be determined in the presence of inactive excipients. This procedure, which is based on the measurement of a current as a function of an applied potential, eliminates the time spent on the extraction of the species to determine and the losses incurred in the process, common operations on photometric and chromatographic methods, while the reliability and accuracy are at least comparable, if not better, than the mentioned methods [35].

In this way, oxidation and reduction mechanisms, based on the primary amino group ($-\text{NH}_2$) and the sulfonamide group ($-\text{SO}_2-$) in that order, have been studied by differential pulse voltammetry (DPV) and square wave voltammetry (SWV) using different modified electrodes (Table 2.1). As it can be seen, most sources describe the oxidation of the $-\text{NH}_2$ group, because the reduction of the $-\text{SO}_2-$ group is very difficult to achieve.

In recent years there has been a growing interest in the development of miniaturized electrodes in electrochemical instruments. Screen-printed technology has been shown as an attractive method for mass production of sensors at low cost. The technology has the advantages of design flexibility, process automation, good reproducibility, a wide choice of materials and reduced expense [3, 49]. These sensors

recognize the chemical information present in the sample and transform it into an easily processable signal [50].

3.- OBJECTIVE

The main goal of this research activity is the development of a sensor, based on the screen-printed methodology, for the electrochemical detection and quantification of SMX in water samples.

4. - EXPERIMENTAL

4.1.- REAGENTS

SPEs were manufactured by the Electronalysis Research Group in the University of Burgos [51].

All solutions were prepared with water purified with a Milli-Q device, which provided a resistivity of 18.2 M Ω cm.

Stock standard solutions of SMX (Fluka Analytical, Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) were prepared by dissolving the adequate amount in buffer solution.

100 mM acetate buffer and 100 mM KCl (Merck, Darmstadt, Germany) solutions were used as supporting electrolyte. 1 M NaOH solutions (J.T. Baker, Deventer, The Netherlands) was used to adjust the pH value.

4.2.- APPARATUS

Electrochemical measurements were made with a PalmSens handheld potentiostat (Palm Instruments BV, Houten, The Netherlands).

The pH of the solutions was measured with a Crison Model 2002 (Barcelona, Spain) pHmeter.

4.3.- MEASURING PROCEDURE

Voltammetric measurements were carried out in a cell containing 5 mL of a buffer solution, pH = 6, using different SPEs. The potential was scanned from + 0.4 V (initial potential) to + 1.2 V (final potential). Other experimental parameters were the following: step potential, 25 mV; pulse potential, 8 mV; pulse time, 0.04 s, scan rate, 50 mV s⁻¹ and frequency, 10 Hz for the differential pulse and the square wave voltammograms.

Table 2.1.- Voltammetric determination of SMX.

Electroch. technique	Electrode	Medium	Peak potential (V)	Voltammetric current registered	Concentration range (μM)	Capability of detection (μM)	Ref.
SWV	Boron-doped diamond	Ethanol + phosphate buffer, pH 6.0	+ 1.1	Oxidation	6.1 – 60.1	1.1	[6]
DPV	Boron-doped diamond	Britton-Robinson buffer, pH 7.0	+ 0.9	Oxidation	3.9 – 39.4	14.4	[43]
DPV	Boron-doped diamond	Britton-Robinson buffer pH 7.0	+ 0.9	Oxidation	3.9 – 31.6	0.1	[46]
DPV	Carbon paste	KCl + Acetate buffer, pH 6.0	+ 0.9	Oxidation	0.0014 – 0.0012	0.0004	[14]
DPV	Carbon paste	Phosphate buffer, pH 6.0	- 0.1	Oxidation	0.01 – 10000	0.0015	[45]
SWV	Glassy carbon	Britton-Robinson buffer, pH 6.3	+ 1.1	Oxidation	650.0 – 3500.0	400.0	[42]
DPV	Glassy carbon	Phosphate buffer, pH 8.0	+ 0.7	Oxidation	50.0 – 10000.0	50.0	[44]
SWV	Glassy carbon	Phosphate buffer, pH 6.0	+ 1.0	Oxidation	55.0 – 395.0	8.5	[48]
DPV	Paraffin composite electrode	Britton-Robinson buffer, pH 7	+ 0.9	Oxidation	0.1 – 0.7	0.024	[47]

5.- DISCUSIÓN Y RESULTADOS

El comportamiento electroquímico del antibiótico SMX se analizó utilizando diferentes dispositivos serigrafiados, constituidos por un electrodo de referencia de Ag/AgCl, un electrodo auxiliar de carbono y un electrodo de trabajo fabricado con una tinta de carbono (SPCE) o con una mezcla de carbono y el mediador electroquímico tetratrafalvaleno (SPC_{TFE}) (Figura 5.1).

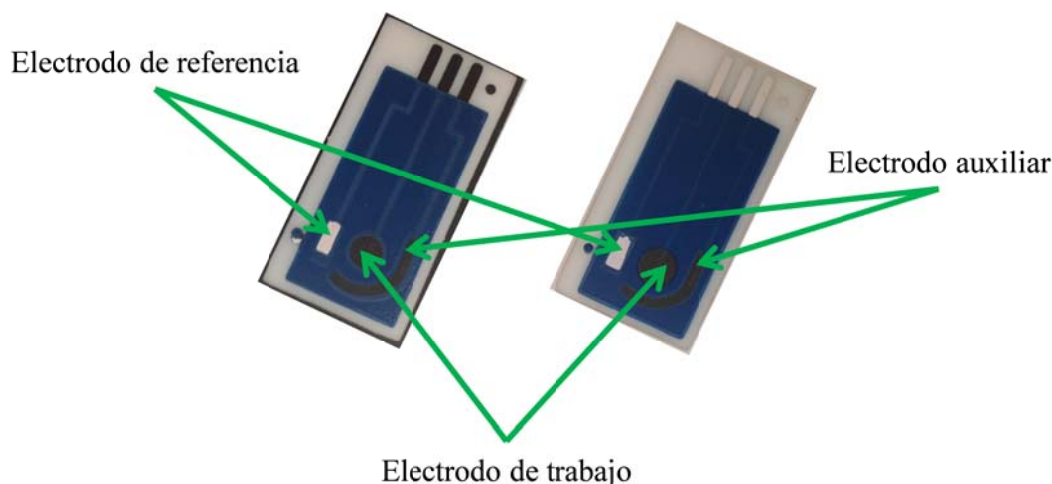


Figura 5.1.- Imagen de los electrodos serigrafiados utilizados: SPCE (Izquierda) y SPC_{TFE} (Derecha).

5.1.- DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE SMX UTILIZANDO SPCEs

5.1.1.- Voltamperometría de onda cuadrada

Se realizaron diferentes curvas de calibrado empleando SPCEs mediante adiciones sucesivas de 50 μ l de una disolución 1.0 mM de SMX en electrolito de soporte pH 6, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4.3. En la figura 5.2 se observa la corriente anódica registrada en este tipo de electrodos, así como el pico de oxidación atribuido al grupo amino [14].

A través de dichos calibrados se determinaron diferentes parámetros de calidad del método, como la precisión y la capacidad de detección [52, 53].

La precisión es el grado de concordancia entre los resultados de ensayos independientes obtenidos en unas condiciones bien definidas. Así pues, evalúa la dispersión de los resultados que se obtienen al realizar réplicas de medidas sobre una misma muestra. Se expresa estadísticamente a través de la desviación estándar en términos relativos, ya que mientras la desviación estándar en términos absolutos aumenta con la concentración, la desviación estándar relativa (RDS) disminuye, es decir, se estabiliza a concentraciones elevadas [52].

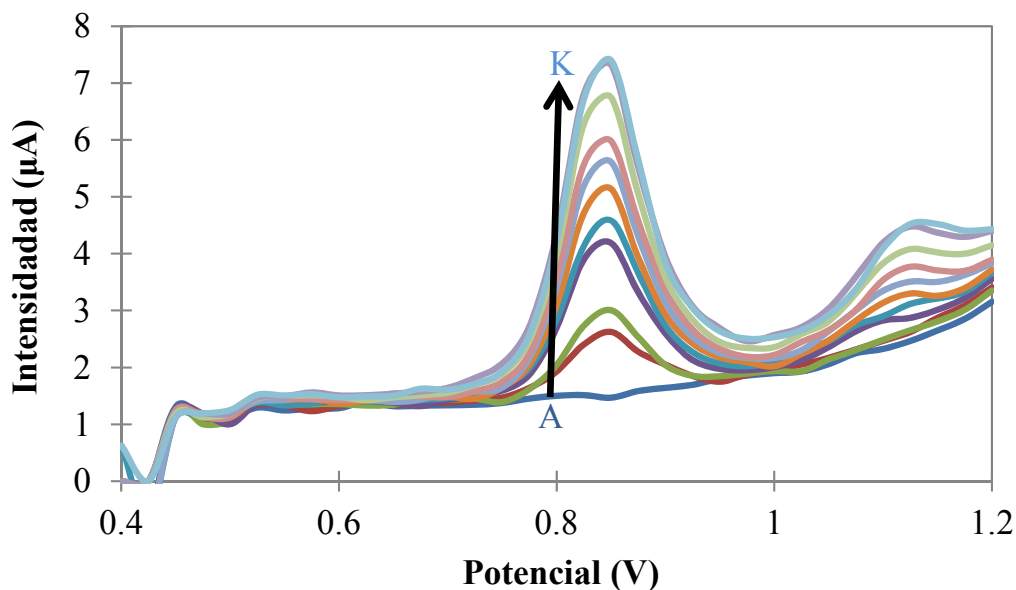


Figura 5.2.- Voltamperogramas de onda cuadrada registrados en electrolito de soporte pH 6 (A), y en disoluciones de SMX de concentración 9.9 μM (B), 19.6 μM (C), 29.1 μM (D), 38.5 μM (E) 47.6 μM (F) 56.6 μM (G), 82.6. μM (H), 90.9 μM (I), 99.1 μM (J) y 107.1 μM (K) utilizando SPCEs.

Es recomendable distinguir entre unas condiciones de mínima variación de los factores de influencia y unas condiciones de máxima variación de los mismos sobre la precisión, lo que se conoce como condiciones de repetibilidad y de reproducibilidad. Las condiciones de repetibilidad son aquellas en las que las medidas se realizan aplicando el mismo método a un mismo material, con los mismos equipos y reactivos, el mismo operador y en un intervalo corto de tiempo, generalmente una sesión de trabajo. Cuando las medidas se obtienen con el mismo método, sobre las mismas muestras, pero con reactivos, equipos, condiciones ambientales y operadores distintos se habla de condiciones de reproducibilidad [52]. En este caso, el factor más influyente en el procedimiento desarrollado para distinguir entre ambos índices es el electrodo serigrafiado utilizado para realizar las medidas voltamperométricas.

Para estimar la repetibilidad del procedimiento se realizaron varias curvas de calibración mediante adiciones sucesivas de 50 μl de SMX 1.0 mM, utilizando el mismo electrodo serigrafiado.

Los parámetros de calibrado y la desviación típica, fueron óptimamente evaluados. Con el objetivo de detectar la existencia de puntos anómalos, se utilizó el programa PROGRESS [54], que evalúa el intervalo lineal y la presencia de datos anómalos mediante una regresión en mínima mediana de cuadrados (LMS) y una vez eliminados éstos del conjunto de calibración, construye nuevamente con los restantes puntos una recta de calibración mediante una regresión en mínimos cuadrados ordinarios (OLS). Esta regresión OLS proporciona una correcta valoración de la pendiente (sensibilidad) y del término independiente del calibrado, siendo ambos importantes para juzgar la calidad del calibrado y a partir de ésta, la del método analítico (Tabla 5.1).

Tabla 5.1.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la repetibilidad del método voltamperométrico basado en SWV y SPCEs.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	10	10	8
Pendiente	0.014	0.013	0.012
Término independiente	0.18	0.30	0.32
Coefficiente de determinación (R^2)	0.98	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.062	-	0.027
Nº de datos	10	10	8
Pendiente	0.013	0.017	0.015
Término independiente	0.10	0.01	0.04
Coefficiente de determinación (R^2)	0.96	0.97	0.97
Desviación estándar residual	0.080	-	0.060
Nº de datos	10	10	8
Pendiente	0.012	0.012	0.016
Término independiente	0.04	0.04	0.38
Coefficiente de determinación (R^2)	0.99	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.019	-	0.032

La repetibilidad de los SPCEs en el rango de concentración de 9.9 a 90.9 μM , en términos de RSD asociada a las pendientes de las rectas de calibración construidas, fue de 12.3 % ($n = 3$).

Para estimar la reproducibilidad del procedimiento se realizaron varias curvas de calibración mediante adiciones sucesivas de 50 μl de una disolución de 1 mM de SMX, en las condiciones óptimas citadas anteriormente, utilizando cada vez distintos SPCEs. A su vez, la tabla 5.2 recoge los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión utilizados para la estimación de la reproducibilidad, que fue de 20.0 % ($n = 3$).

Se analizó también la capacidad de detección del procedimiento analítico, definida como la concentración o la cantidad de analito derivada de la medida más pequeña y que puede detectarse con una certeza razonable. A menor ruido y mayor sensibilidad del método, mayor será también la capacidad de discriminación entre el blanco y las muestras o patrones a baja concentración [52]. Se han de evitar dos tipos de errores [55, 56]:

- ✓ Los falsos positivos (α), denominados errores de tipo α , que consisten en dictaminar la presencia de analito cuando en realidad la muestra no lo contiene. Se trata de un error de tipo I.
- ✓ Los falsos negativos (β), denominados errores de tipo β , en los que se determina que no hay analito cuando en realidad la muestra lo contiene. Se trata de un error de tipo II.

Tabla 5.2.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método voltamperométrico basado en SWV y SPCEs.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	7	7	7
Pendiente	0.019	0.018	0.019
Término independiente	0.01	0.03	0.01
Coefficiente de determinación (R ²)	0.99	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.032	-	0.032
Nº de datos	10	10	8
Pendiente	0.014	0.013	0.012
Término independiente	0.18	0.30	0.32
Coefficiente de determinación (R ²)	0.98	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.062	-	0.027
Nº de datos	8	8	6
Pendiente	0.021	0.015	0.016
Término independiente	0.10	0.04	0.38
Coefficiente de determinación (R ²)	0.96	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.102	-	0.032

En el cálculo de este índice de calidad también se precisan regresiones validadas entre la concentración y la señal analítica, construidas en el rango de 9.9 a 90.9 μM [57, 58]. El valor mínimo de concentración detectable, $2.5 \pm 0.2 \mu\text{M}$ ($\alpha = \beta = 0.05$; $n = 3$), fue menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas de calibrado 9.9 μM . Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se tomó como capacidad de detección del método [59].

5.1.2.- Voltamperometría diferencial de impulsos

Análogamente, se realizó el estudio del comportamiento electroquímico de SMX mediante DPV, para lo que se realizaron diferentes curvas de calibrado empleando SPCEs mediante adiciones sucesivas de 50 μl de una disolución 1.0 mM de SMX en electrolito de soporte pH 6, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4.3. (Figura 5.3).

En las tablas 5.3 y 5.4 se recogen los parámetros de calibración, obtenidos con los distintos métodos de regresión, para estimar la precisión del método propuesto.

La repetibilidad y la reproducibilidad en términos de RSD asociada a las pendientes de las rectas de calibración, construidas utilizando SPCEs, fue 4.0 % ($n = 3$) y 3.6 % ($n = 3$), respectivamente.

El valor mínimo de concentración detectable, $7.0 \pm 1.4 \mu\text{M}$ ($\alpha = \beta = 0.05$; $n = 3$), fue también menor que el valor del primer estándar utilizado para construir las curvas

de calibrado $9.9 \mu\text{M}$. Por lo tanto, desde un punto de vista analítico, este último valor se tomó como capacidad de detección del método [59].

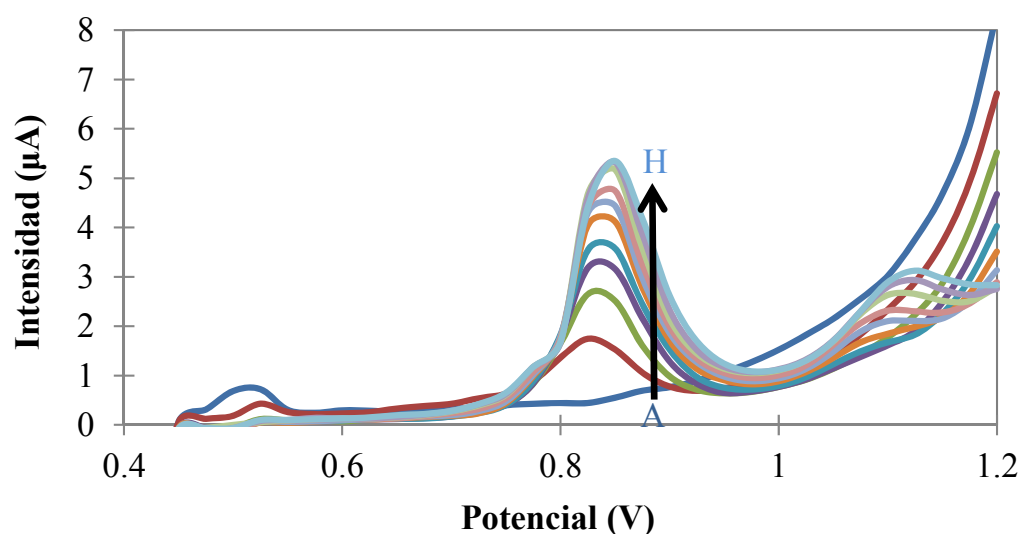


Figura 5.3.- Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en electrolito de soporte pH 6 (A), y en disoluciones de SMX de concentración $9.9 \mu\text{M}$ (B), $19.6 \mu\text{M}$ (C), $29.1 \mu\text{M}$ (D), $38.5 \mu\text{M}$ (E) $47.6 \mu\text{M}$ (F) $56.6 \mu\text{M}$ (G) y $82.6 \mu\text{M}$ (H), utilizando SPCEs.

Tabla 5.3.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la repetibilidad del método voltamperométrico basado en DPV y SPCEs.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	7	7	5
Pendiente	0.058	0.042	0.041
Término independiente	0.77	1.57	1.63
Coefficiente de determinación (R^2)	0.94	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.318	-	0.072
Nº de datos	7	7	6
Pendiente	0.042	0.035	0.038
Término independiente	0.45	0.82	0.67
Coefficiente de determinación (R^2)	0.97	0.97	0.97
Desviación estándar residual	0.161	-	0.119
Nº de datos	7	7	4
Pendiente	0.033	0.040	0.039
Término independiente	0.26	0.11	0.11
Coefficiente de determinación (R^2)	0.99	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.078	-	0.016

Tabla 5.4.- *Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método voltamperométrico basado en DPV y SPCEs.*

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	7	7	5
Pendiente	0.058	0.042	0.041
Término independiente	0.77	1.57	1.63
Coefficiente de determinación (R ²)	0.94	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.318	-	0.072
Nº de datos	7	7	6
Pendiente	0.049	0.040	0.041
Término independiente	1.08	1.61	1.50
Coefficiente de determinación (R ²)	0.95	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.244	-	0.086
Nº de datos	6	6	5
Pendiente	0.038	0.047	0.044
Término independiente	0.51	0.32	0.36
Coefficiente de determinación (R ²)	0.98	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.12	-	0.061

Comparando la precisión de los métodos desarrollados para la determinación de SMX utilizando SPCEs y SWV o DPV como técnicas de análisis, se observa tanto mejor repetibilidad como reproducibilidad en el segundo caso. Además, la pendiente de los distintos calibrados realizados fue ligeramente mayor, lo que indica que el método basado en DPV es ligeramente más sensible, por lo que fue el que se seleccionó como óptimo para la determinación de este antibiótico.

Puesto que gran parte de la versatilidad de los electrodos serigrafados reside en la amplia variedad de materiales con la que se pueden construir los electrodos, especialmente el de trabajo, para mejorar sustancialmente la interacción entre el analito y el sensor [4, 49], se propuso a continuación la utilización de electrodos serigrafados modificados con el mediador electroquímico TTF para la determinación de SMX mediante DPV como técnica de análisis.

5.2.- DETERMINACIÓN DE SMX UTILIZANDO SPC_{TTF}ES MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

La baja solubilidad en agua del TTF lo convierte en un mediador redox idóneo para ser incorporado a la matriz de carbono que constituye el electrodo de trabajo de los electrodos serigrafados.

De forma análoga a los procedimientos desarrollados utilizando SPCEs, se realizaron con estos sensores diferentes calibrados mediante adiciones sucesivas de 50 µl de una disolución 1.0 mM de SMX en electrolito de soporte pH 6, mediante DPV, de acuerdo con el procedimiento descrito en la sección 4.3 (Figura 5.4).

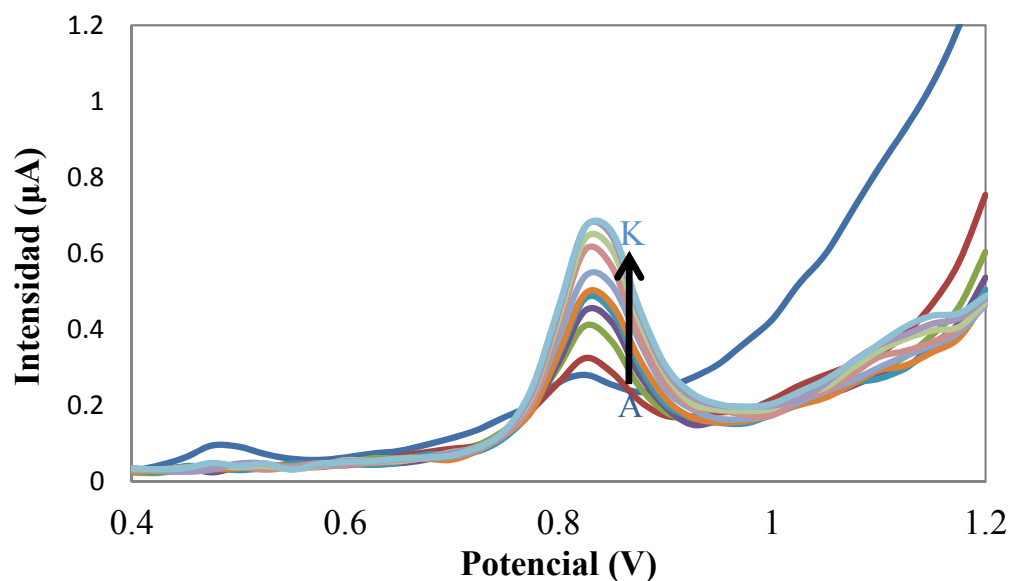


Figura 5.4.- Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en electrolito de soporte pH 6 (A), y en disoluciones de SMX de concentración, 9.9 μM (B), 19.6 μM (C), 29.1 μM (D), 38.5 μM (E) 47.6 μM (F) 56.6 μM (G), 82.6. μM (H), 90.9 μM (I), 99.1 μM (J) y 107.1 μM (K) utilizando $\text{SPC}_{\text{TTFEs}}$.

Los parámetros de calibración obtenidos con los distintos métodos de regresión para estimar la precisión del método propuesto se muestran en las tablas 5.5 y 5.6.

Tabla 5.5.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la repetibilidad del método voltamperométrico basado en DPV y $\text{SPC}_{\text{TTFEs}}$.

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	7	7	4
Pendiente	0.0058	0.0044	0.0044
Término independiente	0.77	0.21	0.21
Coefficiente de determinación (R^2)	0.94	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.318	-	0.003
Nº de datos	6	6	5
Pendiente	0.0041	0.0034	0.0035
Término independiente	0.10	0.13	0.13
Coefficiente de determinación (R^2)	0.97	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.152	-	0.007
Nº de datos	5	5	3
Pendiente	0.0045	0.0052	0.0053
Término independiente	0.09	0.07	0.07
Coefficiente de determinación (R^2)	0.97	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.013	-	0.002

Tabla 5.6.- Parámetros de calibración, obtenidos con distintos métodos de regresión, para estimar la reproducibilidad del método voltamperométrico basado en DPV y SPC_{TFEs} .

	Regresión OLS	Regresión LMS	Regresión OLS sin anómalos
Nº de datos	7	7	4
Pendiente	0.0058	0.0044	0.0044
Término independiente	0.77	0.20	0.21
Coefficiente de determinación (R^2)	0.94	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.318	-	0.003
Nº de datos	7	7	4
Pendiente	0.0058	0.0042	0.0042
Término independiente	0.150	0.2354	0.2365
Coefficiente de determinación (R^2)	0.97	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.023	-	0.002
Nº de datos	6	6	5
Pendiente	0.0044	0.0038	0.0040
Término independiente	0.09	0.12	0.11
Coefficiente de determinación (R^2)	0.98	0.99	0.99
Desviación estándar residual	0.011	-	0.072

La repetibilidad y la reproducibilidad en términos de RSD asociada a las pendientes de las rectas de calibración, construidas utilizando SPCEs, fue 25.2 % (n = 3) y 4.8 % (n = 3), respectivamente.

De igual manera se analizó la capacidad de detección, que para una probabilidad de falso positivo y negativo de 0.05 fue de 13.3 ± 1.4 mM (n = 3).

5.3.- DETERMINACIÓN DE SMX EN MUESTRAS DE AGUA MEDIANTE VOLTAMPEROMETRÍA DIFERENCIAL DE IMPULSOS

La veracidad de un método analítico se puede demostrar de diversas formas, siendo las más utilizadas el empleo de materiales de referencia certificados, la comparación con un método de referencia o el análisis de muestras manufacturadas con un contenido de analito conocido [52, 53].

En este caso, se analizó el contenido de SMX en agua enriquecida de río mediante adición estándar, para minimizar el efecto matriz, utilizando los distintos sensores serigrafados.

5.3.1.- SPCEs

En la figura 5.5 se muestran los voltamperogramas registrados, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3, para la realización de una curva de calibrado

mediante la adición de idénticos volúmenes de una disolución 1 mM de SMX sobre una muestra enriquecida, a una concentración final 1.0 mM de SMX, de agua de río.

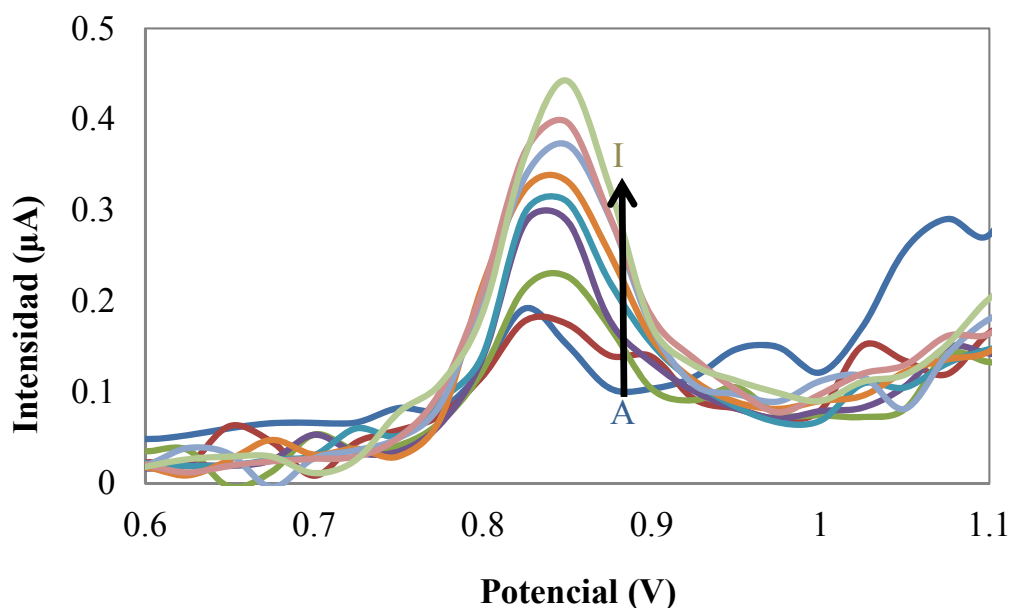


Figura 5.5.- Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en electrolito de soporte pH 6 (A), en agua de río enriquecida (B) y en disoluciones de SMX de concentración 9.9 µM (C), 19.6 µM (D), 29.1 µM (E), 38.5 µM (F) 47.6 µM (G) 56.6 µM (H) y 82.6. µM (I) utilizando SPCEs.

Las distintas curvas de calibración obtenidas, evaluadas óptimamente mediante el procedimiento descrito en la sección 5.1.1, condujeron a un valor de SMX en agua de río de 2.2 ± 0.7 , valor superior al de la muestra enriquecida (Tabla 5.7), lo que se atribuyó a la complejidad de la matriz de esta muestra.

Tabla 5.7.- Factor de recuperación, RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de SMX obtenidos en las muestras de agua de río, utilizando SPCEs.

Concentración de SMX en la muestra enriquecida (mM)	Concentración de SMX detectada (mM)	Factor de recuperación (%)	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
	2.5	250		
1.0	1.5	150	26.6	2.2 ± 0.7
	2.5	250		

Por tanto, se realizó el mismo análisis utilizando electrodos serigrafiados modificados con TTF, ya que la interacción selectiva entre el mediador y el antibiótico SMX podría obviar la presencia de interferentes en la matriz de agua de río que enmascaran el tamaño de la señal de oxidación.

5.3.2.- SPC_{TTFEs}

De forma análoga se analizó el agua de río enriquecida con SMX hasta una concentración final de 1.0 mM mediante DPV, utilizando SPC_{TTFEs} . En la figura 5.6 se muestran los voltamperogramas registrados, siguiendo el procedimiento descrito en la sección 4.3, para la realización de una curva de calibrado mediante la adición de idénticos volúmenes de una disolución 1 mM de SMX sobre la muestra enriquecida de agua de río.

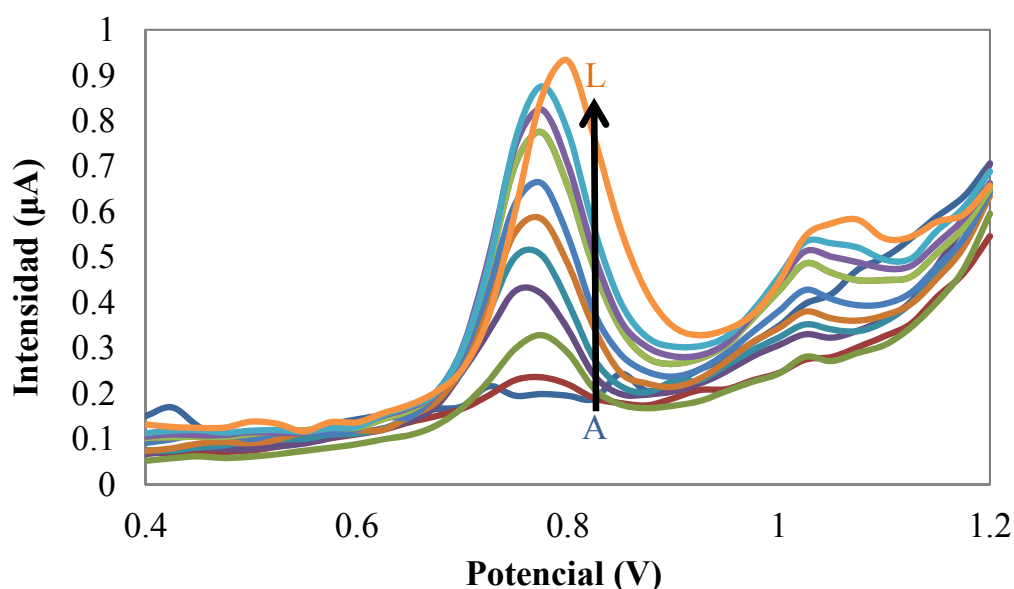


Figura 5.6.- Voltamperogramas diferenciales de impulsos registrados en electrolito de soporte pH 6 (A), en agua de río enriquecida (B) y en disoluciones de SMX de concentración, 9.9 μM (C), 19.6 μM (D), 29.1 μM (E), 38.5 μM (F) 47.6 μM (G) 56.6 μM (H), 82.6. μM (I), 90.9 μM (J), 99.1 μM (K) y 107.1 μM (L), utilizando SPC_{TTFEs} .

Las distintas curvas de calibración obtenidas, evaluadas óptimamente mediante el procedimiento descrito en la sección 5.1.1, condujeron satisfactoriamente al valor del contenido de SMX en la muestra de agua de río enriquecida que se muestra en la tabla 5.8, en términos de factor de recuperación, de RSD y de intervalo de confianza para la media.

Para asegurar la viabilidad de este procedimiento en la determinación de SMX en muestras complejas, se analizó igualmente una muestra de agua de grifo enriquecida. El análisis mediante adición estándar condujo a los excelentes resultados que se muestran en la tabla 5.9, y que ponen de manifiesto la validez del procedimiento

voltamperométrico desarrollado para la detección y cuantificación de este antibiótico en muestras de agua de diferente procedencia.

Tabla 5.8.- Factor de recuperación, RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de SMX obtenidos en las muestras de agua de río, utilizando SPC_{TTFEs} .

Concentración de SMX en las muestras enriquecidas (mM)	Concentración de SMX detectada (mM)	Factor de recuperación (%)	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
1.0	1.1	101.6	11.5	1.0 ± 0.1
	0.9	84.9		
	1.0	106.1		

Tabla 5.9.- Factor de recuperación, RSD e intervalo de confianza para la media de los valores de SMX obtenidos en las muestras de agua de grifo, utilizando SPC_{TTFEs} .

Concentración de SMX en las muestras enriquecidas (mM)	Concentración de SMX detectada (mM)	Factor de recuperación (%)	RSD (%)	Intervalo de confianza al 95% para la media
1.1	1.1	95.6	6.6	1.2 ± 0.1
	1.2	107.0		
	1.2	107.9		

6.- CONCLUSIONES

Con los datos recogidos en este trabajo se puede concluir que:

- El empleo de sensores construidos a partir de electrodos de carbono serigrafiados supone una técnica sencilla, reproducible, repetible y económica para la detección voltamperométrica de SMX.
- La inmovilización del mediador TTF en el electrodo de trabajo proporciona una mayor selectividad a los dispositivos desarrollados, lo que facilita la cuantificación de SMX en muestras de aguas de diferente procedencia, como agua de río y de grifo.
- Los dos procedimientos voltamperométricos desarrollados basados en el uso de SPCEs y SPC_{TTF}Es se caracterizan por valores de capacidad de detección del orden de los descritos en la bibliografía, en los que se utilizan electrodos con complejas modificaciones, lo que pone de manifiesto la gran utilidad de estos sencillos dispositivos serigrafiados.

7.- REFERENCIAS

- [1] A. Sapkota, A.R. Sapkota, M. Kucharski, J. Burke, S. McKenzie, P. Walker, R. Lawrence, *Aquaculture practices and potential human health risks: Current knowledge and future priorities*, Environment International, 34 (2008) 1215-26.
- [2] J.P. Hart, S.A. Wring, *Recent developments in the design and application of screen-printed electrochemical sensors for biomedical, environmental and industrial analyses*, TrAC Trends in Analytical Chemistry, 16 (1997) 89-103.
- [3] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, M.J. Arcos-Martínez, Enzyme modified screen printed electrodes, in: R. Comeaux, P. Novotny (Eds.), *Biosensors: Properties, Materials and Applications*, Nova Publishers, Hauppauge NY, 2009.
- [4] O. Domínguez-Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos-Martínez, *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, Talanta, 73 (2007) 202-19.
- [5] F.C. Cabello, *Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment*, Environmental Microbiology, 8 (2006) 1137-44.
- [6] C.D. Souza, O.C. Braga, I.C. Vieira, A. Spinelli, *Electroanalytical determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in pharmaceuticals using a boron-doped diamond electrode*, Sensors and Actuators B: Chemical, 135 (2008) 66-73.
- [7] A. Dirany, I. Sirés, N. Oturan, M.A. Oturan, *Electrochemical abatement of the antibiotic sulfamethoxazole from water*, Chemosphere, 81 (2010) 594-602.
- [8] P. Gao, D. Mao, Y. Luo, L. Wang, B. Xu, L. Xu, *Occurrence of sulfonamide and tetracycline-resistant bacteria and resistance genes in aquaculture environment*, Water Research, 46 (2012) 2355-64.

- [9] S.A.A. Almeida, F.T.C. Moreira, A.M. Heitor, M.C.B.S.M. Montenegro, G.G. Aguilar, M.G.F. Sales, *Sulphonamide-imprinted sol-gel materials as ionophores in potentiometric transduction*, Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications, 31 (2011) 1784-90.
- [10] S.A.A. Almeida, M.C.B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *New and low cost plastic membrane electrode with low detection limits for sulfadimethoxine determination in aquaculture waters*, Journal of Electroanalytical Chemistry, 709 (2013) 39-45.
- [11] F. Conzuelo, S. Campuzano, M. Gamella, D.G. Pinacho, A.J. Reviejo, M.P. Marco, J.M. Pingarrón, *Integrated disposable electrochemical immunosensors for the simultaneous determination of sulfonamide and tetracycline antibiotics residues in milk*, Biosensors and Bioelectronics, 50 (2013) 100-5.
- [12] S. Centi, A.I. Stoica, S. Laschi, M. Mascini, *Development of an electrochemical immunoassay based on the use of an eight-electrodes screen-printed array coupled with magnetic beads for the detection of antimicrobial sulfonamides in honey*, Electroanalysis, 22 (2010) 1881-8.
- [13] S.A.A. Almeida, A.M. Heitor, M.C.B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *Sulfadiazine-selective determination in aquaculture environment: Selective potentiometric transduction by neutral or charged ionophores*, Talanta, 85 (2011) 1508-16.
- [14] M. Arvand, R. Ansari, L. Heydari, *Electrocatalytic oxidation and differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole using carbon nanotube paste electrode*, Materials Science and Engineering: C, 31 (2011) 1819-25.
- [15] W.M.M. Mahmoud, N.D.H. Khaleel, G.M. Hadad, R.A. Abdel-Salam, A. Haiß, K. Kümmerer, *Simultaneous determination of 11 sulfonamides by HPLC–UV and application for fast screening of their aerobic elimination and biodegradation in a simple test*, CLEAN – Soil, Air, Water, 41 (2013) 907-16.
- [16] Y. Li, J. Han, Y. Yan, B. Chen, G. Zhang, Y. Liu, C. Sheng, *Simultaneous extraction and determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole in water samples and aquaculture products using [Bmim]BF₄/(NH₄)₃C₆H₅O₇ aqueous two-phase system coupled with HPLC*, J IRAN CHEM SOC, 10 (2013) 339-46.
- [17] Z. Zhou, J.Q. Jiang, *Simultaneous detection of sulfamethoxazole, diclofenac, carbamazepine, and bezafibrate by solid phase extraction and high performance liquid chromatography with diode array detection*, J Appl Spectrosc, 81 (2014) 273-8.
- [18] V. Goulas, T. Anisimova Andreou, C. Angastinioti Moditi, O. Tzamaloukas, *A rapid HPLC method for the determination of sulphonamides and trimethoprim in feed premixes*, Journal of Animal and Feed Sciences, 23 (2014) 185-9.
- [19] L. Jank, R.B. Hoff, F.J.d. Costa, T.M. Pizzolato, *Simultaneous determination of eight antibiotics from distinct classes in surface and wastewater samples by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography–electrospray ionisation mass spectrometry*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94 (2014) 1013-37.
- [20] J. Rossmann, S. Schubert, R. Gurke, R. Oertel, W. Kirch, *Simultaneous determination of most prescribed antibiotics in multiple urban wastewater by SPE-LC–MS/MS*, Journal of Chromatography B, 969 (2014) 162-70.

- [21] A. Garcia-Rodríguez, E. Sagristà, V. Matamoros, C. Fontàs, M. Hidalgo, V. Salvadó, *Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using a standard addition method approach*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 94 (2014) 1199-209.
- [22] H. Zhao, M. Ding, Y. Gao, W. Deng, *Determination of sulfonamides in pork, egg, and chicken using multiwalled carbon nanotubes as a solid-phase extraction sorbent followed by ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, Journal of AOAC International, 97 (2014) 1481-8.
- [23] B. Chiavarino, M. Elisa Crestoni, A. Di Marzio, S. Fornarini, *Determination of sulfonamide antibiotics by gas chromatography coupled with atomic emission detection*, Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 706 (1998) 269-77.
- [24] T. You, X. Yang, E. Wang, *Determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole by capillary electrophoresis with end-column electrochemical detection*, Analyst, 123 (1998) 2357-60.
- [25] D. Teshima, K. Otsubo, K. Makino, Y. Itoh, R. Oishi, *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in human plasma by capillary zone electrophoresis*, Biomedical Chromatography, 18 (2004) 51-4.
- [26] C. Qing-Cui, T. Xiu-Hui, J. Lian-Mei, Z. Wen-Jun, Y. Jian-Nong, *Determination of effective ingredients in compound sulfamethoxazole tablets by capillary electrophoresis with amperometric detection*, Chinese Journal of Analytical Chemistry, 36 (2008) 292-6.
- [27] R.B. Hoff, F. Barreto, T.B.L. Kist, *Use of capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection to screen and liquid chromatography–tandem mass spectrometry to confirm sulfonamide residues: Validation according to European Union 2002/657/EC*, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 8254-61.
- [28] M.U. Farooq, P. Su, Y. Yang, *Applications of a novel sample preparation method for the determination of sulfonamides in edible meat by CZE*, Chromatographia, 69 (2009) 1107-11.
- [29] F.J. Lara, A.M. García-Campaña, C. Neusüss, F. Alés-Barrero, *Determination of sulfonamide residues in water samples by in-line solid-phase extraction-capillary electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 1216 (2009) 3372-9.
- [30] S.E. Gibbons, C. Wang, Y. Ma, *Determination of pharmaceutical and personal care products in wastewater by capillary electrophoresis with UV detection*, Talanta, 84 (2011) 1163-8.
- [31] Y. Li, Y. Cui, B. Jia, H. Wang, C. Liu, Y. Qi, *Capillary electrophoresis with field-amplified sample stacking for rapid and sensitive determination of sulfadiazine and sulfamethoxazole*, Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences, 67 (2012) 768-73.
- [32] F. Tong, Y. Zhang, F. Chen, Y. Li, G. Ma, Y. Chen, K. Liu, J. Dong, J. Ye, Q. Chu, *Hollow-fiber liquid-phase microextraction combined with capillary electrophoresis for trace analysis of sulfonamide compounds*, Journal of Chromatography B, 942–943 (2013) 134-40.
- [33] I.S. Da Silva, D.T.R. Vidal, C.L. Do Lago, L. Angnes, *Fast simultaneous determination of trimethoprim and sulfamethoxazole by capillary zone electrophoresis with capacitively*

- coupled contactless conductivity detection*, Journal of Separation Science, 36 (2013) 1405-9.
- [34] H. Sun, H. Qi, H. Li, *Development of capillary electrophoretic method combined with accelerated solvent extraction for simultaneous determination of residual sulfonamides and their acetylated metabolites in aquatic products*, Food Analytical Methods, 6 (2013) 1049-55.
- [35] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch, Principles of instrumental analysis, Belmont: Thomson Brooks/Cole, Cengage Learning; 2007.
- [36] P.B. Issopoulos, *Analysis of various very slightly water soluble drugs in micellar medium: II. Potentiometric and visual determination of sulphamethoxazole in pure form*, Fresenius' Journal of Analytical Chemistry, 354 (1996) 378-80.
- [37] M.M. Abdul Kamal Nazer, T.K. Shabeer, P. Riyazuddin, *Indirect potentiometric titration of sulphamethoxazole in the presence of trimethoprim in co-trimazole tablets using copper based mercury film electrode*, Chemical and Pharmaceutical Bulletin, 49 (2001) 278-81.
- [38] S.A.A. Almeida, A.M. Heitor, L.C. Sa, J. Barbosa, M. da Conceicao, B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *Solid contact PVC membrane electrodes based on neutral or charged carriers for the selective reading of anionic sulfamethoxazole and their application to the analysis of aquaculture water*, International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 92 (2012) 479-95.
- [39] S.A.A. Almeida, E. Arasa, M. Puyol, C.S. Martinez-Cisneros, J. Alonso-Chamarro, M.C.B.S.M. Montenegro, M.G.F. Sales, *Novel LTCC-potentiometric microfluidic device for biparametric analysis of organic compounds carrying plastic antibodies as ionophores: Application to sulfamethoxazole and trimethoprim*, Biosensors & Bioelectronics, 30 (2011) 197-203.
- [40] M. Arvand, F. Alirezanejad, *Sulfamethoxazole-imprinted polymeric receptor as ionophore for potentiometric transduction*, Electroanalysis, 23 (2011) 1948-57.
- [41] S.A.A. Almeida, L.A.A.N.A. Truta, R.B. Queiros, M.C.B.S.M. Montenegro, A.L. Cunha, M.G.F. Sales, *Optimizing potentiometric ionophore and electrode design for environmental on-site control of antibiotic drugs: Application to sulfamethoxazole*, Biosensors & Bioelectronics, 35 (2012) 319-26.
- [42] T.A.M. Msagati, J.C. Ngila, *Voltammetric detection of sulfonamides at a poly(3-methylthiophene) electrode*, Talanta, 58 (2002) 605-10.
- [43] L.S. Andrade, R.C. Rocha-Filho, Q.B. Cass, O. Fatibello-Filho, *Simultaneous differential pulse voltammetric determination of sulfamethoxazole and trimethoprim on a boron-doped diamond electrode*, Electroanalysis, 21 (2009) 1475-80.
- [44] S. Issac, K.G. Kumar, *Voltammetric determination of sulfamethoxazole at a multiwalled carbon nanotube modified glassy carbon sensor and its application studies*, Drug Testing and Analysis, 1 (2009) 350-4.
- [45] R. Joseph, K. Girish Kumar, *Differential pulse voltammetric determination and catalytic oxidation of sulfamethoxazole using [5,10,15,20-tetrakis (3-methoxy-4-hydroxy phenyl) porphyrinato] Cu (II) modified carbon paste sensor*, Drug Testing and Analysis, 2 (2010) 278-83.

- [46] L. Santos Andrade, R. Cardozo Rocha-Filho, Q. Bezerra Cass, O. Fatibello-Filho, *A novel multicommutation stopped-flow system for the simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim by differential pulse voltammetry on a boron-doped diamond electrode*, Analytical Methods, 2 (2010) 402-7.
- [47] I. Cesarino, V. Cesarino, M.R.V. Lanza, *Carbon nanotubes modified with antimony nanoparticles in a paraffin composite electrode: Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim*, Sensors and Actuators B: Chemical, 188 (2013) 1293-9.
- [48] G.N. Calaça, C.A. Pessoa, K. Wohnrath, N. Nagata, *Simultaneous determination of sulfamethoxazole and trimethoprim in pharmaceutical formulations by square wave voltammetry*, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 6 (2014) 438-42.
- [49] J.M. Cooper, A.E.G. Cass, *Biosensors: a practical approach*, 2nd ed., Oxford: Oxford University Press; 2004.
- [50] M. Tudorache, C. Bala, *Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 388 (2007) 565-78.
- [51] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. del Torno-de Roman, M.J. Arcos-Martínez, *Horseradish peroxidase-screen printed biosensors for determination of Ochratoxin A*, Analytica Chimica Acta, 688 (2010) 49-53.
- [52] Á. Ríos Castro, M.C. Moreno Bondi, B.M. Simonet Suau, *Técnicas espectroscópicas en química analítica*, Madrid: Síntesis; 2012.
- [53] ISO 5725: 1994 (Reviewed in 2013), Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
- [54] P.J. Rousseeuw, A.M. Leroy, *Robust regression and outlier detection*, New York: Wiley; 1989.
- [55] J. Inczédy, T. Lengyel, A.M. Ure, A. Gelencsér, A. Hulanicki, *Compendium of Analytical Nomenclature*, 3rd ed, Baltimore: Port City Press Inc; 2000.
- [56] ISO 11843: Part I 1997 and Part II 2000, Capability of detection.
- [57] R. Cela, M. Blanco, *Avances en quimiometría práctica*, Santiago de Compostela: Universidade, Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico; 1994.
- [58] L. Sarabia, M.C. Ortiz, *Detarchi - A program for detection limits with specified assurance probabilities and characteristic curves of detection*, Trac-Trends In Analytical Chemistry, 13 (1994) 1-6.
- [59] M.A. Alonso-Lomillo, O. Domínguez-Renedo, L. Ferreira-Gonçalves, M.J. Arcos-Martínez, *Sensitive enzyme-biosensor based on screen-printed electrodes for Ochratoxin A*, Biosensors & Bioelectronics, 25 (2010) 1333-7.