

SEMINARIO 2

**ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VIS
ESPECTROSCOPÍA DE FLUORESCENCIA MOLECULAR**

La vitamina B₂ o riboflavina mejora el estado de las células del sistema nervioso y colabora en la regeneración de tejidos como piel, cabello, uñas y mucosas, y de forma especial en la integridad de la córnea, contribuyendo de esta manera a mejorar la salud visual.

Existe una gran variedad de alimentos ricos en riboflavina como cereales de maíz y de trigo, carne de buey y de cerdo, lácteos (diversas clases de quesos), o pescados. Un problema asociado a ciertos alimentos radica en su procesado. La cocción de los alimentos produce una disminución del contenido de riboflavina muy superior al observado, por ejemplo, si el alimento se procesa en un horno de microondas.

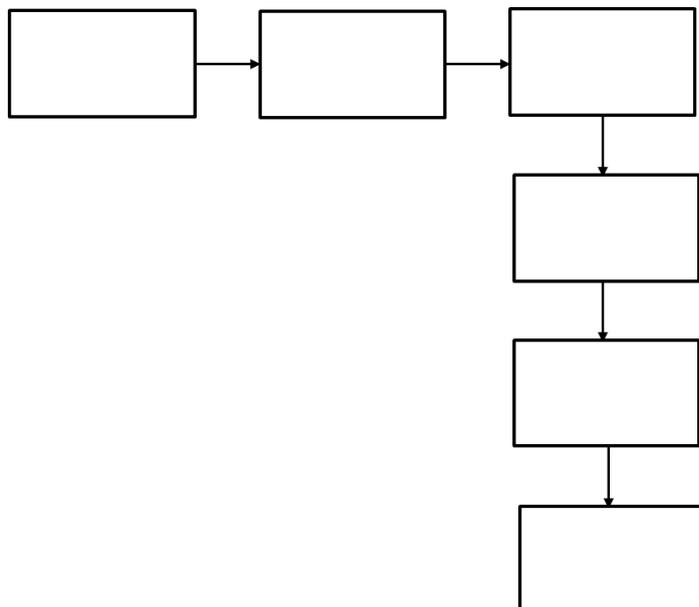
Una empresa dedicada a la preparación y procesado de lubina para la venta al público adquirió un Espectrofotómetro UV-Vis y un equipo de Fluorescencia Molecular para la cuantificación de vitamina B₂ en dos muestras de pescado.

1. ¿Qué componentes tienen los equipos de Espectrofotometría UV-Vis y de Fluorescencia Molecular? Rellenar los siguientes diagramas.

ESPECTROFOTÓMETRO UV-Vis



FLUORESCENCIA MOLECULAR



2. ¿Qué fuentes de radiación electromagnética se utilizan comúnmente en ambas técnicas?

3. Los responsables de compras de la empresa compararon varios equipos de diferentes marcas antes de proceder a su compra. ¿Qué característica de los diferentes equipos hizo que se compraran de una marca concreta?

Los reactivos, patrones y la metodología a utilizar en la determinación de la riboflavina se presentan a continuación.

Reactivos:

Patrón (estándar) analítico primario de riboflavina de 250,0 mg L⁻¹.

Material de referencia certificado para la medida de riboflavina en muestras de pescado ([B₂]= 100,0 ± 0,1 µg mL⁻¹).

Reactivos químicos diversos.

Preparación de las muestras:

Las lubinas se lavan con abundante agua, se abren para retirar la cabeza y la raspa, y se les quita la piel. A continuación, los lomos se procesan por cocción (MUESTRA 1) y en horno microondas (MUESTRA 2). La cantidad de cada muestra para su posterior análisis fue de 50,00 g para la MUESTRA 1, y 47,50 g para la MUESTRA 2. Las muestras se ponen en contacto con 50,0 mL de una disolución acuosa de tampón fosfato (pH=7,0) y se agitaron mecánicamente durante 30 min. Después de la agitación, se filtra a vacío con un embudo Büchner, recogiendo el filtrado para su análisis. Los filtrados se guardaron en la oscuridad a 4°C, para preservar la vitamina B₂.

Para la elección de la técnica, Espectrofotometría UV-Vis y Fluorescencia Molecular, se obtuvieron a) las características analíticas del método: sensibilidad, LOD, LOQ e intervalo lineal, y b) la exactitud del método.

Con respecto al estudio de las características analíticas del método, este se llevó a cabo de la siguiente forma:

Calibración metodológica mediante el método del patrón externo

En la Figura 1 se muestra el espectro de absorción molecular de la riboflavina en una concentración 8,0 mg L⁻¹ a pH = 7,0.

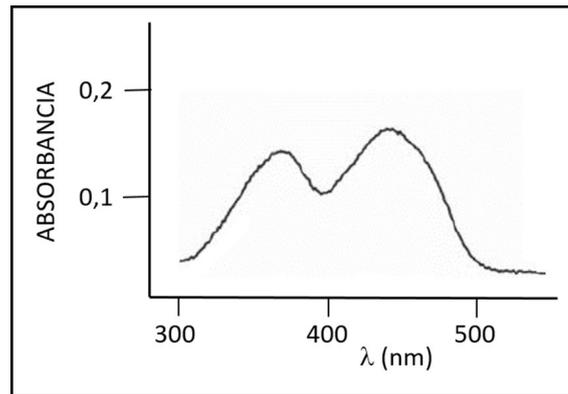


FIGURA 1

En la Figura 2 se recoge el espectro de fluorescencia molecular (mapa de contorno) a dos valores de pH para una concentración de riboflavina de 0,2 mg L⁻¹.

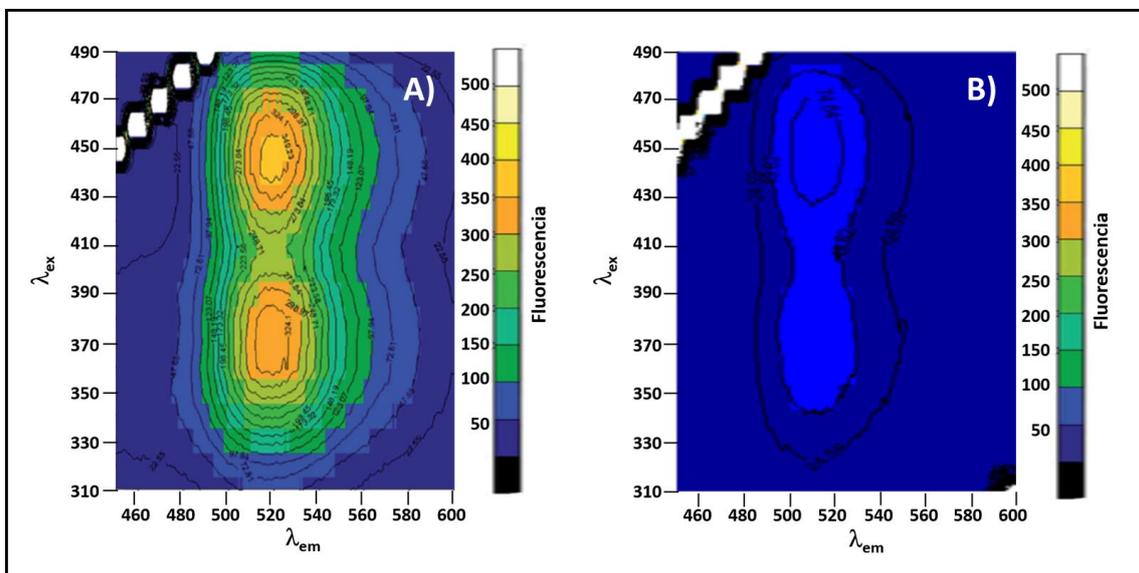


FIGURA 2. A) pH = 7,0, B) pH= 12,0

4. ¿Cuáles son los valores óptimos de longitudes de onda de medida para ambas técnicas?

5. ¿Por qué, en la Figura 2, los espectros de fluorescencia son diferentes a pH=7,0 y pH=12,0?

Las Tablas I y II muestran los datos del calibrado por Espectrofotometría UV-Vis, una vez corregido el blanco, y por Fluorescencia Molecular, a las longitudes óptimas de medida y pH=7,0, respectivamente.

TABLA I

[B₂] (mg L⁻¹)	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	15,0
Absorbancia	0,038	0,077	0,115	0,150	0,190	0,245

TABLA II

[B₂] (mg L⁻¹)	0	0,05	0,08	0,10	0,20	0,30	0,50
Fluorescencia	10,2	96,5	150,1	187,0	360,2	535,1	887,0

6. Representar los datos de las Tablas I y II. Aplicar el método de mínimos cuadrados y obtener los valores de ordenada en el origen (con su error), de pendiente (con su error) y el coeficiente de correlación.

7. Obtener el valor de la absortividad molar para espectrofotometría UV-Vis (b=1 cm). Comparar la sensibilidad de ambos métodos espectroscópicos.

8. Obtener los límites de detección y de cuantificación, y el intervalo lineal, para ambos métodos.

El estudio sobre la exactitud del método se realizó analizando la cantidad de riboflavina en el material de referencia certificado. Para Espectrofotometría UV-Vis se tomaron 2,0 mL del MRC y se llevaron a un matraz de 50,0 mL enrasando con la disolución tampón de pH=7,0, a continuación, se procedió a medir la absorbancia a la λ de medida. En el caso de la Fluorescencia Molecular, se tomaron 100 μ L del MRC y se llevaron a un matraz de 50,0 mL enrasando con la disolución tampón de pH=7,0, a continuación, se procedió a medir la fluorescencia a las λ óptimas. La Tabla III muestra los valores de las señales analíticas obtenidas por ambas técnicas.

TABLA III

Absorbancia	0,076	0,075	0,075	0,073	0,076
Fluorescencia	360,1	362,2	358,6	359,7	361,2

9. Obtener la concentración de riboflavina en el MRC por ambas técnicas con su intervalo de confianza al 95%. ¿Qué se puede deducir sobre la exactitud?

10. Elegir la técnica instrumental para el análisis de la vitamina B₂, justificando la respuesta.

De los filtrados de las muestras (ver apartado Preparación de las muestras), se tomaron 2,0 mL de cada uno de ellos en matraces de 10 mL enrasando con la disolución tampón de pH=7,0. A continuación se obtienen los valores de señal correspondientes a la técnica elegida, Tabla IV.

TABLA IV

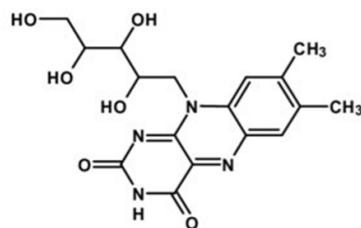
MUESTRA 1	157,2	150,0	152,1	149,8	160,1
MUESTRA 2	360,0	358,1	362,3	359,4	361,3

11. Obtener la cantidad de riboflavina, expresada correctamente, en las muestras en $\mu\text{g}/100 \text{ g}_{\text{muestra}}$

12. Comente los resultados obtenidos sabiendo que la cantidad de riboflavina presente en muestras de lubina sin procesar es del orden de $160,0 \mu\text{g}/100 \text{g}_{\text{muestra}}$

DATOS DE LA RIBOFLAVINA o VITAMINA B₂

- Estructura



- $M_r = 376,36 \text{ g mol}^{-1}$ $\text{pK}_a = 10,2$ $\log K_{o/w} = -1,46$
- $\Phi_F = 0,94$ a $\text{pH} = 7,0$ $\Phi_F = 0,12$ a $\text{pH} = 12,0$