



UNIVERSIDAD DE OVIEDO

FACULTAD DE QUÍMICA

**DETERMINACIÓN DE VITAMINA E
(TOCOFEROL) EN MANTEQUILLAS Y
MARGARINA**

TRABAJO FIN DE GRADO EN QUÍMICA

Darío Sánchez González

Oviedo, junio, 2023

Agradecimientos

Finalmente, como resultado de meses de duro esfuerzo y dedicación el presente trabajo finaliza, cerrando una etapa de grado que comprendió desde un primer inicio en el 2019 hasta este último año 2023.

Antes que nada, me gustaría agradecer desde mi más profunda sinceridad el apoyo incondicional de mi tutora del TFG, Rosana Badía Laiño, por sus horas de dedicación, por haberme apoyado en los momentos de mayor presión, por brindarme su ayuda cuando la he necesitado, y por supuesto, por intentar transmitirme sus consejos debido a su gran experiencia.

Así mismo, y no por ello menos importante, quisiera agradecer también el apoyo a Ana Belén Soldado Cabezuelo, tutora de los TFG de algunos de mis compañeros, que al igual que Rosana, me ha extendido su mano cuando más lo necesitaba, y por supuesto, al resto de compañeros que han experimentado sus respectivos trabajos paralelamente al mío, y que han hecho mucho más amenas las horas de trabajo.

Además, quisiera agradecer el apoyo recibido por parte de mis familiares y amigos no solo a lo largo de estos últimos meses, sino de los 4 años que me ha llevado comprender esta gran etapa.

Darío Sánchez González

ÍNDICE DEL CONTENIDO

1. Resumen.....	4
2. Introducción.....	4
2.1 Vitamina E.....	4
2.2 Situación actual sobre el control de los niveles de vitamina E.....	5
2.3 Mantequillas y margarinas.....	5
2.4 Métodos ópticos espectroscópicos aplicados al análisis de vitamina E en mantequillas y margarinas.....	6
2.4.1 <i>Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-VIS)</i>	7
2.4.2 <i>Fluorescencia molecular</i>	7
2.4.3 <i>Quimioluminiscencia</i>	8
2.5 Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de Vitamina E.....	8
2.5.1 <i>Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS)</i> ...8	
2.5.2 <i>Método FRAP</i>	9
2.5.3 <i>Reacción de Emmerie-Engel</i>	9
2.5.4 <i>Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)-Detector espectrofotométrico</i>	9
2.5.5 <i>Sistema de inyección de flujo (FIA) con detección quimioluminiscente</i>	10
2.6 Elección de una técnica analítica.....	10
2.7 Pretratamientos.....	11
3. Objetivos.....	11
4. Procedimiento experimental.....	12
4.1 Equipos e instrumentación necesaria.....	12
4.1.1 <i>Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS, de Thermo SCIENTIFIC</i>	12
4.1.2 <i>Espectrómetro de luminiscencia LS45 PerkinElmer</i>	13
4.2 Reactivos necesarios.....	14
4.3 Muestras.....	14
4.4 Método operativo.....	14

4.4.1 Preparación de la disolución de α -tocoferol.....	14
4.4.2 Espectros de absorción, excitación y emisión del α -tocoferol.....	14
4.4.3 Preparación, medida de fluorescencia y representación de los patrones. .	15
4.4.4 Caracterización analítica del método.....	15
4.4.5 Pretratamiento de las muestras de margarina y mantequilla.	16
4.4.6 Medida de fluorescencia de las muestras.....	16
4.4.7 Medida de fluorescencia de las muestras con adiciones y representación de las muestras.	17
4.4.8 Cálculo del error aleatorio en la concentración de α -tocoferol hallada en las muestras por extrapolación.	18
5. Resultados y discusión.	18
5.1 Preparación de la disolución patrón de α -tocoferol.....	18
5.2 Espectros de absorción, excitación y emisión del α -tocoferol.....	19
5.3 Medida de fluorescencia y calibración.....	20
5.4 Caracterización analítica del método.....	22
5.5 Medida de fluorescencia de las muestras.....	22
5.6 Cuantificación del α -tocoferol en las muestras por adiciones estándar.....	23
5.7 Cálculo del error aleatorio en la concentración de α -tocoferol hallada en las muestras por extrapolación.....	25
5.8 Interferencias de matriz.....	26
6. Conclusiones.	27
7. Bibliografía.	28
8. Anexos.....	i

ÍNDICE DE ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

UV-VIS.....	Ultravioleta visible.
GC/MS.....	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
TPTZ.....	2,4,6-Tripiridil-s-Triazina.
HPLC.....	Cromatografía líquida de alta eficacia.
FIA.....	Sistema de inyección de flujo.
SDS.....	Dodecilsulfato sódico.
Brij-35.....	2-(dodeciloxi)etano-1-ol.
CTAB.....	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
Triton-X100.....	2-[4-(2,4,4-trimetilpentano-2-il)fenoxi]etanol.
u.a.....	Unidades arbitrarias.
$S_{y/x}$	Errores aleatorios en la dirección de y.
S_{x_E}	Desviación estándar del valor extrapolado de x(x_E).
LOD.....	Límite de detección.
LOQ.....	Límite de cuantificación.

1. Resumen.

La vitamina E, o tocoferol, es fundamental en el metabolismo celular, pero puede presentar efectos perjudiciales para la salud de los seres humanos, que pueden ser provocados tanto por un exceso como por un defecto de la misma. La deficiencia de vitamina E está relacionada con distintos problemas de salud, siendo los más comunes el síndrome de mala absorción de grasas o, la fibrosis quística, los trastornos genéticos del transporte de las proteínas o de la unión de las mismas, así como enfermedades que afectan al correcto funcionamiento del hígado, entre otros. Además, se ha observado una relación entre la deficiencia de esta vitamina y los nacimientos prematuros, de forma que algunos de los recién nacidos presentan graves problemas de salud como la anemia hemolítica. Sin embargo, se ha observado que aquellos individuos que presentan una gran cantidad de vitamina E en el organismo sufren diversas alteraciones celulares y metabólicas [1]. Existen en el comercio productos alimentarios que contienen de forma natural o añadida esta vitamina. Como ya se ha mencionado, es importante controlar su consumo y por tanto cuantificar su contenido. En este trabajo se propone un método para la determinación de tocoferol en mantequillas basado en medidas de luminiscencia.

2. Introducción.

2.1 Vitamina E.

La vitamina E es una vitamina liposoluble que abarca diversos compuestos como los tocoferoles y los tocotrienoles, siendo el más importante el RRR- α -tocoferol, de ahí que se la identifique normalmente como tocoferol. El interés para la determinación de esta vitamina se encuentra en la diversidad de funciones que realiza, y que son necesarias para el ser humano. Entre las funciones más destacables se encuentran [2]:

- Acción antioxidante: Esta es la función más importante de la vitamina E, ya que esta vitamina es un antioxidante soluble en grasas.
- Efectos sobre la proliferación celular.
- Acción fagocítica en el sistema inmune.
- Mensajera del estado oxidativo celular.
- Relación con la apoptosis.

Debido a sus funciones, especialmente a la acción antioxidante, es común la utilización de la vitamina E en estudios contra diferentes enfermedades médicas, debido al importante papel que tiene este compuesto en la protección de las células, evitando que los

radicales libres presentes en contaminantes las dañen. La estructura de la vitamina E está compuesta por dos anillos y de una cadena lateral larga, como se muestra en la *figura 1*.

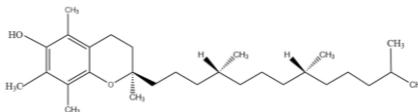


Figura 1: Representación realizada en ChemDraw de la estructura química de la vitamina E.

2.2 Situación actual sobre el control de los niveles de vitamina E.

Debido a la relación existente entre la vitamina E con algunos tipos de enfermedades, como la anemia hemolítica, la fibrosis quística o alteraciones celulares, entre otras [1], es importante seguir un control sobre el nivel de esta vitamina en algunos alimentos. Por ello, se intenta disminuir la probabilidad de padecer alguna de las enfermedades señaladas anteriormente, que pueden ser provocadas tanto por una escasez o por un exceso en la ingesta de esta vitamina. La vitamina E tiene una alta presencia en aceites vegetales, en frutos secos como las avellanas o los cacahuetes, en el huevo, en mantequillas, pescados y otros alimentos que consume el ser humano en su dieta.

Actualmente, se han desarrollado estudios con fines dietéticos, en los cuales se pretende conocer el nivel nutricional de la vitamina E en el organismo de diferentes individuos. Para la realización de estos estudios se han utilizado marcadores bioquímicos, destacando la concentración de α -tocoferol en el plasma, la concentración de vitamina E en función de la concentración de lípidos o incluso la existencia de tocoferol en los eritrocitos. Sin embargo, todos estos marcadores se ven afectados en mayor o menor medida por diversos factores entre ellos por ejemplo la edad. Por esta razón, estos marcadores biológicos no son de gran fiabilidad, y se recurre a utilizar otro marcador biológico presente en la orina, el cual es conocido como α -carboxi-etil. Además, el estudio de magnitudes que estén asociadas a productos de peroxidación lipídica también permite obtener cierta información sobre los niveles nutricionales de la vitamina E [1].

2.3 Mantequillas y margarinas.

Debido a que la vitamina E se caracteriza por ser liposoluble, y por su importante función como antioxidante, es frecuente su uso en el mercado alimentario, ya que de esta forma se logra atrasar la oxidación de varios de los compuestos presentes en distintos alimentos, entre los que se encuentran los ácidos grasos. Los ácidos grasos se hayan involucrados en numerosas reacciones dentro del cuerpo humano, pudiendo provocar

alteraciones, las cuales en ocasiones conducen al surgimiento de enfermedades de diversos tipos [3]. Por lo tanto, debido a la presencia de grasas en las mantequillas, este tipo de alimentos pueden contener de manera natural o añadida compuestos de la familia del tocoferol, por lo que es interesante la determinación de esta vitamina en ese tipo de productos alimenticios. Además, también se considerarán las margarinas como alimentos de interés para la determinación del contenido en esta vitamina, debido a que la adición de vitamina E en ellas es una práctica habitual.

Las margarinas son productos industriales que se elaboran con el objetivo de reducir el consumo de mantequillas. La principal diferencia entre la margarina y la mantequilla es la presencia de grasas saturadas en esta última, que puede producir el aumento del colesterol. La mantequilla tiene un origen natural, y se elabora a partir de la grasa láctea, mientras que la margarina es un producto procesado de origen vegetal, con alto contenido en grasas monoinsaturadas y polinsaturadas, ya que se obtiene a partir de la hidrogenación de aceites vegetales y marinos. La vitamina E se encuentra en mayor cantidad en las grasas vegetales que en las animales, por lo que se espera unos niveles más altos de esta vitamina en los diferentes tipos de margarinas [4]. El contenido en vitamina E que tienen las mantequillas y las margarinas puede variar en función del tipo de estas. Entre los diferentes tipos de mantequillas y margarinas que se comercializan se pueden encontrar los siguientes valores de esta vitamina por cada 100 gramos [W1]:

- Mantequilla:3,6 mg.
- Mantequilla salada:2,32 mg.
- Margarina:10 mg.
- Margarina salada:12,8 mg.
- Margarina de maíz:7,5 mg.
- Margarina ligera:6 mg.
- Margarina con esteroides:5,7 mg.

A continuación, se realiza un recopilatorio de los métodos ópticos espectroscópicos útiles para el análisis de la vitamina E, y posteriormente, se detallarán otras técnicas analíticas de interés para el análisis de esta vitamina.

2.4 Métodos ópticos espectroscópicos aplicados al análisis de vitamina E en mantequillas y margarinas.

Los distintos métodos ópticos espectroscópicos empleados para la detección de vitamina E están basados en el análisis de las interacciones de la radiación

electromagnética con la materia. En función de la longitud de onda se producen diferentes tipos de transiciones energéticas. A continuación, se mostrarán los fundamentos relacionados con los procesos de absorción, fluorescencia y quimioluminiscencia.

2.4.1 Espectroscopía de absorción ultravioleta visible (UV-VIS).

La espectroscopía de absorción ultravioleta visible responde a transiciones entre los niveles electrónicos de una molécula cuando se produce la absorción de un fotón con la energía adecuada. Este tipo de espectroscopía responde a la Ley de Beer, la cual permite conocer la concentración de la especie absorbente en función de la absorbancia molecular que presenta la misma [5].

La Ley de Beer se expresa como: $A=b \cdot \epsilon \cdot C$,

donde A es la absorbancia medida, ϵ es la absorptividad molar, b representa la longitud del haz luminoso que atraviesa la muestra y C la concentración de la especie absorbente. La absorción de una especie en el visible es debida a la presencia de grupos cromóforos, que son los responsables de generar el color que se observa [5]. Los grupos cromóforos más comunes son los dobles o triples enlaces entre átomos de carbono, los grupos carbonilo (C=O), diazo (N=N), nitro (NO₂) y los sistemas aromáticos. Los tocoferoles presentan absorbancia en la región del ultravioleta visible y de ahí que se utilice la espectroscopía de absorción UV-VIS para su caracterización y/o cuantificación.

2.4.2 Fluorescencia molecular.

La fluorescencia molecular se define como el proceso de emisión de luz por parte de una molécula que ha sido previamente sometida a un proceso de excitación fotónica. Antes de producirse la excitación de la molécula, esta se encuentra situada en un estado fundamental de energía, hasta el momento en el que la luz incide sobre ella excitándola hasta un nivel de mayor energía. En este momento, la molécula se encuentra en los niveles vibracionales del correspondiente estado excitado. Por último, la molécula sufre un proceso de relajación vibracional y rotacional al nivel de menor energía del estado excitado para finalmente perder energía en forma de fotones, a niveles vibracionales y electrónicos del nivel fundamental [6].

La medición de la fluorescencia molecular se puede llevar a cabo mediante un espectrofluorímetro, permitiendo realizar tanto un análisis cualitativo como cuantitativo. Estos equipos constan de una fuente de excitación, que suele ser una lámpara de arco de xenón que trabaja a alta presión, dos monocromadores de excitación y emisión, y un sistema de detección, el cual consiste en un fotomultiplicador. El sistema de detección está

situado con un ángulo de 90° respecto a la fuente. Este equipo permite obtener el espectro de emisión fijando una longitud de onda de excitación, λ_{exc} , y el espectro de excitación fijando la longitud de onda de emisión, λ_{em} [5]. Además, se debe de remarcar el hecho de que dado que las energías de fluorescencia son menores que las de absorción y, que como la longitud de onda es inversamente proporcional a la energía ($E=h\nu$, siendo h la constante de Planck y ν la frecuencia de la radiación, la cual se define en términos de la velocidad de la luz y de la longitud de onda $\nu=c/\lambda$), el espectro de emisión se encontrará a longitudes de onda mayores que el de excitación, ya que la excitación se relaciona con el proceso de absorción [7].

2.4.3 Quimioluminiscencia.

La quimioluminiscencia es un término que define el fenómeno en el que la emisión de radiación electromagnética es producida por una reacción química, es decir, a diferencia de la fluorescencia no existe una excitación fotónica. La radiación emitida por uno de los productos de la reacción se encuentra en la región del visible o del infrarrojo cercano. Precisamente, el hecho de no requerir de una fuente de excitación electromagnética es una de las ventajas de esta técnica, ya que, al no requerirse esta fuente, la instrumentación que se emplea es más sencilla. Por esta razón, la medición de la quimioluminiscencia puede realizarse empleando un detector adecuado o bien puede realizarse con un fluorímetro, siempre y cuando su fuente de excitación se encuentre apagada [8].

2.5 Técnicas analíticas para la determinación y cuantificación de Vitamina E.

2.5.1 Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS).

La cromatografía de gases es una de las técnicas analíticas que se puede utilizar para el análisis de la vitamina E. Sin embargo, en este caso se deben de saponificar las muestras, es decir, se requiere un paso previo de derivatización para evitar problemas de volatilidad. En función de la columna seleccionada se conseguirá una buena separación de los compuestos de la muestra, para posteriormente ser identificados en el cromatógrafo de gases por comparación con los cromatogramas de patrones de referencia [9]. El uso de un detector de masas permite una buena selectividad y sensibilidad permitiendo cuantificar trazas en muestras que sean de una alta complejidad. Además, este método también ofrece unas condiciones de trabajo comprendidas entre $\mu\text{g/L}$ y mg/L para muestras líquidas, y entre $\mu\text{g/Kg}$ y $\mu\text{g/g}$ para muestras sólidas.

2.5.2 Método FRAP.

Este método se apoya en la capacidad que tienen los antioxidantes de reducir iones férricos a ferrosos, es decir, evalúa la capacidad reductora de estos compuestos mediante la transferencia de electrones. Posteriormente, una vez que se ha obtenido el ion ferroso se le hace reaccionar con 2,4,6-Tripiridil-s-Triazina (TPTZ), formando un complejo coloreado de color azul que puede medirse a una longitud de onda de 593nm [10], como se muestra en la *figura 2*. Por último, se realizará la cuantificación mediante un patrón externo llamado trolox.

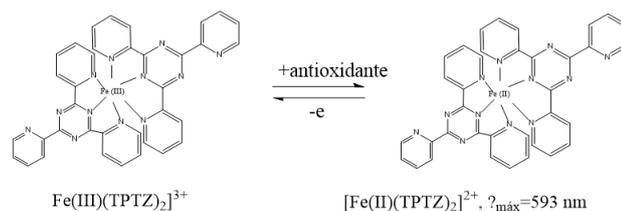


Figura 2: Representación realizada en ChemDraw de la reacción química del método FRAP.

Sin embargo, este método está en desuso ya que se requiere de un patrón cuyo precio es elevado, y además la capacidad reductora medida no es un indicador de la actividad antioxidante global.

2.5.3 Reacción de Emmerie-Engel.

Esta reacción es un método que permite determinar vitamina E mediante dos pasos. En primer lugar, se requiere realizar una saponificación de la muestra y en segundo lugar se requiere usar una cromatografía de extractos purificados. Sin embargo, esta técnica requiere el pretratamiento extenso de la muestra, lo que se traduce en un amplio tiempo de análisis, algo que no es deseable. Además, los productos de esta reacción son complejos inestables [W2].

2.5.4 Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)-Detector espectrofotométrico.

La cromatografía líquida de alta eficacia también es una técnica empleada para la determinación de vitamina E. Para determinar este compuesto se utiliza la opción de cromatografía en fase reversa. La fase reversa va a permitir que el α -tocoferol interaccione con una fase estacionaria de carácter hidrofóbico y una fase móvil que debe de tener un carácter polar (metanol/agua). La fase estacionaria utilizada son partículas de sílice que contienen cadenas C-18 unidas a través de enlaces covalentes. Posteriormente, se determinará la presencia de α -tocoferol mediante el empleo de un detector espectrofotométrico, mientras que la cuantificación se realizará mediante el empleo de

patrones de referencia [11]. Esta técnica permite trabajar en concentraciones del analito comprendidas entre $\mu\text{g/L}$ y mg/L para muestras en estado líquido, y de $\mu\text{g/Kg}$ y $\mu\text{g/g}$ para muestras en estado sólido. El empleo de esta técnica ofrece una buena sensibilidad, especificidad y reproducibilidad, así como permite el análisis simultáneo de varios analitos. Además, la cromatografía líquida de alta resolución es una técnica que requiere poco volumen de muestra.

2.5.5 Sistema de inyección de flujo (FIA) con detección quimioluminiscente.

Este método requiere la utilización de vanadio, ya que cuando este elemento se encuentra reducido en forma de vanadio IV va a intervenir junto con un reactivo quimioluminiscente, el luminol, observándose una reacción de quimioluminiscencia, debido a la formación de un compuesto llamado aminoftalato, el cual estará excitado y emitirá radiación a 425 nm para desactivarse. El luminol es un reactivo quimioluminiscente cuya estructura puede verse en la *figura 3*, que requiere la presencia de un oxidante fuerte para que se produzca su oxidación, que en esta reacción será el peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Además, se suele requerir de un catalizador para aumentar la eficacia de la reacción que tendrá lugar, siendo en este caso el Fe^{2+} el catalizador que se usa. Por último, para que esta reacción se produzca es necesario que el pH se mantenga entre 8 y 11 para lo que se usa un tampón de borato.

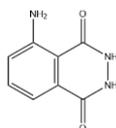


Figura 3: Representación realizada en ChemDraw de la estructura del luminol.

Para la determinación y cuantificación de vitamina E mediante esta técnica, se requiere de SDS (dodecilsulfato sódico) para preparar las muestras, y también como portador de estas a través del sistema [12].

2.6 Elección de una técnica analítica.

De las cinco técnicas analíticas expuestas anteriormente destacan tres por encima del resto, que son la cromatografía de gases, la cromatografía líquida de alta eficacia, y el sistema de inyección de flujo con detección quimioluminiscente. El método FRAP y la reacción de Emmerie-Engel se utilizaban en el pasado, aunque en la actualidad están en desuso. Además, entre la cromatografía de gases y la cromatografía líquida de alta eficacia se prefiere la última, debido a que la cromatografía de gases requiere de un paso previo de

derivatización, que se traduce en unos tiempos de análisis mayores, y no permite el análisis simultáneo, a diferencia de la cromatografía líquida de alta eficacia donde sí es posible.

En este trabajo se llevará a cabo la determinación de vitamina E en muestras de mantequilla y margarina realizando la cuantificación y caracterización de α -tocoferol por fluorescencia. Esta elección, se ha basado en las propiedades luminiscentes, observadas experimentalmente, del tocoferol, el cual es capaz emitir una radiación estable, y dentro del rango de medida del equipo del que se disponía, cuando es sometido a una excitación previa. Algunas de las ventajas que aporta la fluorescencia con respecto al resto de metodologías descritas son la posibilidad de analizar el tocoferol sin derivatización, el reducido tiempo de análisis y la sencillez del mismos. No obstante, como plan de contingencia se barajó el sistema de inyección de flujo con detección quimioluminiscente, mostrándose en la bibliografía [13] el procedimiento y montaje a llevar a cabo.

2.7 Pretratamientos.

El pretratamiento de la muestra es una etapa crítica del proceso, debiendo seleccionarse adecuadamente en función de las propiedades de la muestra. En el caso de nuestro analito, la extracción de la matriz empleando un disolvente adecuado permite separar la vitamina E del resto de sustancias presentes, para lo que se deberá de seleccionar un disolvente orgánico, atendiendo a las características liposolubles de dicha vitamina. Finalmente, es necesario filtrar la disolución en la que se encuentra la vitamina E, para disponer de un medio mucho más limpio y facilitar la medida correspondiente. En la metodología experimental se muestra el pretratamiento llevado a cabo, aunque en el *anexo 1* se muestra un posible pretratamiento alternativo.

3. Objetivos.

Debido al valor nutricional de la vitamina E, y a los numerosos problemas de salud provocados tanto por un exceso como por un defecto de la misma, queda de manifiesto la importancia que tiene llevar un exhaustivo control de esta vitamina en productos alimenticios, de modo que, el objetivo final del presente Trabajo Fin de Grado es cuantificar y evaluar la veracidad de los valores de tocoferol indicados en distintos productos comerciales. En el presente trabajo se han planteado como objetivos específicos:

- determinar el contenido de vitamina E en mantequillas y margarinas, mediante el desarrollo de una metodología de análisis basada en sus propiedades luminiscentes.

Se han considerado dos tipos de muestras diferentes, ya que se ha tomado una mantequilla de cierto prestigio y una margarina de marca blanca.

- realizar un correcto pretratamiento de las muestras y un adecuado uso de los equipos del ultravioleta visible y fluorescencia molecular.

4. Procedimiento experimental.

A continuación, se muestran los equipos, la instrumentación, los reactivos, las muestras, y los métodos operativos necesarios para desarrollar el trabajo experimental.

4.1 Equipos e instrumentación necesaria.

En cuanto al material requerido destaca el siguiente:

- Cubetas de cuarzo y de 1 cm de paso óptico y una capacidad de 4 mL. Se emplearon dos tipos de cubetas diferentes, una que dispone de dos caras esmerilizadas y dos transparentes enfrentadas para la medida de la absorbancia, y otra en la cual las cuatro caras sean transparentes para realizar las correspondientes medidas de fluorescencia.
- Vórtex.
- Filtro de 0,45 μm .
- Baño de ultrasonidos.
- Matraces aforados de 25 mL ($\pm 0,04$) y 10 mL ($\pm 0,040$).
- Tubos Eppendorf de 1,5 mL y tubos de vidrio de tapón roscado.
- Pipetas aforadas de 5 mL ($\pm 0,03$) y pipetas Pasteur.
- Micropipetas de volumen variable de LabMATE de 10-100 μL y Pipet-Life XLS de 100-1000 μL .
- Vasos de precipitados de 100 mL.

La instrumentación empleada para realizar las distintas medidas de absorción y de fluorescencia correspondientes está integrada por un espectrofotómetro y un espectrofluorímetro, los cuales pertenecen a los laboratorios de docencia del Departamento de Química Física Analítica de la Facultad de Química perteneciente a la Universidad de Oviedo y cuyas características se detallan a continuación.

4.1.1 Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS, de Thermo SCIENTIFIC.

El espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS permite obtener datos de la región ultravioleta visible (UV-VIS), disponiendo de una lámpara de arco de xenón de alta intensidad, y de una geometría óptica de doble haz. La lámpara de xenón es un tipo de fuente que proporciona luz entre las regiones del ultravioleta y del infrarrojo cercano.

El uso de la lámpara de arco de xenón y de una óptica de doble haz permite a este equipo disponer de una serie de ventajas. Por un lado, el uso de esta lámpara permite obtener medidas con un amplio rango de aplicación de longitud de onda, comprendido entre 190 y 1100 nm, pudiendo realizar mediciones a una temperatura estable, y sin dañar las muestras, ya que no se exponen a la luz UV de forma prolongada. Además, este equipo permite una fácil adquisición de los datos, pudiendo guardar los mismos en una unidad de memoria USB [14]. El equipo utilizado se muestra en la *figura 4*.



Figura 4: Imagen tomada del Espectrofotómetro GENESYS 10S UV-VIS, de Thermo SCIENTIFIC.

4.1.2 Espectrómetro de luminiscencia LS45 PerkinElmer.

El espectrofotómetro de luminiscencia LS45 PerkinElmer además de realizar medidas de fluorescencia, permite trabajar en otros modos como son: fosforescencia, bioluminiscencia y quimioluminiscencia. Este equipo utiliza una lámpara pulsada de Xenon y presenta ranuras fijas de 10 nm para la excitación y la emisión, ofreciendo distintos modos de registrar los datos. La lámpara pulsada de xenón permite obtener un mínimo fotoblanqueo de las muestras medidas, y una gran estabilidad y precisión de los resultados debido a una larga excitación. Además, entre otras ventajas, esta lámpara ofrece un amplio rango de longitud de onda comprendido entre 200 y 800 nm, y puede ser apagada para medir quimioluminiscencia o bioluminiscencia. Todas las medidas y condiciones experimentales se controlan a través de un software propio, el FL WinLab, que además facilita el acceso y la exportación de datos [W3]. Véase el equipo utilizado en la *figura 5*.



Figura 5: Imagen tomada del Espectrómetro de luminiscencia LS45 PerkinElmer.

4.2 Reactivos necesarios.

Para determinar vitamina E se requieren los siguientes reactivos:

- Patrón de α -tocoferol ((\pm)- α -Tocoferol), $C_{29}H_{50}O_2$ (líquido amarillo y viscoso, $M=430,71$ g/mol, y $d=0,95$ g/cm³). La estructura química del patrón puede visualizarse en la *figura 6*.

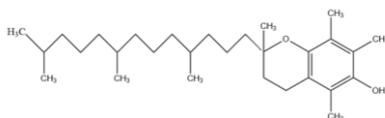


Figura 6: Representación realizada en ChemDraw de la estructura del (\pm)- α -Tocoferol.

- Hexano, C_6H_{14} (líquido incoloro, $M=86,18$ g/mol y $d=0,66$ g/cm³).
- Metanol, CH_4O (líquido incoloro, $M=32,04$ g/mol y $d=0,79$ g/cm³).
- Agua mili Q, H_2O (líquido incoloro, $M=18,015$ y $d=1,00$ g/mL).

4.3 Muestras.

Se determinará el contenido en vitamina E de dos tipos de muestras. Por un lado, se utilizará una mantequilla de una marca consolidada y de prestigio reconocido, seleccionándose en este caso la Mantequilla Central Lechera Asturiana, y por otro lado, se seleccionará una margarina de marca blanca, la Margarina Vitaminada con Sal Diasol.

4.4 Método operativo.

A continuación, se detalla el procedimiento operativo llevado a cabo para realizar las medidas.

4.4.1 Preparación de la disolución de α -tocoferol.

En primer lugar, se prepara una disolución madre de α -tocoferol en hexano de 1412 ppm. Para ello se disuelve el peso exacto de una gota de α -tocoferol en 25 mL de hexano. Se pueden observar los cálculos detallados en lo que se refiere a la preparación de la disolución madre, véase el *anexo 2*.

4.4.2 Espectros de absorción, excitación y emisión del α -tocoferol.

Se procedió a medir la absorbancia y la fluorescencia utilizando una celda de cuarzo de 1 cm de paso óptico:

- Absorbancia en el espectro UV-VIS: Se realiza un barrido entre 250 y 700 nm de 1 en 1 nm, midiendo en primer lugar el blanco (hexano puro) y posteriormente el patrón

preparado. Sin embargo, se observó un espectro con absorbancias demasiado altas debido a que el patrón estaba muy concentrado, por lo que se repitió la medida diluyendo el patrón de 1412 ppm obteniéndose una concentración de 23,53 ppm.

- Fluorescencia: Se diluyó inicialmente el patrón de 1412 ppm hasta una concentración de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$, y posteriormente hasta concentraciones de 3 ppm ($6,97 \cdot 10^{-6} \text{M}$) y de 0,52 ppm ($1,21 \cdot 10^{-6} \text{M}$). Se realizó el espectro de excitación y de emisión de la disolución de 0,52 ppm, ya que las otras dos concentraciones mencionadas mostraban una saturación en el espectro de emisión. Por esta razón, se midió en primer lugar la emisión del blanco de hexano y de este último patrón de 0,52 ppm, fijando una longitud de onda de excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm. Posteriormente, se realiza el espectro de excitación del correspondiente patrón, fijando la longitud de onda máxima de emisión de 328 nm y en un rango entre 250 y 310 nm.

4.4.3 Preparación, medida de fluorescencia y representación de los patrones.

A partir de la disolución madre de α -tocoferol de 1412 ppm ($3,28 \cdot 10^{-3} \text{M}$) se elaboran disoluciones con concentraciones comprendidas entre $4,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$ y $4,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$. Estas nuevas disoluciones fueron utilizadas para la realización de un calibrado. Para la preparación de estas disoluciones fue necesario disponer de 25 mL de una disolución intermedia $8,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$, preparada a partir de la disolución madre, como se puede observar en el *anexo 3*. Una vez cogidos los 0,61 mL de la disolución madre, se enrasan a 25 mL con hexano. Posteriormente, a partir de esta disolución intermedia se preparan los diferentes patrones de 10 mL, enrasando con hexano. Véase la tabla 1, recogida en el *anexo 4* para la preparación de los patrones.

- ✓ Finalmente se midió la fluorescencia de los patrones, realizando los espectros de emisión a la longitud de onda de excitación de 297 nm en el rango entre 310 y 540 nm.

4.4.4 Caracterización analítica del método.

La caracterización analítica se realiza en base al calibrado externo obtenido:

- Linealidad del método: Para hallar la linealidad del método se toma como referencia la concentración más baja de α -tocoferol para la cual se generó el espectro de emisión y la concentración más alta para la cual el fluorímetro fue capaz de generar el espectro de emisión sin ningún inconveniente de saturación.
- Límite de detección: El límite de detección hace referencia a la concentración mínima de un determinado analito que proporciona una señal diferente a la del ruido, y que puede ser detectada por el método analítico. Este límite se define como 3 veces la desviación

estándar de la pendiente del calibrado de los patrones en hexano entre la pendiente. A continuación, haciendo uso de la *ecuación 1* [15] se halla el límite de detección en molaridad.

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot Sb}{\text{pendiente}} \quad (\text{Eq 1})$$

- Límite de cuantificación: el límite de cuantificación hace referencia a la concentración más pequeña que se puede determinar de una forma fiable con el método analítico. Este límite se define como 10 veces la desviación estándar de la pendiente del calibrado de los patrones en hexano entre la pendiente. El límite de cuantificación se puede hallar a través de la *ecuación 2* [15] en términos de molaridad.

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot Sb}{\text{pendiente}} \quad (\text{Eq 2})$$

4.4.5 Pretratamiento de las muestras de margarina y mantequilla.

Como el compuesto de mayor importancia en la vitamina E es el α -tocoferol, se debe de realizar un correcto pretratamiento de la muestra para poder cuantificar únicamente este compuesto, ya que los diferentes tocoferoles y tocotrienoles que componen esta vitamina tendrán diferentes propiedades. Para realizar el pretratamiento de las muestras, estas serán disueltas en hexano para posteriormente ser extraídas con metanol. Inicialmente, se transfieren las correspondientes cantidades pesadas de muestra a un tubo Eppendorf y se añade 1 mL de hexano, para posteriormente agitar y homogeneizar la disolución en vórtex durante 1 minuto. A continuación, se transfiere el contenido del tubo Eppendorf a un tubo de vidrio con tapón roscado, se añaden 4 mL de hexano y se realizan 10 extracciones con 2 mL de metanol cada una. La densidad del hexano es de $0,66 \text{ g/cm}^3$ y la del metanol es de $0,79 \text{ g/cm}^3$, por lo que nos debemos de quedar con la fase superior, aunque también es fácilmente reconocible por la relación de volumen. Por último, se filtra la disolución obtenida a través de un filtro de $0,45 \mu\text{m}$, y finalmente se realiza una dilución 1:10 de la misma, es decir, se coge 1 mL de esta disolución y se lleva a 10 mL con hexano. En la *figura 7*, la cual está contenida en el *anexo 1* se detalla un esquema del proceso. Además, en dicho anexo, se proporciona la alternativa para el pretratamiento de la muestra, la cual consiste en una extracción con acetona [16].

4.4.6 Medida de fluorescencia de las muestras.

Se realizó el pretratamiento de las muestras seleccionadas, pesando en ambos casos 0,25 g de muestra en tubos Eppendorf.

- Finalmente se mide la fluorescencia de las muestras preparadas, realizando los espectros de emisión de las mismas fijando la longitud de onda de 297 nm en el rango entre 310 y 540 nm.

4.4.7 Medida de fluorescencia de las muestras con adiciones y representación de las muestras.

Inicialmente, se realizó el pretratamiento de las muestras y se prepararon unas disoluciones de concentraciones conocidas del patrón, es decir, unos estándares, a partir de los cuales se realizaron las correspondientes adiciones sobre un volumen constante de las muestras. Estas disoluciones se preparan a partir de la disolución intermedia de $8,05 \cdot 10^{-5} M$, como puede observarse en la tabla 2 contenida en el *anexo 5*. Las concentraciones de α -tocoferol en las disoluciones correspondientes después de realizar las adiciones no son iguales en ambos tipos de muestras, ya que las diluciones realizadas son distintas.

- Muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana.

En la *figura 8* se detalla un esquema del procedimiento para realizar las adiciones:

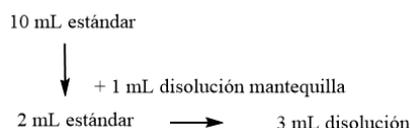


Figura 8: Esquema realizado en ChemDraw de las adiciones a la muestra de mantequilla.

Los valores de las concentraciones del estándar en las disoluciones conteniendo un 25% de muestra, se relacionan en la tabla 3 del *anexo 6*.

- ✓ Se midió la fluorescencia de las distintas disoluciones fortificadas de la muestra de mantequilla, realizando los espectros de emisión de las mismas fijando una longitud de onda de excitación de 297 nm en el rango entre 310 y 540 nm.
- Muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol.

En la *figura 9* se detalla un esquema del procedimiento para realizar las adiciones.

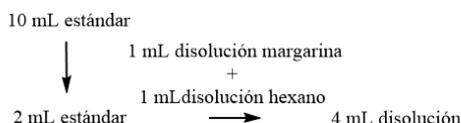


Figura 9: Esquema realizado en ChemDraw de las adiciones a la muestra de margarina.

Los valores de las concentraciones de los estándares empleados para la calibración por adiciones estándar se detallan en la tabla 4 del *anexo 7*.

- Se midieron los espectros de fluorescencia de las distintas adiciones para la muestra de margarina, realizando los espectros de emisión de las mismas en el rango entre 310 y 540 nm fijando una longitud de onda de 297 nm de excitación.

4.4.8 Cálculo del error aleatorio en la concentración de α -tocoferol hallada en las muestras por extrapolación.

Los cálculos realizados se han basado en las expresiones recopiladas del libro Miller and Miller, Estadística y Quimiometría para Química Analítica [17]. El error para ambos tipos de muestra se halla a través del mismo procedimiento.

En primer lugar, se deben de calcular los errores aleatorios en la dirección de y, es decir $S_{y/x}$, a través de la expresión de la *ecuación 3* [17].

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \bar{y})^2}{n-2}} \quad (\text{Eq 3})$$

A continuación, se calcula la desviación estándar del valor extrapolado de x (x_E), es decir S_{x_E} haciendo uso de la *ecuación 4* [17].

$$S_{x_E} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (\text{Eq 4})$$

A partir de estos valores y, teniendo en cuenta las diluciones a las que fueron sometidas las muestras se hallaron los errores aleatorios en la concentración de α -tocoferol en las muestras.

5. Resultados y discusión.

5.1 Preparación de la disolución patrón de α -tocoferol.

Basándonos en la bibliografía y en los procedimientos operatorios descritos [13] se intentó inicialmente disolver el α -tocoferol en metanol, pero resultó no ser totalmente soluble en este alcohol. Posteriormente, se probó a disolver el α -tocoferol en un volumen pequeño (unas pocas gotas) de acetona inicialmente, y luego enrasar con metanol a 25 mL, pero al añadir el metanol vuelve a precipitar el α -tocoferol. Por lo tanto, se probó a diluir el α -tocoferol en etanol y en hexano, y no se observó problemas de solubilidad en ninguno de los dos casos, no persiste ningún residuo sólido, eligiéndose estos dos disolventes para su

empleo en trabajos posteriores. Dado que en la etapa de pretratamiento la disolución final del analito es en hexano, se decidió utilizar hexano como disolvente del patrón de α -tocoferol. La concentración de la disolución patrón obtenida de disolver 1 gota de α -tocoferol en 25 mL de hexano fue de 1412 ppm, o lo que es lo mismo, $3,28 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

5.2 Espectros de absorción, excitación y emisión del α -tocoferol.

- Absorbancia en el espectro UV-VIS: El patrón de 1412 ppm estaba muy concentrado para medir la absorbancia, ya que se observó una saturación en el espectro. Por lo tanto, fue necesario realizar una dilución de este patrón, obteniéndose una concentración de 23,53 ppm ($5,46 \cdot 10^{-5} \text{M}$) como se comentó en el apartado 4.4.2 y cuyos cálculos pueden verse en el *anexo 8*. En la *figura 10*, se muestra el espectro de absorción obtenido para la disolución de 23,53 ppm.

$$A_{\text{máx}} = 1,838 \text{ y } \lambda_{\text{máx}} = 297 \text{ nm.}$$

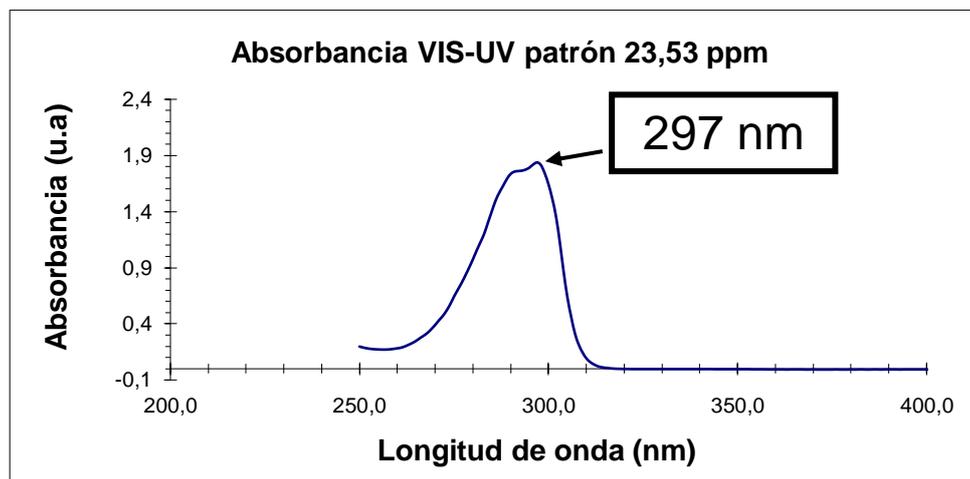


Figura 10: Espectro de absorción para la disolución de 23,53 ppm.

- Fluorescencia: Se realizó una dilución del patrón de 1412 ppm, midiendo en primer lugar una disolución de concentración $3,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$ como ya se explicó en el apartado 4.4.2. Véase el cálculo en el *anexo 9*.
 - ✓ Para ello, se cogen 250 μL de la disolución madre y se enrasan con hexano. Se mide la emisión del blanco de hexano y del patrón de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$, fijando la longitud de onda de excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm. Además, se realiza una disolución más, de forma que medimos otro patrón de 3 ppm aproximadamente. Los espectros realizados se muestran en la *figura 11 del anexo 10*. En ambos casos el espectro estaba saturado, sin posibilidad de modificación instrumental ya que el fluorímetro tiene ranuras fijas.

Por último, se realizó otra dilución cogiendo 1 mL de la disolución de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y enrasando a 25 mL. Por lo tanto, se recalculó la concentración de esta disolución como se muestra en el *anexo 11*, obteniéndose una concentración de 0,52 ppm.

- ✓ Posteriormente se realizó el espectro de emisión de esta última disolución fijando la longitud de onda de excitación a 297 nm y entre 310 y 540 nm. El máximo de emisión se situó a 328 nm, mostrándose una intensidad de 414,77 u.a (unidades arbitrarias de fluorescencia).
- ✓ Se realiza el espectro de excitación del patrón de 0,52 ppm, fijando la longitud de onda máxima de emisión de 328 nm y en un rango entre 250 y 310 nm. El máximo de excitación se obtuvo a una longitud de onda de 293 nm, y se muestra una intensidad de 445,47 u.a (unidades arbitrarias de fluorescencia).

Ambos espectros de emisión y de excitación se recogen en la *figura 12*.

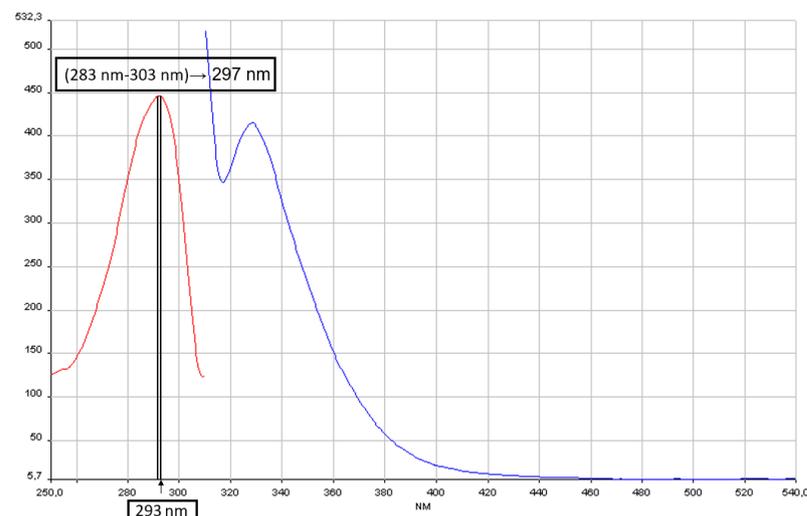


Figura 12: Espectros de excitación seleccionando $\lambda_{\text{máx}}$ emisión a 328 nm entre 250 y 310 nm (curva roja) y espectro de emisión seleccionando $\lambda_{\text{máx}}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm (curva azul), para el patrón de 0,52 ppm en hexano.

El máximo de excitación se obtuvo a 293 nm, aunque el equipo utilizado en este caso presentaba un ancho de banda de 10 nm, por lo que se puede estimar una variación de ± 10 nm en la medida. Por esta razón, se puede deducir que el máximo de excitación se obtiene en el rango entre 283 nm y 303 nm, por lo que se decidió utilizar la longitud de onda de máxima absorción, 297 nm, ya que queda dentro del rango mencionado.

5.3 Medida de fluorescencia y calibración.

- ✓ Fluorescencia de los patrones: Se midió la emisión de los patrones preparados obteniéndose los espectros que se muestran en la *figura 13*:

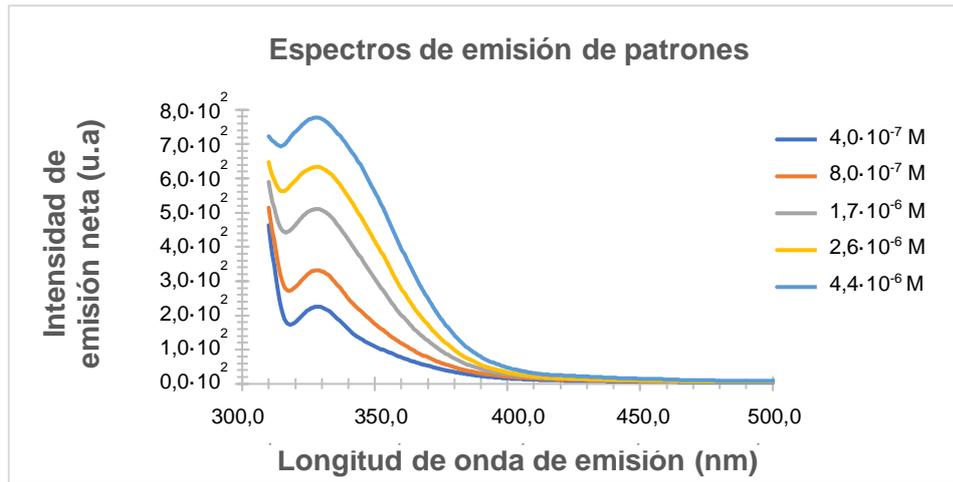


Figura 13: Espectros de emisión de los patrones en hexano seleccionando una $\lambda_{m\acute{a}x}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

Los resultados de los espectros de emisión de los patrones, y del blanco de hexano que se obtuvieron se pueden observar en el *anexo 12*.

A continuación, en la *figura 14* se muestra el calibrado de los patrones comprendidos entre $4,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$ y $4,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, en el cual no se consideró el punto correspondiente al patrón de $4,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$, debido a que se desviaba significativamente del resto de datos. Esto es debido a que a esta concentración más elevada de α -tocoferol se empiezan a observar fenómenos de autoamortiguación y de autoabsorción, debiéndose el primero a colisiones entre las propias moléculas excitadas, mientras que el segundo sucede en aquellas situaciones en las que las bandas de absorción/excitación y de emisión aparecen solapadas (ver *figura 12*). Ambos fenómenos se traducen en una desviación de la intensidad fluorescente significativa, bien sea por la transferencia de energía que se produce en los choques entre moléculas excitadas o por la absorción de la energía de las moléculas excitadas por moléculas presentes en la disolución a medir [18].

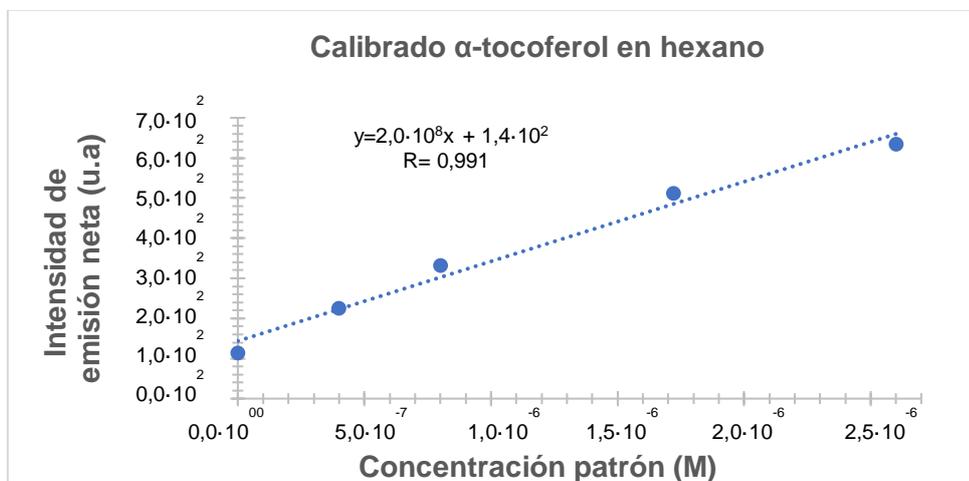


Figura 14: Calibrado del blanco y de los patrones en hexano seleccionando $\lambda_{m\acute{a}x}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

Los parámetros estadísticos correspondientes al calibrado de α -tocoferol en hexano se recogen en la tabla 5, contenida en el *anexo 13*.

5.4 Caracterización analítica del método.

- Linealidad del método: Observando la concentración más baja de α -tocoferol para la cual se generó el espectro de emisión, que fue de $4,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$, y la más alta para la cual se observa un espectro de emisión sin saturación, que fue de $4,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$, se puede concluir que la linealidad del método propuesto abarca el intervalo $4,0 \cdot 10^{-7} \text{M} - 4,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$, es decir, tiene una amplitud de un orden de magnitud.
- Límite de detección: El valor del límite de detección, calculado según la *ecuación 1*, es de $0,3 \cdot 10^{-6} \text{M}$, que expresado en términos de partes por millón (ppm) es de 0,129. Los cálculos correspondientes se detallan en el *anexo 14*.
- Límite de cuantificación: El límite de cuantificación de este método, calculado a través de la *ecuación 2*, es de $1,0 \cdot 10^{-6} \text{M}$, pudiendo expresarse de nuevo como 0,431 ppm. Los cálculos correspondientes a la obtención de este parámetro se muestran en el *anexo 15*.

5.5 Medida de fluorescencia de las muestras.

Una vez realizado el pretratamiento de las muestras se midió la emisión de cada una, obteniéndose los correspondientes espectros en la *figura 15*, en la cual se representa en azul el espectro de la muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana (M.CL.A1) y en naranja el de la muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol (MM.V1).

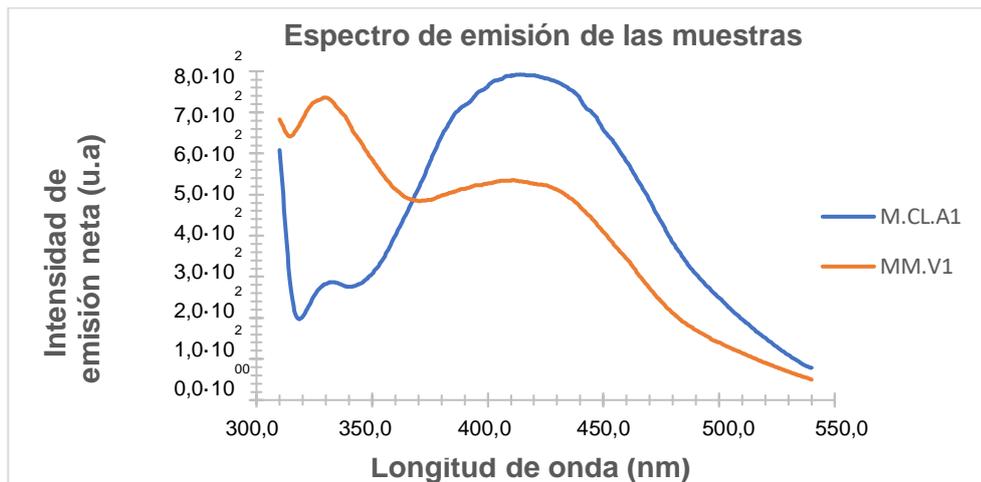


Figura 15: Espectros de emisión de las muestras en hexano seleccionando $\lambda_{m\acute{a}x}$ excitación a 297 nm (M.CL.A1: Mantequilla Central Lechera Asturiana MM.V1: Margarina Vitaminada con Sal Diasol).

- ✓ Las intensidades obtenidas para cada una de las muestras, en la banda correspondiente a la vitamina E son las siguientes.

- Muestra de mantequilla Central Lechera Asturiana (MC.L.A1): $\lambda_{\text{máx}} = 333 \text{ nm}$
 $I = 286,97 \text{ (u.a.)}$.
- Muestra de margarina Vitaminada con Sal (MM.V1): $\lambda_{\text{máx}} = 330 \text{ nm}$
 $I = 736,30 \text{ (u.a.)}$.

En ambos casos se obtienen dos bandas parcialmente superpuestas, una con máximo de emisión a 333 nm, que se corresponde con la del α -tocoferol, y una segunda a mayores longitudes de onda, con máximo de emisión a 425 nm, debida a sustancias de la muestra que se co-extraen junto a la vitamina y que absorben radiación a la longitud de onda de excitación del α -tocoferol. La superposición de las bandas hace que la intensidad medida a la longitud de onda de trabajo para el α -tocoferol (333 nm) sea debida a la contribución de ambas bandas. Por otra parte, también hay que considerar la posible presencia de efectos de matriz, lo que hace necesario la cuantificación del α -tocoferol empleando un calibrado por adiciones estándar, y no a partir del calibrado externo, para así poder evitar ambos efectos sobre la señal propia del α -tocoferol.

5.6 Cuantificación del α -tocoferol en las muestras por adiciones estándar.

➤ Muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana.

Una vez preparados los estándares, y después de fortificar las muestras con ellos, se midió la emisión, obteniéndose los siguientes espectros representados en la *figura 16*.

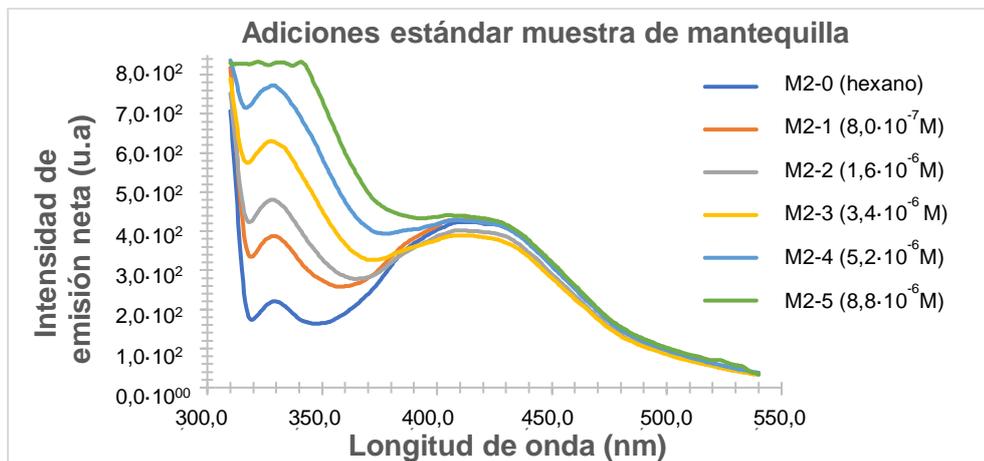


Figura 16: Espectro de emisión de las adiciones estándar a la muestra de mantequilla en hexano seleccionando $\lambda_{\text{máx}}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

- ✓ Los resultados de los espectros de emisión de las adiciones y del blanco, es decir, de la adición de hexano, se muestran en el anexo 16.

La muestra de $8,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$ presenta una concentración demasiado elevada, observándose la saturación del detector en el espectro de emisión, debido al uso de ranuras fijas en el fluorímetro, siendo imposible adecuar el sistema para realizar una medida que

pueda emplearse analíticamente, por lo que no se consideró para realizar la recta de regresión representada en la *figura 17*.

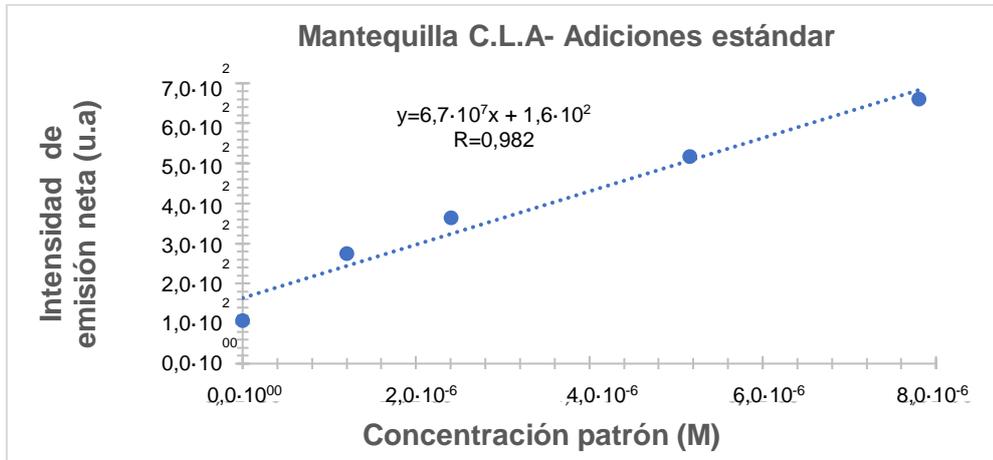


Figura 17 Adiciones estándar de los patrones en la muestra de mantequilla en hexano seleccionando $\lambda_{m\acute{a}x}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

Los parámetros estadísticos correspondientes a las adiciones de los estándares de α -tocoferol sobre la muestra de mantequilla se recogen en la tabla 6 del *anexo 17*. Se puede conocer el contenido en α -tocoferol de la muestra extrapolando a y igual a 0:

$$y=0 \rightarrow 0 = 6,7 \cdot 10^7 x + 1,6 \cdot 10^2 \rightarrow x = \frac{-1,6 \cdot 10^2}{6,7 \cdot 10^7} = 2,39 \cdot 10^{-6} M$$

Considerando las diluciones realizadas a la muestra, se obtiene un valor de α -tocoferol de 60,79 mg por 100 g de mantequilla, como se aprecia en el *anexo 18*.

➤ Muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol.

Para la muestra de margarina, se obtuvieron los espectros de emisión de *la figura 18*.

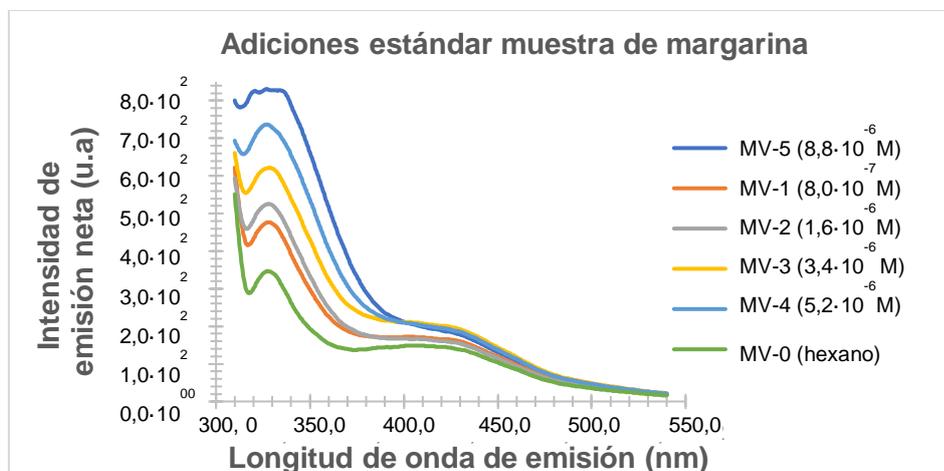


Figura 18: Espectro de emisión de las adiciones estándar a la muestra de margarina en hexano seleccionando $\lambda_{m\acute{a}x}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

- ✓ Los resultados de los espectros de emisión de las adiciones y del blanco, es decir, de la adición de hexano, se observan en el *anexo 19*.

La muestra de $5,2 \cdot 10^{-6}$ M presenta una concentración demasiado elevada, observándose una saturación al realizar el espectro de emisión, por lo que no se consideró para realizar la recta de regresión, la cual se muestra en la *figura 19*.

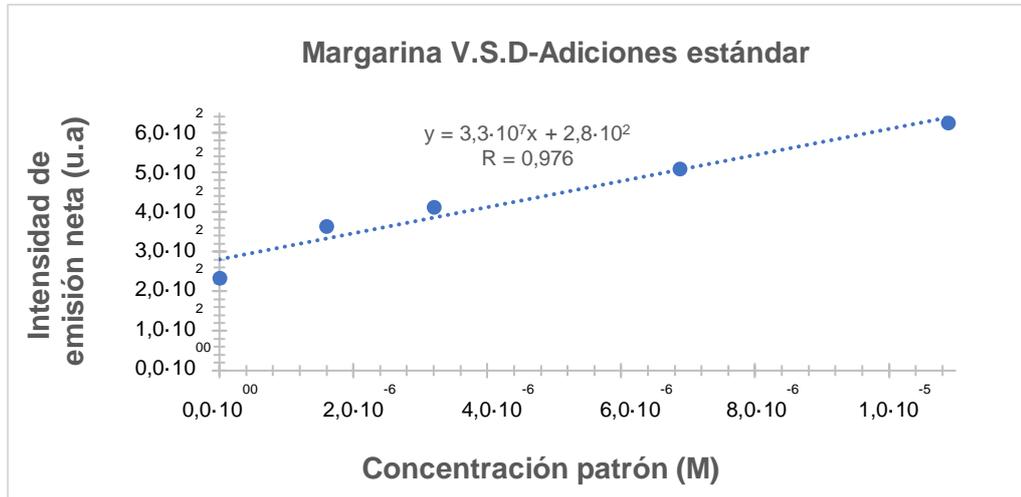


Figura 19: Adiciones estándar de los patrones en la muestra de margarina en hexano seleccionando $\lambda_{máx}$ excitación a 297 nm entre 310 y 540 nm.

Los parámetros estadísticos correspondientes a las adiciones de los estándares de α -tocoferol sobre la muestra de margarina se recogen en la tabla 7 del *anexo 20*. Se puede conocer el contenido en α -tocoferol de la muestra extrapolando a y igual a 0:

$$y=0 \rightarrow 0 = 3,3 \cdot 10^7 x + 2,8 \cdot 10^2 \rightarrow x = \frac{-2,8 \cdot 10^2}{3,3 \cdot 10^7} = 8,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$$

Posteriormente se calcula la concentración de vitamina en la muestra, teniendo en cuenta de nuevo todo el proceso al que fue sometida la misma. Se obtiene un valor de α -tocoferol de 284,43 mg por 100 g de muestra. Los cálculos para obtener estos resultados se muestran en el *anexo 21*.

5.7 Cálculo del error aleatorio en la concentración de α -tocoferol hallada en las muestras por extrapolación.

- Muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana.

En primer lugar, según lo descrito en la sección 4.4.8, se hallaron los errores aleatorios en la dirección de y, es decir $S_{y/x}$, obteniéndose un valor de 45,96. Los cálculos que se han realizado para obtener este valor se recogen en el *anexo 22*. Por último, se

calculó la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$, es decir S_{x_E} , siendo este valor de $6,95 \cdot 10^{-7} M$. Se pueden observar los cálculos realizados en el *anexo 23*. A partir de estos valores y , teniendo en cuenta las diluciones a las que fue sometida la muestra se concluye finalmente que el contenido en α -tocoferol por cada 100 g de la Mantequilla Central Lechera Asturiana es de **61 ± 18 mg**, pudiendo observarse los cálculos realizados en este paso final en el *anexo 24*.

➤ Muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol.

Los cálculos correspondientes para hallar el error cometido en el cálculo de la concentración de vitamina E en la muestra de margarina son exactamente iguales a los realizados para la muestra de mantequilla. En primer lugar, se deben de calcular de nuevo los errores aleatorios en la dirección de y , es decir $S_{y/x}$, hallándose un valor de 36,68. Los cálculos realizados se muestran en el *anexo 25*. A continuación, se calcula la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$, es decir S_{x_E} . El valor obtenido fue de $1,72 \cdot 10^{-6} M$. Los cálculos correspondientes se muestran en el *anexo 26*. De nuevo, teniendo en cuenta las diluciones a las que fue sometida la muestra se concluye finalmente que el contenido en α -tocoferol por cada 100 g de la Margarina Vitaminada con Sal Diasol es de **284 ± 58 mg**, pudiendo observarse los cálculos realizados en este paso final en el *anexo 27*.

5.8 Interferencias de matriz.

A continuación, se muestran las rectas obtenidas en las representaciones del calibrado externo y de las adiciones.

- ✓ Calibrado externo: $y = 2,0 \cdot 10^8 x + 1,4 \cdot 10^2$
- ✓ Adiciones estándar para la muestra de mantequilla: $y = 6,7 \cdot 10^7 x + 1,6 \cdot 10^2$
- ✓ Adiciones estándar para la muestra de margarina: $y = 3,3 \cdot 10^7 x + 2,8 \cdot 10^2$

Se observa claramente que la relación de pendientes no es 1, por lo que queda de manifiesto la presencia de interferencias de matriz, tal como se describió en el apartado 5.6. Los valores obtenidos experimentalmente han sido sometidos a cálculos estadísticos, permitiendo obtener los valores de α -tocoferol (vitamina E) en las muestras de Mantequilla Central Lechera Asturiana y de Margarina Vitaminada con Sal Diasol. Sin embargo, se observan unos valores muy altos de esta vitamina en ambas muestras, ya que en el caso de la Mantequilla Central Lechera Asturiana se obtuvieron 61 ± 18 mg de α -tocoferol por cada 100 gramos de mantequilla, mientras que en el caso de la Margarina Vitaminada con Sal Diasol se obtuvieron 284 ± 58 mg α -tocoferol por cada 100 g de margarina. No se han encontrado valores tabulados sobre el contenido en vitamina E para la Mantequilla Central

Lechera Asturiana, aunque sí que se conoce este valor en la margarina empleada, siendo este de 22 mg por cada 100 g. Esta comparación permite asegurar la presencia de interferencias de matriz.

Además, a la vista de los resultados, se observa que los valores obtenidos son demasiado elevados como para suponer que la señal analítica empleada para la cuantificación depende exclusivamente de la presencia de vitamina E. Es posible que, a la misma, puedan estar contribuyendo otras sustancias liposolubles como el retinol (vitamina A) u otras vitaminas como la D, ya que al ser liposolubles pueden co-extraerse en el proceso de preconcentración. Esta afirmación se refuerza en el espectro de emisión de las muestras de la *figura 15*, en la que se observa la presencia de dos bandas solapadas en ambas muestras, como ya se mencionó, una de ellas correspondiente al α -tocoferol y otra a la presencia de estas sustancias liposolubles. Los valores de estas vitaminas para la Mantequilla Central Lechera Asturiana no están especificados, pero sí para la Margarina Vitaminada con Sal Diasol, cuyos valores son los siguientes:

- Vitamina A: 800 μ g por cada 100 g.
- Vitamina D: 7,5 μ g por cada 100 g.

No obstante, para trabajos futuros podría ser de interés comprobar experimentalmente la presencia de estas vitaminas liposolubles y evaluar en que grado pueden interferir en la medida, de forma que, si la longitud de onda de 297 nm seleccionada como longitud de onda de excitación para la vitamina E se encuentra dentro del espectro de excitación de estas vitaminas, en el proceso de excitación también se excitarían las vitaminas liposolubles. De otra forma, si el valor de la longitud de onda de emisión de 328 nm se encuentra dentro del correspondiente espectro de emisión de estas vitaminas liposolubles, queda de manifiesto que la señal del α -tocoferol sería una suma de la señal correspondiente a la vitamina liposoluble y la del propio α -tocoferol.

6. Conclusiones.

En el presente trabajo se ha comprobado que se puede desarrollar una metodología por fluorescencia para determinar la concentración de vitamina E en muestras de mantequilla y margarina. Además, se ha comprobado experimentalmente que no se puede hacer uso de un calibrado externo, sino que se requiere una metodología de adiciones estándar debido a la presencia de efectos de matriz para este tipo de muestras, es decir, se comprobó que el análisis directo de α -tocoferol no es posible, necesitándose el método de adiciones estándar ya comentado.

A pesar de la necesidad de seguir estudiando los efectos de matriz, se puede asumir la validez de la metodología luminiscente desarrollada, que se ha caracterizado analíticamente, obteniéndose unos valores de linealidad, límite de detección y límite de cuantificación acordes a los niveles esperados de α -tocoferol en las muestras estudiadas. Estos análisis se han podido llevar a cabo en gran parte debido a la selección de un pretratamiento adecuado de la muestra. Por otra parte, se han adquirido los conocimientos y la experiencia adecuada para un correcto empleo de la instrumentación necesaria en dicha metodología, equipos de ultravioleta visible y de fluorescencia, que ha contribuido a una eficaz realización y a poder profundizar en la discusión de los resultados.

7. Bibliografía.

Artículos, revisiones, libros y monografías:

1. Olmedilla Alonso B, Córdoba Chicote C, Deulofeu Piquet R, Granado Lorencio F, Lara Navarro E, Ruiz Budría J. Evaluación del estado nutricional de vitamina E. Rev lab clín [Internet]. 2018 11(1):28–38. Disponible en: <https://digital.csic.es/bitstream/10261/170944/4/RevLabClinaccept.pdf>
2. Febles Fernández C, Soto Febles C, Saldaña Bernabeu A, García Triana BE. Funciones de la vitamina E: Actualización. Rev Cubana Estomatol [Internet]. 2002 Abr; 39(1):28-32. Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-75072002000100005&lng=es
3. Restrepo AM, Cortés RM, Márquez CJ. Uchuvas (*Physalis peruviana* L.) mínimamente procesadas fortificadas con Vitamina E. Vitae [Internet]. 2009;16(1):19-30. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=169815393003>
4. Valenzuela BA, Yáñez CG, Golusda C V. ¿mantequilla o margarina?: Diez años después. Rev. Chil Nutr [Internet]. diciembre 2010;37(4):505–13. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182010000400012>.
5. Jurado Capel L. Estudio del grado de madurez y/o maduración de tomates empleando técnicas espectroscópicas moleculares. Trabajo Fin de Máster. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2012.
6. Mora-Solarte, DA Evaluación del potencial de detección y determinación mediante fluorescencia de excitación–emisión de metabolitos de hidrocarburos aromáticos asociados

a la industria del petróleo. [Internet]. 2020 156. Disponible en: <https://repositorio.unal.edu.co/handle/unal/77793>

7. Ferramola de Sancovich AM, Sancovich H A. Interacciones de las radiaciones electromagnéticas y especies reactivas de oxígeno en la piel. Rev.argent. dermatol. [Internet]. junio de 2006 ; 87(2): 113-120. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2006000200005&lng=es.

8. Garcia-campana A, Baeyens W, Zhang X, Ales F, Gamiz L. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección analítica en sistemas de flujo. Unfamiliar though exciting analytical detection in flowing streams: chemiluminescence. Vol. 42, Ars Pharmaceutica. 2001. p. 81–107. <https://www.ugr.es/~ars/abstract/42-81-01.pdf>

9. Jara Alvarado, DV. “Determinación de tocoferoles y tocotrienoles en cuatro especies de Arecaceae del sur del Ecuador mediante Cromatografía de Gases acoplado a Espectrometría de Masas”. Trabajo Fin de Titulación.UTPL. Loja. 2012. Disponible en: <http://dspace.utpl.edu.ec/handle/123456789/3884>

10. Ghasemzadeh, A., Omidvar, V., Jaafar, H. Z. E. (2012). Polyphenolic content and their antioxidant activity in leaf extract of sweet potato (Ipomoea batatas). Journal of Medicinal Plants Research. 6 (15), 2971-2976.

11. Márquez M, Yépez CE, Sútil-Naranjo R, Rincón M. Aspectos básicos y determinación de las vitaminas antioxidantes E. Invest Clin [Internet]. 2002;43(3):191–204. Disponible en: http://ve.scielo.org/scielo.php?pid=S0535-51332002000300006&script=sci_abstract

12. Collado Torres A. Análisis de vitaminas liposobubles (A, D y E) mediante quimioluminiscencia. Trabajo Fin de Grado. Madrid: Universidad Complutense. 2020. Disponible en : <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/ALVARO%20COLLADO%20TORRES.pdf>

13. Asgher M, Waseem A, Yaqoob M & Nabi A (2011) Flow Injection Chemiluminescence Determination of Retinol and α -Tocopherol in Blood Serum and Pharmaceuticals, Analytical Letters, 44:1-3, 12-24, DOI: 10.1080/00032719.2010.500757

14. Rendimiento A, Asequible P. Espectrofotómetros UV-Visible Thermo Scientific Serie GENESYS 10S [Internet]. Tecnofrom.com. Disponible en: https://www.tecnofrom.com/moduloProductos/noti_23/file.pdf

15. Shrivastava A, Gupta V. Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chron Young Sci [Internet]. 2011;2(1): 21. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.4103/2229-5186.79345>

16. Vilaso Martínez M. Desarrollo de Métodos Analíticos para la Valoración Nutricional del Cangrejo de las Nieves, Chionoecetes Opilio. Trabajo Fin de Grado. Santiago de Compostela: Universidad Santiago de Compostela. 2008. Disponible en: https://minerva.usc.es/xmlui/bitstream/handle/10347/2452/9788498870749_content.pdf?sequence=1

17. Miller JN, Miller JC. Estadística y Quimiometría Para Química Analítica. Pearson Educación; 2005.

18. García Suárez, A. Determinación de rendimientos cuánticos de fluorescencia por métodos indirectos. Trabajo Fin de Máster. Oviedo: Universidad de Oviedo; 2015. Disponible en: <http://hdl.handle.net/10651/32363>

Páginas web:

W1. Mantequillas y margarinas con más vitamina E [Internet]. Alimentos. 2009 [citado el 7 de diciembre de 2022]. Disponible en: <https://alimentos.org.es/mantequillas-y-margarinas-con-mas-vitamina-e>

W2. Schüep W. Análisis de vitaminas en alimentos. Producción y manejo de datos de composición química de alimentos en nutrición [Internet]. 1997 [citado el 19 de noviembre de 2022]. Disponible en: <https://www.fao.org/3/ah833s/AH833S19.htm>

W3. Espectrómetro de fluorescencia PerkinElmer LS45 [Internet]. Hospitalsstore.com. [citado el 4 de abril de 2023]. Disponible en: <https://www.hospitalsstore.com/fluorescence-ls45-spectrometer/>

8. Anexos.

Anexo 1: Esquema del pretratamiento de la muestra.

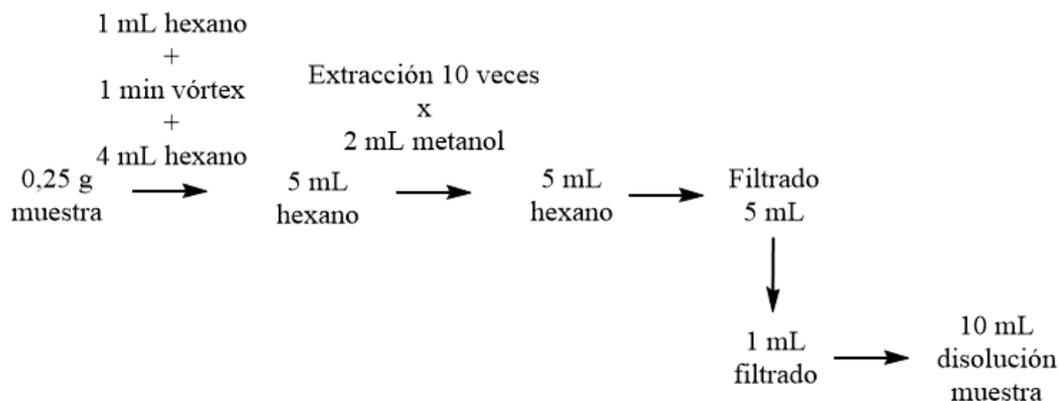


Figura 7: Esquema realizado en ChemDraw del pretratamiento de la muestra.

Existe la posibilidad de realizar otro pretratamiento de muestra para extraer la vitamina E del resto de la matriz de las muestras. Por lo tanto, otra alternativa posible sería:

➤ Extracción con acetona.

En la extracción con acetona las muestras se pondrán en contacto con dicho disolvente, agitando en vortex para facilitar la disolución de las mismas. Los extractos de acetona obtenidos son transferidos a un volumen determinado para ser posteriormente filtrados a través de un filtro de 0,5 μm . Por último, se recoge el filtrado para evaporarlo en el rotavapor a 35 $^{\circ}\text{C}$. Finalmente, se utiliza una mezcla de disolventes de etanol, hexano y diclorometano en proporciones 50:25:25 para disolver de nuevo el sólido obtenido [16].

Anexo 2: Preparación de la disolución madre de α -tocoferol en hexano.

$$\frac{35,3\text{mg}\alpha\text{-tocoferol}}{0,025\text{L disolución}} = 1412 \text{ ppm}$$

$$1412 \text{ ppm} = 1412 \frac{\text{mg}}{\text{L}} \frac{1\text{g}\alpha\text{-tocoferol}}{1000\text{mg}\alpha\text{-tocoferol}} \frac{1\text{mol}\alpha\text{-tocoferol}}{430,71\text{g}\alpha\text{-tocoferol}} = 3,278 \cdot 10^{-3}\text{M} = 3,28 \cdot 10^{-3}\text{M}$$

Anexo 3: Cálculo del volumen necesario de la disolución madre de α -tocoferol para preparar una disolución intermedia de $8,0 \cdot 10^{-5}\text{M}$.

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 3,28 \cdot 10^{-3}\text{M} \cdot V_1 = 8,0 \cdot 10^{-5}\text{M} \cdot 25 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 0,61 \text{ mL} = 610 \mu\text{L}$$

Anexo 4: Preparación de los patrones del calibrado externo.

A continuación, en la *tabla 1* se detallan los cálculos para preparar todos los patrones a partir de una disolución intermedia de α -tocoferol. Por ejemplo, para preparar el patrón de $4,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$:

$$\checkmark \quad 4,4 \cdot 10^{-6} \text{M} \quad C_1 V_1 = C_2 V_2 \rightarrow 8,0 \cdot 10^{-5} \text{M} \cdot V_1 = 4,4 \cdot 10^{-6} \text{M} \cdot 10 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 0,55 \text{ mL} = 550 \mu\text{L}$$

Tabla 1: Preparación de los patrones del calibrado externo entre $4,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$ y $4,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

C.patrn (M)	V. Disolución intermedia (μL)
$4,0 \cdot 10^{-7}$	550
$8,0 \cdot 10^{-7}$	325
$1,7 \cdot 10^{-6}$	212,5
$2,6 \cdot 10^{-6}$	100
$4,4 \cdot 10^{-6}$	50

Anexo 5: Preparación de los estándares entre $8,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$ y $8,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

Esta nueva serie de estándares se prepara realizando los mismos cálculos que en la anterior, como se mostró en la tabla 1 del *anexo 4*.

Tabla 2: Preparación de los estándares entre $8,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$ y $8,8 \cdot 10^{-6} \text{M}$.

C.estándar (M)	V. disolución intermedia (μL)
$8,0 \cdot 10^{-7}$	100
$1,6 \cdot 10^{-6}$	200
$3,4 \cdot 10^{-6}$	420
$5,2 \cdot 10^{-6}$	650
$8,8 \cdot 10^{-6}$	1100

Anexo 6: Cálculo de las concentraciones de los estándares para las adiciones estándar sobre la muestra de mantequilla.

La concentración de todos los estándares en la celda de cuarzo se refleja en la *tabla 3*, y se calcula de la misma forma. Por ejemplo, para el patrón de $8,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$:

$$8,0 \cdot 10^{-7} \text{M} \frac{3 \text{mL disolución}}{2 \text{mL disolución patrón}} = 1,2 \cdot 10^{-6} \text{M}$$

Tabla 3: Concentraciones de los estándares para las adiciones estándar sobre la muestra de mantequilla.

Concentración estándar utilizada (M)	Concentración estándar en la celda de cuarzo (M)
$8,0 \cdot 10^{-7}$	$1,2 \cdot 10^{-6}$
$1,6 \cdot 10^{-6}$	$2,4 \cdot 10^{-6}$
$3,4 \cdot 10^{-6}$	$5,2 \cdot 10^{-6}$
$5,2 \cdot 10^{-6}$	$7,8 \cdot 10^{-6}$
$8,8 \cdot 10^{-6}$	$1,32 \cdot 10^{-5}$

Anexo 7: Cálculo de las concentraciones de los estándares para las adiciones estándar sobre la muestra de margarina.

La concentración de vitamina E en las distintas adiciones se calcula a partir del volumen final empleado en la celda de cuarzo. Los valores se recogen en la *tabla 4*, y se calculan todos de la misma forma. Por ejemplo, para el patrón de $8,0 \cdot 10^{-7} \text{M}$:

$$8,0 \cdot 10^{-7} \text{M} \frac{4 \text{mL disolución}}{2 \text{mL disolución patrón}} = 1,6 \cdot 10^{-6} \text{M}$$

Tabla 4: Concentraciones de los estándares para las adiciones estándar sobre la muestra de margarina.

Concentración estándar utilizada (M)	Concentración estándar en la celda de cuarzo (M)
$8,0 \cdot 10^{-7}$	$1,6 \cdot 10^{-6}$
$1,6 \cdot 10^{-6}$	$3,2 \cdot 10^{-6}$
$3,4 \cdot 10^{-6}$	$6,9 \cdot 10^{-6}$
$5,2 \cdot 10^{-6}$	$1,0 \cdot 10^{-5}$
$8,8 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$

Anexo 8: Cálculo de la concentración de la disolución de α -tocoferol para medir la absorbancia en el VIS-UV.

Se preparó una disolución de medida en la celda de cuarzo, diluyendo 500 μL del patrón de α -tocoferol de 1412 ppm en 2,5 mL de hexano.

$$500 \mu\text{L} = 0,5 \text{ mL} \rightarrow 5,0 \cdot 10^{-4} \text{ L} \frac{1412 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ L disolución}} = 0,706 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

$$\frac{0,706 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,003 \text{ L}} = 23,53 \text{ ppm}$$

Anexo 9: Cálculo del volumen necesario de la disolución madre de α -tocoferol para preparar una disolución de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$.

$$1412 \text{ ppm} = 3,28 \cdot 10^{-3} \text{ M}$$

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot V_2 \rightarrow 3,0 \cdot 10^{-3} \text{ M} \cdot V_1 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M} \cdot 25 \text{ mL} \rightarrow V_1 = 0,25 \text{ mL} = 250 \mu\text{L}$$

Anexo 10: Espectros de emisión de un blanco de hexano y de los patrones de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ y de 3 ppm.

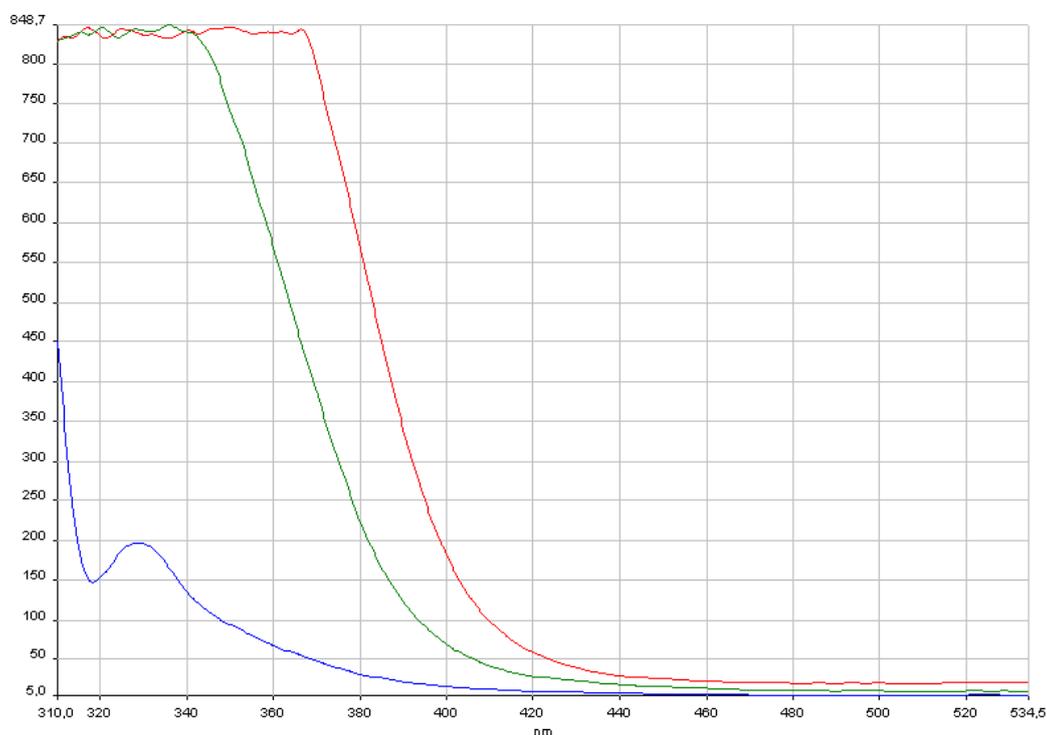


Figura 11: Espectros de emisión para un blanco de hexano (curva azul) y de un patrón de $3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ (curva roja), y de 3 ppm (curva verde) en las condiciones óptimas.

Anexo 11: Cálculo de la concentración en ppm de la disolución de α -tocoferol que se caracterizó por fluorescencia.

$$1 \text{ mL disolución } 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M} \frac{1 \text{ L disolución } 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}}{1000 \text{ mL disolución } 3 \cdot 10^{-5} \text{ M}} \frac{3,0 \cdot 10^{-5} \text{ moles } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ L disolución } 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ M}}$$

$$\frac{430,71 \text{ g } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ mol } \alpha\text{-tocoferol}} \frac{1000 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ g } \alpha\text{-tocoferol}} = 0,013 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

$$\frac{0,013 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,025 \text{ L disolución}} = 0,52 \text{ ppm.}$$

Anexo 12: Resultados de los espectros de emisión de los patrones y del blanco en el calibrado externo.

- $4,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$: $\lambda_{\text{em}} = 329 \text{ nm}$ $I = 225,23 \text{ (u.a)}$
- $8,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$: $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ $I = 331,68 \text{ (u.a)}$
- $1,7 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ $I = 510,41 \text{ (u.a)}$
- $2,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ $I = 633,51 \text{ (u.a)}$
- $4,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ $I = 777,80 \text{ (u.a)}$
- Hexano: $\lambda_{\text{em}} = 328 \text{ nm}$ $I = 112,77 \text{ (u.a)}$

Anexo 13: Parámetros estadísticos del calibrado en hexano.

En la *tabla 5* se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a través del calibrado en hexano.

Tabla 5: Parámetros estadísticos del calibrado en hexano.

Valor de la pendiente	$(2,0 \pm 0,2) \cdot 10^8$	Valor de la o. origen	$(1,4 \pm 0,2) \cdot 10^2$
R	0,991	Error típico	$3,2 \cdot 10^1$
F (coeficiente de varianzas)	$1,7 \cdot 10^2$	Grados de libertad	3
Suma de cuadrados de regresión	$1,7 \cdot 10^5$	Suma de cuadrados residuales	$3,1 \cdot 10^3$

Anexo 14: Cálculo del LOD y su conversión a ppm.

Para hallar el límite de detección se deben de utilizar los datos de la pendiente de la recta de calibrado de los patrones en hexano, y de su desviación estándar, los cuales se recogen en la *tabla 5* del *anexo 13*. Finalmente, estos datos serán aplicados a la *ecuación 1* [15].

$$\text{LOD} = \frac{3 \cdot S_b}{\text{pendiente}} = \frac{3 \cdot (0,2 \cdot 10^8)}{2,0 \cdot 10^8} = 0,3 \cdot 10^{-6} \text{M} \approx 0,129 \text{ ppm}$$

Anexo 15: Cálculo del LOQ y su conversión a ppm.

Para hallar el límite de cuantificación se requiere de los mismos datos que en el caso del límite de detección, es decir, se requiere conocer la pendiente y la desviación estándar asociada a la misma para el calibrado en hexano, cuyos valores se recogen en la *tabla 5* del *anexo 13*. Sin embargo, en este caso se hará uso de la *ecuación 2* [15].

$$\text{LOQ} = \frac{10 \cdot S_b}{\text{pendiente}} = \frac{10 \cdot (0,2 \cdot 10^8)}{2,0 \cdot 10^8} = 1,0 \cdot 10^{-6} \text{M} \approx 0,431 \text{ ppm}$$

Anexo 16: Resultados de los espectros de emisión de las adiciones estándar a la muestra de mantequilla.

- 1 mL Mantequilla + 2 mL Hexano: $\lambda_{em}=330$ nm $I=220,30$ (u.a)
- 1 mL Mantequilla+2 mL $8,0 \cdot 10^{-7}M$: $\lambda_{em}=330$ nm $I=386,92$ (u.a)
- 1 mL Mantequilla+ 2mL $1,6 \cdot 10^{-6}M$: $\lambda_{em}=330$ nm $I=476,70$ (u.a)
- 1 mL Mantequilla+ 2 mL $3,4 \cdot 10^{-6}M$: $\lambda_{em}=330$ nm $I=629,80$ (u.a)
- 1 mL Mantequilla+ 2 mL $5,2 \cdot 10^{-6}M$: $\lambda_{em}=330$ nm $I=722,68$ (u.a)
- 1 mL Mantequilla+ 2 mL $8,8 \cdot 10^{-6}M$: $\lambda_{em}=330$ nm $I=828,71$ (u.a) (satura)

Anexo 17: Parámetros estadísticos de las adiciones estándar y de la muestra de mantequilla.

En la *tabla 6* se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a través de las adiciones estándar a la muestra de mantequilla.

Tabla 6: Parámetros estadísticos obtenidos de las adiciones estándar a la muestra de mantequilla.

Valor de la pendiente	$(6,7 \pm 0,7) \cdot 10^7$	Valor de la o. origen	$(1,6 \pm 0,3) \cdot 10^2$
R	0,982	Error típico	$4,6 \cdot 10^1$
F (coeficiente de varianzas)	$8,3 \cdot 10^1$	Grados de libertad	3
Suma de cuadrados de regresión	$1,8 \cdot 10^5$	Suma de cuadrados residuales	$6,4 \cdot 10^3$

Anexo 18: Cálculo de la concentración de vitamina E por cada 100 g de mantequilla.

$$y=0 \rightarrow 0 = 6,7 \cdot 10^7 x + 1,6 \cdot 10^2 \rightarrow x = \frac{-1,6 \cdot 10^2}{6,7 \cdot 10^7} = 2,39 \cdot 10^{-6} M$$

$$2,39 \cdot 10^{-6} M \frac{3mLdisolución}{1mLdisolución} \frac{10mLhexano}{1mLhexano} \frac{5mLhexano}{1mLhexano} = 3,59 \cdot 10^{-4} M \text{ en 1 mL hexano}$$

$$1 \text{ mL hexano} \frac{3,59 \cdot 10^{-4} \text{ moles } \alpha\text{-tocoferol}}{1000 \text{ mL hexano}} \frac{430,71 \text{ g } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ mol } \alpha\text{-tocoferol}} \frac{1000 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{ g } \alpha\text{-tocoferol}} = 0,1546 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

Por lo tanto:

$$0,2543 \text{ g mantequilla} \rightarrow 0,1546 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

$$100 \text{ g mantequilla} \rightarrow x$$

$$x = \frac{100 \text{ g mantequilla} \cdot 0,1546 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,2543 \text{ g mantequilla}} = \frac{60,79 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{100 \text{ g mantequilla}}$$

Anexo 19: Resultados de los espectros de emisión de las adiciones estándar a la muestra de margarina.

- 1 mL Margarina + 3 mL Hexano: $\lambda_{em}=328 \text{ nm}$ $I= 346,37 \text{ (u.a)}$
- 1 mL Margarina + 1 mL Hexano + 2 mL $8,0 \cdot 10^{-7} \text{ M}$: $\lambda_{em}=328 \text{ nm}$ $I=477,02 \text{ (u.a)}$
- 1 mL Margarina + 1 mL Hexano + 2 mL $1,6 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{em}= 328 \text{ nm}$ $I=525,23 \text{ (u.a)}$
- 1 mL Margarina + 1 mL Hexano + 2 mL $3,4 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{em}= 328 \text{ nm}$ $I=621,42 \text{ (u.a)}$
- 1 mL Margarina + 1 mL Hexano + 2 mL $5,2 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{em}= 327 \text{ nm}$ $I=736,77 \text{ (u.a)}$
- 1 mL Margarina + 1 mL Hexano + 2 mL $8,8 \cdot 10^{-6} \text{ M}$: $\lambda_{em}= 328 \text{ nm}$ $I=829,05 \text{ (u.a)}$

Anexo 20: Parámetros estadísticos de las adiciones estándar y de la muestra de margarina.

En la *tabla 7* se recogen los parámetros estadísticos obtenidos a través de las adiciones estándar a la muestra de margarina.

Tabla 7: Parámetros estadísticos obtenidos de las adiciones estándar a la muestra de margarina.

Valor de la pendiente	$(3,3 \pm 0,4) \cdot 10^7$	Valor de la o. origen	$(2,8 \pm 0,3) \cdot 10^2$
R	0,976	Error típico	$3,7 \cdot 10^1$
F (coeficiente de varianzas)	$6,1 \cdot 10^1$	Grados de libertad	3
Suma de cuadrados de regresión	$8,3 \cdot 10^4$	Suma de cuadrados residuales	$4,1 \cdot 10^3$

Anexo 21: Cálculo de la concentración de vitamina E por cada 100 g de margarina.

$$y=0 \rightarrow 0 = 3,3 \cdot 10^7 x + 2,8 \cdot 10^2 \rightarrow x = \frac{-2,8 \cdot 10^2}{3,3 \cdot 10^7} = 8,4 \cdot 10^{-6} \text{M}$$

$$8,4 \cdot 10^{-6} \text{M} \frac{4 \text{mL hexano}}{1 \text{mL disolución}} \frac{10 \text{mL hexano}}{1 \text{mL hexano}} \frac{5 \text{mL hexano}}{1 \text{mL hexano}} = 1,68 \cdot 10^{-3} \text{M en 1 mL de hexano}$$

$$1 \text{ mL hexano} \frac{1,68 \cdot 10^{-3} \text{ moles } \alpha\text{-tocoferol}}{1000 \text{mL hexano}} \frac{430,71 \text{g } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{mol } \alpha\text{-tocoferol}} \frac{1000 \text{mg } \alpha\text{-tocoferol}}{1 \text{g } \alpha\text{-tocoferol}} = 0,7236 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

Por lo tanto:

$$0,2544 \text{g margarina} \rightarrow 0,7236 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}$$

$$100 \text{ g margarina} \rightarrow x$$

$$x = \frac{100 \text{g margarina} \cdot 0,7236 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,2544 \text{g margarina}} = \frac{284,43 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{100 \text{g margarina}}$$

Anexo 22: Cálculo del error aleatorio en la dirección y para la muestra de mantequilla.

Para hallar el error aleatorio en la dirección y se hará uso de la *ecuación 3* [17]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

- $\hat{y}_i \rightarrow$ puntos sobre la recta de regresión correspondientes a los valores individuales de x.
- $y = 6,7 \cdot 10^7 x + 1,6 \cdot 10^2$.

A continuación, en la *tabla 8* se recogen los datos necesarios para hallar $S_{y/x}$.

Tabla 8: Cálculos para hallar $S_{y/x}$ en la muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana a partir de la ecuación 3.

x_i	y_i	\hat{y}_i	$(y_i - \hat{y}_i)$
0	$1,08 \cdot 10^2$	$1,60 \cdot 10^2$	-52
$1,20 \cdot 10^{-6}$	$2,74 \cdot 10^2$	$2,404 \cdot 10^2$	33,6
$2,40 \cdot 10^{-6}$	$3,64 \cdot 10^2$	$3,208 \cdot 10^2$	43,2
$5,16 \cdot 10^{-6}$	$5,17 \cdot 10^2$	$5,0572 \cdot 10^2$	11,28
$7,80 \cdot 10^{-6}$	$6,60 \cdot 10^2$	$6,826 \cdot 10^2$	-22,6

- $S_{y/x} = 45,96084711 \approx 45,96$.

Anexo 23: Cálculo de la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$ para la muestra de mantequilla.

Para hallar la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$ se aplica la *ecuación 4* [17]:

$$S_{x_E} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Pendiente(b) = $6,7 \cdot 10^7$.
- $\bar{y} = 3,85 \cdot 10^2$.
- $\bar{x} = 3,31 \cdot 10^{-6}$.

En la *tabla 9* se recogen los datos necesarios para hallar S_{x_E} .

Tabla 9: Cálculos para hallar S_{XE} en la muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana a partir de la ecuación 4.

$x_i - \bar{x}$
$-3,31 \cdot 10^{-6}$
$-2,11 \cdot 10^{-6}$
$-9,1 \cdot 10^{-7}$
$-1,85 \cdot 10^{-6}$
$-4,49 \cdot 10^{-6}$

- $S_{XE} = 6,9537 \cdot 10^{-7} M \approx 6,95 \cdot 10^{-7} M$.

Anexo 24: Cálculo del error cometido en la determinación del contenido de vitamina E en la muestra de mantequilla.

Se parte de la desviación estándar del valor extrapolado, y se deshacen las diluciones a las que fue sometida la muestra, del mismo modo realizado en el *anexo 18*.

$6,95 \cdot 10^{-7} M \rightarrow 1,04 \cdot 10^{-4} M$ en 1 mL hexano $\rightarrow 0,0448$ mg α -tocoferol en 0,2543 g mantequilla.

A continuación, realizando una regla de 3 se conoce el error cometido por cada 100 gramos de mantequilla.

0,2543 g mantequilla \rightarrow 0,0448 mg α -tocoferol

100 g mantequilla \rightarrow x

$$x = \frac{100 \text{ g mantequilla} \cdot 0,0448 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,2543 \text{ g mantequilla}} = \frac{17,62 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{100 \text{ g mantequilla}}$$

Por lo tanto, se concluye que el contenido en vitamina E de la muestra de Mantequilla Central Lechera Asturiana es de **61±18 mg por cada 100 g de mantequilla**.

Anexo 25: Cálculo del error aleatorio en la dirección y para la muestra de margarina.

De nuevo, el error aleatorio en la dirección y se hallará con la *ecuación 3* [17]:

$$S_{y/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2}{n-2}}$$

- $\hat{y}_i \rightarrow$ puntos sobre la recta de regresión correspondientes a los valores individuales de x.
- $y = 3,3 \cdot 10^7 x + 2,8 \cdot 10^2$.

A continuación, en la *tabla 10* se recogen los datos necesarios para hallar $S_{y/x}$

Tabla 10: Cálculos para hallar $S_{y/x}$ en la muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol a partir de la ecuación 3.

x_i	y_i	\hat{y}_i	$(y_i - \hat{y}_i)$
0	$2,34 \cdot 10^2$	$2,80 \cdot 10^2$	-46
$1,60 \cdot 10^{-6}$	$3,64 \cdot 10^2$	$3,328 \cdot 10^2$	31,2
$3,20 \cdot 10^{-6}$	$4,12 \cdot 10^2$	$3,856 \cdot 10^2$	26,4
$6,88 \cdot 10^{-6}$	$5,09 \cdot 10^2$	$5,0704 \cdot 10^2$	1,96
$1,09 \cdot 10^{-5}$	$6,24 \cdot 10^2$	$6,397 \cdot 10^2$	-15,7

- $S_{y/x} = 36,68211008 \approx 36,68$.

Anexo 26: Cálculo de la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$ para la muestra de margarina.

Para hallar la desviación estándar del valor extrapolado de $x(x_E)$ se aplica la *ecuación 4* [17]:

$$S_{x_E} = \frac{S_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum_i (x_i - \bar{x})^2}}$$

- Pendiente(b) = $3,3 \cdot 10^7$.
- $\bar{y} = 4,29 \cdot 10^2$.
- $\bar{x} = 4,51 \cdot 10^{-6}$.

En la *tabla 11* se recogen los datos necesarios para hallar S_{x_E} .

Tabla 11: Cálculos para hallar S_{XE} en la muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol a partir de la ecuación 4.

$x_i - \bar{x}$
$-4,51 \cdot 10^{-6}$
$-2,91 \cdot 10^{-6}$
$-1,31 \cdot 10^{-7}$
$-2,37 \cdot 10^{-6}$
$6,39 \cdot 10^{-6}$

- $S_{XE} = 1,721 \cdot 10^{-6} M \approx 1,72 \cdot 10^{-6} M$.

Anexo 27: Cálculo del error cometido en la determinación del contenido de vitamina E en la muestra de margarina.

Una vez hallado el valor de la desviación estándar del valor extrapolado se procede a deshacer las diluciones a las que fue sometida la muestra, siguiendo el mismo procedimiento que en el *anexo 21*.

$1,72 \cdot 10^{-6} M \rightarrow 3,44 \cdot 10^{-4} M$ en 1 mL hexano \rightarrow 0,148 mg α -tocoferol en 0,2544 g margarina.

Realizando una regla de 3 se halla el error cometido por cada 100 g de margarina.

0,2544 g margarina \rightarrow 0,148 mg α -tocoferol

100 g margarina \rightarrow x

$$x = \frac{100 \text{ g margarina} \cdot 0,148 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{0,2544 \text{ g margarina}} = \frac{58,18 \text{ mg } \alpha\text{-tocoferol}}{100 \text{ g mantequilla}}$$

Finalmente, se concluye que el contenido en vitamina E de la muestra de Margarina Vitaminada con Sal Diasol es de **284±58 mg por cada 100 g de margarina**.