



Universidad de Oviedo
Universidá d'Uviéu
University of Oviedo

MÁSTER EN CIENCIAS ANALÍTICAS Y BIOANALÍTICAS

Trabajo Fin de Máster

**Determinación simultánea de complementos
nutricionales mediante espectroscopía de
fluorescencia y calibración multivariada (PLS)**

Irene Correa Comesaña

Oviedo, Julio 2024

ÍNDICE

1.ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS	1
2.RESUMEN/ABSTRACT	2
2.1. Resumen.....	2
2.2. Abstract.....	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1. Complementos alimenticios	3
3.2. Vitaminas	4
3.2.1. <i>Tiamina (B₁)</i>	5
3.2.2. <i>Riboflavina (B₂)</i>	5
3.3. Antioxidantes: quercetina	6
3.4. Determinación de vitaminas B.....	7
3.5. Determinación de quercetina	8
3.6. Concepto de fluorescencia molecular.....	9
3.6.1. <i>Tipos de espectrometría de fluorescencia</i>	10
3.6.1.1. Espectrometría de fluorescencia convencional.....	10
3.6.1.2. Espectrometría de fluorescencia sincrónica	10
3.6.1.3. Espectrometría de fluorescencia de emisión excitación de matriz	11
3.7. Espectrometría de fluorescencia aplicada al análisis de mezclas.....	12
3.8. Calibración multivariante	12
3.8.1. <i>Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)</i>	13
4. OBJETIVO	14
5.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	14
5.1. Instrumentación.....	14
5.2. Materiales, reactivos y disoluciones	15
5.3. Espectrofotométrica ultravioleta-visible	15
5.4. Espectrofotométrica de fluorescencia.....	16
5.4.1. <i>Fluorescencia e influencia del pH</i>	16
5.4.2 <i>Rectas de calibrado por fluorescencia: riboflavina y quercetina</i>	16
5.4.3. <i>Fluorescencia sincrónica</i>	17
5.5. Estudio de diferentes mezclas de riboflavina y quercetina	17

5.6. Aplicabilidad del método a muestras reales	17
5.7. Programas empleados	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	18
6.1. Estudios preliminares	18
6.1.1. <i>Caracterización espectrofotométrica ultravioleta-visible</i>	18
6.1.1.1. Vitaminas B.....	18
6.1.1.2. Quercetina	21
6.1.2 <i>Caracterización óptica mediante fluorescencia</i>	23
6.1.2.1. Fluorescencia convencional.....	23
6.1.2.2. Estudio de la influencia del pH.....	25
6.1.2.3. Características analíticas de la metodología	28
6.1.2.4. Estudio de la polaridad del disolvente en la señal de fluorescencia del antioxidante quercetina	29
6.1.2. 5.. Fluorescencia sincrónica.....	30
6.2. Estudio de mezclas de riboflavina y quercetina: Caracterización espectroscópica y tratamiento de datos mediante calibración multivariante	32
6.2.1. <i>Caracterización de mezclas: Fluorescencia convencional</i>	32
6.2.2. <i>Calibración multivariante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS)</i>	35
6.2.3. <i>Caracterización de mezclas mediante fluorescencia sincrónica y calibración multivariante PLS</i>	38
6.2.4. <i>Caracterización de mezclas mediante absorbancia y calibración multivariante por PLS</i>	40
6.3. Aplicabilidad del método a muestras reales:.....	43
6.3.1. Calibración multivariante mediante PLS	44
7. CONCLUSIONES	45
8. BIBLIOGRAFÍA.....	46

1. ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

AOAC	<i>Association of Oficial Agricultural Chemist</i>
AESAN	Agencia española de seguridad alimentaria y nutrición
AgNPS	Nanopartículas de plata
EEM	Fluorescencia de emisión excitación de matriz
EEFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
ETC	Cadena de Transporte de electrones
FAD	Dinucleótido de flavina
FMM	Dinucleótido de flavina y adenina
LOD	Límite de detección
LOQ	Límite de cuantificación
MATLAB	<i>Matrix Laboratory</i>
PARAFAC	Análisis de Factores Paralelos
PRESS	Error Suma de cuadrados
PLS	Mínimos Cuadrados Parciales
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
$\Delta\lambda$	Intervalo de longitud de onda

2.RESUMEN/ABSTRACT

2.1. Resumen

Los complementos alimenticios, como vitaminas, antioxidantes, aminoácidos, fibra, ácidos grasos, y minerales entre otros, constituyen fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias, que tienen un efecto nutricional o fisiológico positivo. El estudio y cuantificación de estas sustancias permite evaluar la adecuación nutricional de los alimentos, detectar posibles deficiencias en la cadena alimentaria y contribuir al desarrollo de políticas de fortificación y suplementación. Por tanto, estos análisis son fundamentales para garantizar la salud pública y el bienestar de la población.

Las vitaminas B₁ (tiamina) y B₂ (riboflavina) son esenciales, ya que son nutrientes cruciales para el correcto funcionamiento del organismo. La primera es clave para el metabolismo energético mientras que la segunda lo es para el correcto mantenimiento de los tejidos. Por su parte el flavonoide quercetina es un antioxidante que neutraliza los radicales libres, disminuyendo el daño oxidativo, y de esta manera previniendo o retardando la aparición de enfermedades.

En este trabajo se ha abordado el desarrollo de una metodología para el análisis simultáneo de complementos alimenticios mediante espectroscopia óptica y calibración multivariante, estableciendo un procedimiento para la determinación simultánea de riboflavina, tiamina y quercetina, elegidos como analitos modelo. El análisis de los datos originados a partir de medidas de fluorescencia, fluorescencia sincrónica y absorbancia se realizó empleando mínimos cuadrados parciales (PLS).

El procedimiento establecido para la determinación simultánea de los complementos alimenticios mediante fluorescencia convencional proporciona buenos resultados en mezclas sintéticas. Sin embargo, el empleo de la metodología desarrollada en muestras reales enriquecidas demuestra que los resultados se ven afectados por la matriz de la muestra.

2.2. Abstract

Food supplements, such as vitamins, antioxidants, amino acids, fiber, fatty acids, and minerals, among others, are concentrated sources of nutrients or other substances that have a positive nutritional or physiological effect. The study and quantification of these substances makes it possible to evaluate the nutritional adequacy of foods, detect possible deficiencies in the food chain and contribute to the development of fortification and supplementation policies. Therefore, these analyses are essential to ensure public health and the well-being of the population.

Vitamins B₁ (thiamine) and B₂ (riboflavin) are essential, as they are crucial nutrients for the proper functioning of the body. The first is key for energy metabolism while the second is essential for the correct maintenance of tissues. For its part, the flavonoid quercetin is an antioxidant that neutralizes free radicals, reducing oxidative damage and thus preventing or delaying the onset of diseases.

This work has addressed the development of a methodology for the simultaneous analysis of food supplements by means of optical spectroscopy and multivariate calibration, establishing a procedure for the simultaneous determination of riboflavin, thiamine and quercetin, chosen as model analytes. The analysis of data originating from fluorescence, synchronous fluorescence and absorbance measurements was performed using partial least squares (PLS).

The established procedure for the simultaneous determination of food supplements by conventional fluorescence provides good results in synthetic mixtures. However, the use of the developed methodology on real fortified samples shows that the results are affected by the sample matrix.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. Complementos alimenticios

La ley española define los complementos alimenticios como “productos alimenticios cuyo fin es complementar a la dieta normal y consistentes en fuentes concentradas de nutrientes o de otras sustancias que tengan un efecto nutricional o fisiológico, en forma simple o combinada, comercializados en forma dosificada” (Real Decreto 1487/2009).

Los complementos alimenticios en España estaban regulados por el Real Decreto 1487/2009 en el que únicamente se contemplaba el uso de vitaminas y minerales entre las sustancias autorizadas. El 28 de noviembre de 2012 la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) hizo una propuesta para incluir en un nuevo anexo del Real Decreto el uso de determinadas sustancias, distintas a vitaminas y minerales para ser utilizadas en la fabricación de complementos alimenticios, indicando sus cantidades máximas diarias y a partir de entonces se han ido incluyendo distintos nutrientes y elementos que pueden estar presentes en los complementos.

Los complementos alimenticios se clasifican en función de las sustancias que los componen. Actualmente existe una gran variedad de complementos alimenticios a base

de plantas, aminoácidos, fibra, ácidos grasos, vitaminas y minerales. De entre ellos se han seleccionado como analitos modelo:

- La quercetina un pigmento vegetal, perteneciente al grupo de los flavonoides que se suele utilizar en los complementos nutricionales, junto con la riboflavina o vitamina C entre otros componentes.
- La riboflavina una vitamina del grupo B que se suele utilizar en los productos vitamínicos en combinación con otras vitaminas, cómo puede ser la tiamina, o en complementos que solo contienen riboflavina (Office dietary supplements., 2022).

La presencia de quercetina riboflavina y tiamina, entre otros compuestos, en suplementos nutricionales son de interés pues reducen los factores de riesgo cardiovascular en humanos (Sengupta & Sengupta., 2002).

Existen varios productos comercializados que contienen estos compuestos como el Permeavit, compuesto de quercetina y riboflavina principalmente, o Quercetin Plus con quercetina, tiamina y riboflavina entre otros componentes.

También se puede considerar como complementos alimenticios otro tipo de productos muy diferenciados como pueden ser las bebidas isotónicas cuya función es reponer las pérdidas electrolíticas causadas por la actividad física (Lésniewicz et al., 2015).

3.2. Vitaminas

Las vitaminas son sustancias esenciales para el funcionamiento, del cuerpo humano siendo necesarias para el crecimiento y desarrollo. Son imprescindibles en los procesos metabólicos y en la regulación celular. Se obtienen a partir de los alimentos y su falta o exceso puede desencadenar problemas graves de salud.

Se clasifican en dos grandes grupos: hidrosolubles y liposolubles. Entre las primeras se encuentra la tiamina o B₁ y la riboflavina o B₂ pertenecientes a la familia de las vitaminas B (Zhang et al., 2018).

Según la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), la cual establece los niveles máximos recomendados, las vitaminas B₁ y B₂ no presentan un nivel máximo de consumo por un individuo adulto (Directiva 2002/46/CE).

Las vitaminas del grupo B presentan una gran heterogeneidad en sus propiedades y estructura química.

3.2.1. Tiamina (B1):

Se obtiene a partir de los cereales integrales, las legumbres, la carne de cerdo y los huevos. Está implicada en el metabolismo de los hidratos de carbono, funciones nerviosas y musculares.

El déficit provoca diversos problemas, entre otros: fatiga, nerviosismo, dolor abdominal. El déficit extremo es la causa de la enfermedad de Beriberi y el síndrome de Korssakoffs (Giménez., 2002.)

La estructura de la tiamina consiste en un anillo de aninopirimidina y otro de tiazol unidos mediante un puente de metileno entre el carbono C₃ del primero y el nitrógeno del segundo (Figura 1) (Khalkho et al., 2020) (Hrubša et al., 2022)

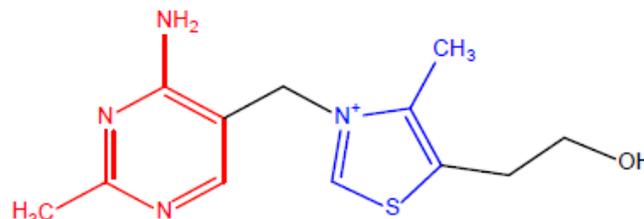


Figura 1: Estructura de la vitamina B₁ Adaptado de Hrubsa et al, 2022

Es estable a pH ácido, pero se descompone con la irradiación de luz ultravioleta y gamma, siendo también susceptible al calor. En soluciones alcalinas y en presencia agentes oxidantes, la tiamina se convierte en un compuesto fluorescente el tiocromo (Hrubša et al., 2022)

3.2.2. Riboflavina (B₂)

La carne, el pescado, el queso y los cereales son alimentos ricos en riboflavina. La vitamina B₂ participa en el metabolismo de las grasas, hidratos de carbono y proteínas. Es importante para la piel y la vista. (Giménez, 2002). Su déficit está asociado a una mala asimilación del hierro.

Una ingesta inadecuada contribuye a dificultades en el metabolismo energético ya que la vitamina B₂ participa en diversas reacciones redox internas que se producen durante ese proceso (Bartzatt & Wol., 2014), siendo crucial para la cadena de transporte de electrones (ETC) (Mosegard et al., 2020).

La riboflavina es el precursor de las coenzimas dinucleótido de flavina (FAD) y del dinucleótido de flavina y adenina (FMM), los cuales desempeñan importantes funciones como cofactores en reacciones catalizadas por enzimas (Mosegard et al., 2020).

Su estructura es la de un anillo de flavina, causa del color amarillo de las disoluciones, enlazada a una cadena alifática a la cual están unidas covalentemente cuatro grupos OH (Bartzatt & Wol., 2014).

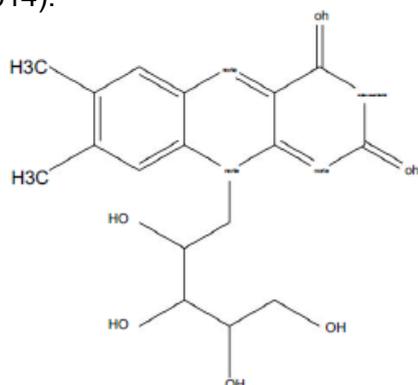


Figura 2: Estructura de la vitamina B₂. Adaptado de Bartzatt & Wol, 2014

A pH ácidos es relativamente estable al calor y al oxígeno atmosférico. Sin embargo, es muy sensible a la luz y es inestable cuando se encuentran en disoluciones alcalinas. (Hrubša et al., 2022).

Presenta una solubilidad variable pero baja en agua en torno a 1 mg/ 20ml siendo insoluble en etanol. (Bartzatt & Wol., 2014).

3.3. Antioxidantes: quercetina

La quercetina pertenece a un grupo de polifenoles bioactivos naturales llamados flavonoides que se encuentran en muchos alimentos como verduras, semillas y bebidas derivadas de plantas como el té o el vino. Su ingesta se puede realizar a partir de estos alimentos o por medio de suplementos alimenticios (Vicente-Vicente L et al., 2013).

Los flavonoides presentan numerosas propiedades beneficiosas relacionadas principalmente con su capacidad antioxidante, como, por ejemplo, su actividad anticancerígena, antivirales y antiinflamatoria, que se han asociado principalmente con la prevención de determinadas enfermedades (Sengupta & Sengupta, 2002).

Dentro del grupo de los flavonoides la quercetina es un flavonol cuya estructura se observa en la figura 3, la cual le confiere propiedades antioxidantes.

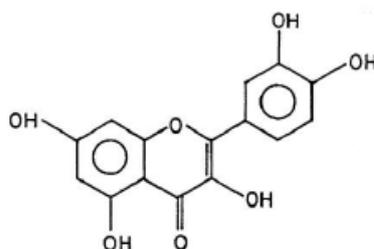


Figura 3: Estructura antioxidante quercetina. Adaptado de Sengupta & Sengupta, 2002

Los compuestos antioxidantes son sustancias que neutralizan los radicales libres, disminuyendo el daño oxidativo, y de esta manera previniendo o retardando la aparición de enfermedades (Vicente-Vicente L et al., 2013).

Los flavonoides debido a su estructura exhiben interesantes propiedades ópticas como es su fluorescencia intrínseca que presenta desplazamientos de Stokes extremadamente grandes, fluorescencia dual y sensibilidad extrema de la emisión con el pH, temperatura y polaridad.

La quercetina es prácticamente insoluble en agua, pero se disuelve bien en alcoholes de bajo peso molecular como etanol y metanol. (Sengupta & Sengupta, 2002).

Actualmente la quercetina se comercializa como complemento alimenticio únicamente para mejorar la actividad antioxidante. Aunque el consumo de quercetina está relacionado con una ligera mejora de ciertas enfermedades, aún está en fases de estudio, presentando una perspectiva prometedora.

Actualmente se está investigando en la mejora de la solubilidad de la quercetina en agua, su estabilidad y biodisponibilidad con el fin de favorecer su uso generalizado y garantizar su eficacia como agente farmacéutico (Aghababaei et al., 2023).

3.4. Determinación de vitaminas B

Para la determinación de las vitaminas B, la “*Association of Official Agricultural Chemists*” (AOAC) recomienda la detección de las vitaminas B₁ y B₂ mediante métodos de fluorescencia:

- El método oficial para la determinación de la vitamina B₂ (Riboflavina) en alimentos y preparados vitamínicos, es un método fluorimétrico que utiliza piridina en la disolución de extracción. Este método es susceptible a interferencias de otros compuestos fluorescentes sobre todo a baja concentración.
- Para la vitamina B₁ (Tiamina): el método más ampliamente utilizado para su determinación es una hidrólisis ácida seguida de desfosforilación enzimática y la cuantificación del tiocromo.

La mayor parte de los análisis se basan en su oxidación a tiocromo que se puede medir directamente por fluorimetría.

Para la determinación de las vitaminas del grupo B existen una gran variedad de métodos, por ejemplo, para la riboflavina la cromatografía líquida con detección fluorescente proporciona una mayor selectividad y son menos susceptibles a las

interferencias que la fluorimetría por si sola, pero presentan el inconveniente de que la preparación de las muestras es más compleja y requieren más tiempo.

Britton y colaboradores utilizan para la determinación de la riboflavina cromatografía líquida en una columna de C₁₈ en fase reversa con detección por fluorescencia. (Britton et al., 2024). Con este método los autores obtuvieron un amplio rango de respuesta lineal, alcanzando límites de detección de $3,4 \cdot 10^{-4}$ µg/ml en piensos para animales, con recuperaciones del 99 %. No utilizan el método de extracción recomendado por la AOAC, ya que emplean una metodología que elimina el uso de piridina.

Para la determinación de la vitamina B₂ se puede emplear espectrometría ultravioleta-visible utilizando un tampón borato a pH 7,52 con un intervalo lineal de $1,23 \cdot 10^{-4}$ M a $7,97 \cdot 10^{-7}$ M. Esta metodología fue aplicada con éxito al análisis de tabletas de vitaminas que contenían riboflavina (Bartzatt & Wol, 2014).

Los métodos colorimétricos son métodos rápidos y sencillos y han sido también aplicados a la detección de tiamina. Por ejemplo, en un trabajo reciente, se utilizan nanopartículas de plata (AgNPs) recubiertas con L-cisteína como sonda colorimétrica para la determinación de tiamina. Se basan en el cambio de color de amarillo a rojo por el desplazamiento de la banda de resonancia del plasmón de nanomaterial debido a la interacción de la L-Cisteína con la vitamina B₁. Se alcanza un intervalo lineal de 25µg/ml a 500µg/ml de vitamina B₁ con un límite de detección de 7,0µg/ml (Khalkho et al., 2020).

3.5. Determinación de quercetina

La detección de flavonoides naturales obtenidos de diversas plantas naturales se suele llevar a cabo mediante el uso de HPLC. Esta metodología proporciona un método adecuado para la determinación de quercetina en muestras recolectadas en varias estaciones.

Yue-Ling y colaboradores llevaron a cabo el análisis por cromatografía de alta resolución utilizando una columna C₁₈ con detección UV para separar la quercetina del resto de componentes de la muestra, obteniéndose una buena linealidad entre 41,2µg/ml a 412 µg/ml, con un RSD de 1,04% (Yue-Ling et al., 2017)

Mediante espectroscopía ultravioleta visible (Fernández et al., 2016) se ha podido determinar el contenido de flavonoides totales, expresados como quercetina, en plantas de guayaba. La metodología presenta una buena linealidad en un rango de concentraciones de 1,5mg/l a 7,5mg/l y un límite de detección de 0,261µg/ml. La

concentración promedio de flavonoides totales, respecto a quercetina, en las muestras fue de $1,018 \pm 0,008\%$

3.6. Concepto de fluorescencia molecular

La fluorescencia molecular es un proceso de fotoluminiscencia donde las moléculas son excitadas por absorción de la radiación electromagnética desde el estado electrónico y vibracional fundamental (S_0) a cualquiera de los niveles vibracionales de los diferentes estados electrónicos excitados (S_1 o S_2) dependiendo de la longitud de onda utilizada. Posteriormente estas moléculas excitadas vuelven al estado fundamental liberando energía en forma de fotones.

En el diagrama de Jablonski se muestran los distintos procesos que ocurren entre la absorción y la emisión de luz por una especie molecular (Figura 4)

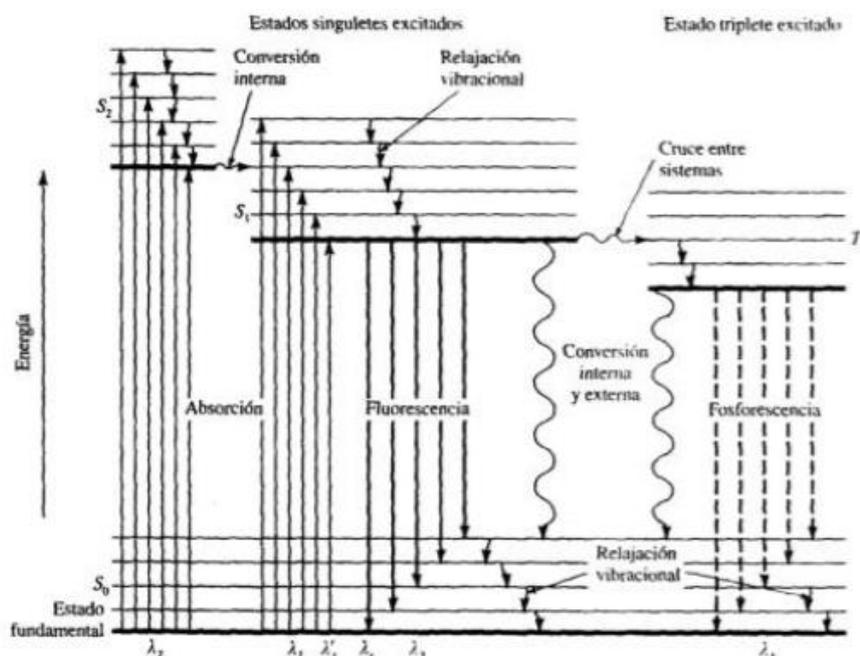


Figura 4. Diagrama de los niveles de energía de una molécula, junto con los procesos que ocurren desde la absorción de radiación electromagnética hasta la emisión de luz (Diagrama de Jablonski)(Harris, 2ª edición)

Una vez que la molécula ha sido excitada pueden ocurrir varios procesos que provocan que pierda su exceso de energía. En primer lugar, la relajación vibracional debida a las colisiones entre las moléculas excitadas y las moléculas de disolvente conduce a las moléculas al estado vibracional más bajo de un estado excitado. (por ejemplo, S_1). Este proceso se representa mediante pequeñas flechas ondeantes entre los niveles de energía vibracional. A partir de allí la desactivación puede producirse por distintas vías, siendo las más importantes la relajación no radiante y la emisión de fluorescencia:

-La fluorescencia ocurre desde el nivel vibracional más bajo de un estado excitado (S_1 o S_2) hacia varios niveles vibracionales del fundamental, S_0 .

-Los mecanismos de relajación no radiativa más importantes que compiten con la emisión de fluorescencia son la conversión interna y el cruce entre sistemas. Estos se describen a continuación.

- En la conversión interna la transferencia de energía se produce entre el estado vibracional más bajo de un estado excitado al nivel vibracional más alto de otro estado electrónico por transferencia de exceso de energía a las moléculas del disolvente (SKOOG, 9^o edición).
- El cruce entre sistemas se produce entre estados de distinto número cuántico de spin (por ejemplo, $S_1 \rightarrow T_1$) y da lugar a la fosforescencia.

La fosforescencia es un proceso de desactivación radiante entre estados de diferente número cuántico de spin (por ejemplo, $T_1 \rightarrow S_0$). Esta transición está prohibida por lo tanto los tiempos de vida son mayores que los de la fluorescencia (Harris, 2^o edición).

3.6.1. Tipos de espectrometría de fluorescencia

3.6.1.1. Espectrometría de fluorescencia convencional

En la fluorescencia convencional los espectros de emisión y excitación se miden a una única longitud de onda (Zhang et al., 2015), es decir, el espectro de emisión se mide a una longitud de onda de excitación fija (λ_{ex}) mientras que para obtener el espectro de excitación se mide a una longitud de onda de emisión fija (λ_{em}).

Los espectrofluorímetros constan de una fuente que suele ser una lámpara de Xenón de alta presión, dos monocromadores de red, uno de excitación y otro de emisión, para seleccionar la longitud de onda y un detector colocado a 90° para evitar que la radiación procedente de la fuente llegue al detector (SKOOG, 9^o edición).

3.6.1.2. Espectrometría de fluorescencia sincrónica

La fluorescencia sincrónica se caracteriza por barrer simultáneamente las longitudes de onda de emisión y excitación mientras se va registrando la señal de fluorescencia, manteniendo un intervalo de longitud de onda constante ($\Delta\lambda$) entre las longitudes de onda de emisión y excitación en todo el espectro (Zhang et al., 2015).

$$\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} \quad [1]$$

Con los espectros sincrónicos se obtiene más información que con los espectros convencionales. En un espectro convencional puede haber especies que no son detectadas por una elección inapropiada de la longitud de onda de excitación o de la emisión, mientras que con el espectro sincrónico la longitud de onda de esta especie seguirá contribuyendo (Sikorka et al., 2007).

Si se elige bien $\Delta\lambda$ se van a obtener espectros con mejor resolución de las bandas que con los espectros de fluorescencia convencionales. Por ejemplo, para una sola especie molecular, la intensidad se simplifica, apareciendo únicamente un pico con un menor ancho de banda (más estrecho), lo que va a reducir la superposición de espectros en las muestras multicomponentes (Zhang et al., 2015).

En resumen, la fluorescencia sincrónica permite obtener espectros de emisión simplificados a la vez que una mayor selectividad.

3.6.1.3. Espectrometría de fluorescencia de emisión excitación de matriz

En determinadas circunstancias los análisis de mezclas pueden verse obstaculizados cuando se miden los espectros de emisión y excitación a una única longitud de onda (de emisión o excitación respectivamente) por lo que se suele utilizar la fluorescencia de emisión-excitación de matriz (EEM) (Sikorka et al, 2007).

En la EEM se obtiene un espectro de fluorescencia total variando de manera sistemática las longitudes de onda de emisión y excitación obteniéndose una matriz de datos. Con esto se consigue mejorar la capacidad de resolución de espectros superpuestos (Guiteras et al., 1998).

Por cada muestra medida se obtiene una matriz, por lo tanto, al concatenar muestras se obtiene un cubo de datos.

Para un único componente el espectro EEM se considera una respuesta bilineal, ya que es una matriz obtenida por el producto de dos vectores relacionados por sus correspondientes espectros de emisión y excitación (Φ_{em} , Φ_{ex}). Esta respuesta va a ser proporcional a la concentración del compuesto (C_i) (Beltran et al., 1998).

Para una mezcla de compuestos el espectro obtenido es igual a la suma de compuestos fluorescentes siguiendo la ecuación [2]:

$$EEM = \sum_{i=1}^{nc} C_i * \Phi_{exi} * \Phi_{emi} \quad [2]$$

3.7. Espectrometría de fluorescencia aplicada al análisis de mezclas

La espectroscopía de fluorescencia es una técnica muy utilizada como herramienta cuali- semicuantitativa y cuantitativa en diversas áreas, como medioambiente, alimentación, medicina, entre otras, por su excelente sensibilidad, selectividad, rapidez y por no ser invasiva (Sikorka et al., 2007).

Sin embargo, su empleo en la determinación de distintos componentes en una mezcla presenta bastante complejidad, sobre todo cuando los analitos tienen características luminiscentes similares, ya que se puede producir superposición espectral necesiéndose métodos de separación previos, para aplicar métodos espectrofluorimétricos univariados (Guiteras et al., 1998).

Con el fin de evitar el uso de métodos de separación se puede aprovechar las posibilidades que ofrece la quimiometría para la determinación de los componentes de la mezcla mediante el empleo del análisis multivariante junto con la calibración multivariante (Guiteras et al., 1998) utilizando los datos obtenidos a partir del empleo de métodos espectroscópicos, como la espectroscopía de fluorescencia.

De esta manera se puede medir directamente la fluorescencia intrínseca de los componentes de la mezcla compleja y posteriormente analizar los espectros obtenidos utilizando métodos multivariados (Valverde., 2023).

3.8. Calibración multivariante

Con la calibración multivariante se extrae la información relevante de los datos y se construyen diferentes modelos. Existen diferentes tipos de calibración multivariante, de primer y segundo orden, los cuales se utilizan según el tipo de datos obtenidos.

Cuando la muestra produce un vector de datos, como es el caso de un espectro medido a J longitudes de onda, el conjunto de calibración es una matriz $(I \times J)$ donde I se corresponde con el número de muestras, los datos se analizan mediante una calibración de primer orden como mínimos cuadrados parciales (PLS) (Jiménez., 2007).

Los métodos de calibración de orden 2, también llamados métodos de calibración de 3 vías, se utiliza cuando la muestra produce una matriz de datos $(J \times K)$, como en la fluorescencia de emisión excitación de matriz, donde el conjunto de calibración es un cubo de dimensiones $(I \times J \times K)$ donde I corresponde al número de muestras y J y K se corresponden con las longitudes de excitación y de emisión de las muestras respectivamente (Murphy et al., 2013).

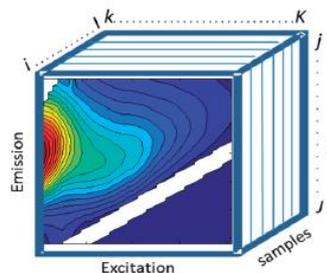


Figura 5. Matriz fluorescencia de emisión excitación de matriz (EEM).
Adaptado de Murphy et al, 2013

Un ejemplo de este tipo de calibración sería el modelo de factores paralelos (PARAFAC).

3.8.1. Regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS)

La regresión por mínimos cuadrados parciales, basado en un modelo de primer orden, tiene como objetivo el modelado de dos matrices \mathbf{X} (respuesta analítica) e \mathbf{Y} (concentración) simultáneamente para encontrar las variables latentes en \mathbf{X} que predigan mejor las variables en \mathbf{Y} (Sikorka et al., 2007).

Existen dos tipos de modelo PLS1 y PLS2. El modelo PLS1 permite predecir una variable a la vez, es decir, se obtiene un único vector de concentración para cada analito, por lo tanto, el número óptimo de factores para cada analito puede variar (Sikorka et al., 2007).

El modelo PLS2 está diseñado para predecir varias variables simultáneamente, utilizando una matriz de concentraciones. Como todos los analitos se modelizan a la vez hay que seleccionar un número de factores óptimo para todos los analitos (Ferrer et al, 1998).

Para PLS1 se dispone de una matriz \mathbf{X} , cuya dimensión es $I \times J$ (muestras y variables respectivamente), y una matriz \mathbf{Y} , cuya dimensión es $I \times 1$. Ambas matrices se descomponen en una matriz de *scores*, una matriz de *loadings* y una matriz residual [ecuaciones 3 y 4]

- Descomposición de la matriz \mathbf{X} : $\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T + \mathbf{E}_x$ [3]
- Descomposición de la matriz \mathbf{Y} : $\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T + \mathbf{E}_y$ [4]

Donde \mathbf{T} y \mathbf{U} se corresponde con la matriz de *scores*, \mathbf{Q} y \mathbf{P} la matriz de *loadings* y los residuos del modelo \mathbf{E}_x e \mathbf{E}_y los cuales se minimizan (Jiménez., 2007)

Esta descomposición se realiza de tal forma que los matrices *scores* presentan la máxima covarianza con la variable dependiente. Esta es la característica principal que diferencia el modelo de PLS de la regresión de componentes principales (PCA).

El modelo por PLS permite predecir las concentraciones de los compuestos de una mezcla utilizando los espectros de mezclas individuales. Un diseño desequilibrado puede dar lugar a malas predicciones bajo ciertas condiciones (Brereton.,1998).

4. OBJETIVO

El objetivo global de este Trabajo de Fin de Máster es desarrollar una metodología para el análisis simultáneo, mediante medidas de fluorescencia, de complementos alimenticios utilizando como analitos modelo las vitaminas B₁ y B₂ y el antioxidante quercetina.

Para ello se deben alcanzar los siguientes objetivos parciales:

- Caracterizar la riboflavina (vitamina B₂), tiamina (vitamina B₁) y quercetina mediante espectroscopia UV-Visible para obtener sus bandas de absorción y sus coeficientes de absortividad molar.
- Caracterizar la fluorescencia intrínseca de los analitos modelo: obtener las longitudes de emisión y excitación óptimas, además de estudiar la influencia del pH, la polaridad del disolvente y la concentración en la señal de fluorescencia.
- Estudiar la fluorescencia de los compuestos mediante fluorescencia sincrónica.
- Diseñar un método analítico para la determinación simultánea de los analitos modelos en agua destilada y su posible aplicación a muestras de una bebida isotónica mediante fluorescencia.
- Aplicar el método quimiométrico de calibración multivariante de mínimos cuadrados parciales (PLS) a los datos obtenidos.
- Estudiar la aplicabilidad del método propuesto a la fluorescencia sincrónica y espectroscopía UV-Vis.

5.PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

5.1. Instrumentación

- ✓ Espectrofotómetro UV-Vis modelo Agilent Technologies Cary 60 UV-Vis
- ✓ Espectrofotómetro fluorescencia modelo Varian Cary Eclipse
- ✓ Balanza analítica modelo Mettler AE 163, con una precisión de $\pm 0,0001$ g.
- ✓ pHmetro Crison micro pH 2002 junto con el agitador magnético modelo Heidolph Mr Hei-Tec.

5.2. Materiales, reactivos y disoluciones

- ✓ 2 micro-pipetas automáticas (Eppendorf™ Research Plus y Labmatesof) con puntas desechables y volúmenes variables de 20-200µL y 100-1000µL, respectivamente.
- ✓ Vasos de precipitados y matraces aforados de diferentes capacidades.
- ✓ Pipeta graduada (5±0,05) ml.
- ✓ Hidróxido de sodio, 99,8 % (AnalaR NORMAPUR)
- ✓ Dihidrógenofosfato de sodio, 98% (RECTAPUR™).
- ✓ Hidrocloruro de Tiamina (Sigma-Aldrich)
- ✓ Quercetina dihidratada (Sigma)
- ✓ (-)-Riboflavina (Sigma).
- ✓ Etanol absoluto (Labkem)
- ✓ Dubecco's Phosphate Buffered Saline (DPBS, 10X) (Glico®).

Para las medidas de fluorescencia se han preparado disoluciones patrones de concentración de $9,04 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de riboflavina, $1,58 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de tiamina, ambas preparadas en agua MilliQ y $1,24 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de quercetina, en etanol, ya que es muy poco soluble en agua. El resto de las disoluciones preparadas se han llevado a cabo por dilución de los patrones.

Para las medidas de absorbancia se ha utilizado una disolución de riboflavina más concentrada $1,08 \cdot 10^{-3} \text{M}$.

Todas las disoluciones se almacenaron en botes ámbar y se guardaron en la nevera, como máximo una semana, dado el carácter fotosensible y antioxidante de los compuestos. Sobre todo, la riboflavina en disolución se degrada muy fácilmente debido a la exposición de la luz solar (Bartzatt et al., 2014).

5.3. Espectrofotométrica ultravioleta-visible

Los espectros de absorbancia se registraron en un intervalo de 200nm a 800 nm empleando una celda de 10 mm de paso óptico. Para cada compuesto se localizaron los máximos de cada una de las bandas de absorción.

Para los respectivos calibrados se prepararon, en matraces de 10ml, disoluciones crecientes en concentración de riboflavina, tiamina y quercetina; añadiendo el volumen necesario de correspondiente patrón, 1 ml de disolución tampón y enrasando con agua destilada.

El rango de concentraciones de la tiamina se varió entre $1,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ y $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$, partiendo de una disolución madre de $1,58 \cdot 10^{-3} \text{M}$; la concentración de riboflavina entre $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ y $4,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ partiendo de $1,08 \cdot 10^{-3} \text{M}$ (en ambos casos se utilizó un buffer de fosfatos a pH 6); y la concentración de quercetina desde $1,00 \cdot 10^{-5}$ a $4,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$, partiendo de una disolución de $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ en agua. En este último caso se utilizó un buffer de DPBS a pH 7,4 y concentración 0,05M.

5.4. Espectrofotométrica de fluorescencia

5.4.1. Fluorescencia e influencia del pH

Para obtener los espectros de fluorescencia de las vitaminas B, tiamina (B_1) riboflavina (B_2), y del antioxidante quercetina se empleó para obtener la banda de emisión las longitudes de onda de los máximos de absorción obtenidos según lo descrito en la sección 5.3.

Una vez localizada la longitud de onda máxima de la banda de emisión se utiliza ésta para obtener el espectro de excitación.

Para estudiar la influencia del pH en la señal de fluorescencia se emplearon disoluciones reguladoras de tampón fosfato 0,2M desde pH 4 hasta pH 8. Se prepararon 5 disoluciones en matraces de 10 ml de concentraciones $5,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de riboflavina, $5,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de quercetina y $5,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de tiamina, a los cuales se les añadió 1ml de las disoluciones fosfato, y se enrasó con agua destilada. Posteriormente estas disoluciones se midieron mediante fluorescencia.

Las disoluciones madre tenían una concentración de $9,04 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de riboflavina, $1,58 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de tiamina, ambas preparadas en agua, y $1,24 \cdot 10^{-3} \text{M}$ de quercetina, en etanol.

5.4.2 Rectas de calibrado por fluorescencia: riboflavina y quercetina

Para realizar el calibrado de la quercetina se preparó una disolución intermedia de concentración $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ en agua destilada a partir de la disolución de $1,24 \cdot 10^{-3} \text{M}$ en etanol. Mientras que para la riboflavina se partió de la disolución de concentración $9,04 \cdot 10^{-5} \text{M}$ en agua.

Se prepararon diferentes disoluciones de concentraciones crecientes de riboflavina y quercetina en matraces de 10 ml.

Las concentraciones de riboflavina se variaron desde $2,00 \cdot 10^{-7} \text{M}$ hasta $3,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$ añadiendo los volúmenes necesarios del patrón junto con 1ml del buffer de DPBS de

concentración 0,05 M y se enrasó con agua destilada. Para la quercetina la disolución se varió desde $1,50 \cdot 10^{-5}$ M hasta $4,50 \cdot 10^{-5}$ M.

Se registraron los espectros de emisión a una longitud de onda de excitación de 368 nm para la quercetina, con un ancho de banda de excitación y emisión (10:20) y a 366 nm para la riboflavina, con un ancho de banda ex:em de 5:5nm.

5.4.3. Fluorescencia sincrónica

Se obtuvieron los espectros sincrónicos, a pH fisiológico, de una disolución de $1,5 \cdot 10^{-6}$ M de riboflavina y otra $5,00 \cdot 10^{-5}$ M de quercetina. Para ello, se estudiaron diferentes $\Delta\lambda$:100,120,140,160 y 180nm desde 235 a 750nm, utilizando anchos de banda de excitación y emisión (10:20 y 20:20).

5.5. Estudio de diferentes mezclas de riboflavina y quercetina

Para elegir el intervalo de concentraciones de riboflavina a ensayar en las mezclas, se decidió emplear aquellas accesibles empleando anchos de banda de 10:20nm, porque la quercetina presenta muy poca fluorescencia, siendo este el ancho de banda con el que se obtiene una buena señal analítica para la quercetina. Se variaron desde $1,50 \cdot 10^{-7}$ M hasta $1,16 \cdot 10^{-6}$ M, porque a partir de esta concentración utilizando bandas de ex:em de 10:20nm saturaba la señal de fluorescencia.

Para la quercetina se decidió variar la concentración desde $2,0 \cdot 10^{-5}$ M hasta $5,0 \cdot 10^{-5}$ M.

Para realizar las diferentes mezclas se partieron de disoluciones madre preparadas como se describe en el apartado 5.4.2. Se variaron las concentraciones según la siguiente tabla, aumentando la concentración de riboflavina y disminuyendo la de quercetina:

Tabla 1:Concentraciones de las mezclas ensayadas

Concentración riboflavina (M)	Concentración quercetina(M)
$1,50 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-5}$
$4,88 \cdot 10^{-7}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$
$8,25 \cdot 10^{-7}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$
$1,16 \cdot 10^{-6}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$

En matraces de 10 ml se añadió 1ml de la disolución tampón DBPS (pH 7,4), los correspondientes volúmenes de riboflavina y quercetina para obtener esas concentraciones y se enrasó con agua destilada.

5.6. Aplicabilidad del método a muestras reales

El método optimizado se quiso aplicó a muestras del refresco Aquarius, preparando las mezclas con las concentraciones de la tabla anterior. Para ello se partieron de diferentes

disoluciones intermedias enrasadas con muestra. Se sigue el procedimiento descrito en el apartado anterior 5.5 con respecto a las medidas espectrofotométricas.

5.7. Programas empleados

Para las medidas espectrofotométricas por fluorescencia se utilizó el software Cary Eclipse Scan mientras que para las medidas por espectroscopia UV-Vis se utilizó el software Cary Win UV.

El tratamiento de datos se realizó con la hoja de cálculo Excel (Microsoft®) para la calibración univariante y con el programa MATLAB para la calibración multivariante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS)

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Estudios preliminares

Para poder abordar el estudio de mezclas de tiamina (B_1), riboflavina (B_2) y quercetina, compuestos elegidos como analitos modelos ya que suelen aparecer en los complementos alimenticios, se realizaron estudios preliminares de las propiedades ópticas, absorbancia y fluorescencia, de cada uno de ellos y así obtener las condiciones óptimas de trabajo en vista a los futuros estudios quimiométricos.

6.1.1. Caracterización espectrofotométrica ultravioleta-visible

Se llevó a cabo un estudio espectrofotométrico ultravioleta-visible de la tiamina (B_1), riboflavina (B_2) y del antioxidante quercetina para obtener sus características espectroscópicas intrínsecas, en concreto las bandas de absorción y sus coeficientes de absortividad molar, y analíticas.

6.1.1.1. Vitaminas B

En la figura 6 se muestran los espectros UV-Vis de tiamina y riboflavina, utilizando agua como disolvente.

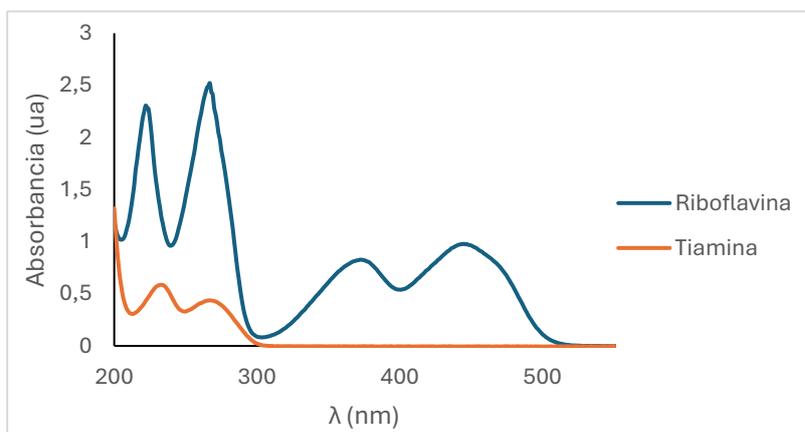


Figura 6. Espectros de absorción tiamina(B_1), $5,00 \cdot 10^{-5}M$ y riboflavina (B_2), $5,00 \cdot 10^{-4}M$

La tiamina presenta dos bandas de absorción a 233nm y 267 nm por transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi$ respectivamente debidas a la base purina (Singh et al., 2023), mientras que la vitamina B₂, con un cromóforo basado en la flavina, presenta además dos máximos de absorción en la zona del visible, a 372nm y 445nm, debidas a la presencia de una estructura de la flavina, sustancia heterocíclica nitrogenada de tres anillos y dos grupos oxo, conocida como isoaloxacina, que es la que les confiere el color amarillo a las disoluciones (Bartzatt & Wol, 2014).

La banda de 445nm se debe principalmente a la transición electrónica $S_0 \rightarrow S_1$, siendo la estructura de flavina la parte de la molécula que interviene mayoritariamente en esta transición (véase figura 7), mientras que la banda de 372 nm se origina a partir de la contribución de tres transiciones, donde la mayoritaria es debido a la transición desde $S_0 \rightarrow S_2$, seguida por $S_0 \rightarrow S_3$ y en menor medida la $S_0 \rightarrow S_4$ (Zanetti-Polzi et al., 2017).

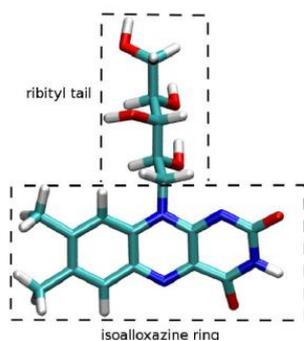


Figura 7. Estructura de la riboflavina. Adaptado de Zanetti-Polzi et al, 2017

Para evaluar la influencia de la concentración en la señal de absorbancia y calcular el coeficiente de absortividad molar se estudió la respuesta analítica en el rango de concentraciones de $1,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ a $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para la tiamina y de $1,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ hasta $4,00 \cdot 10^{-4} \text{M}$ para la riboflavina.

En las figuras 8 se observa la recta de calibrado de la tiamina para el máximo de absorbancia de 267nm.

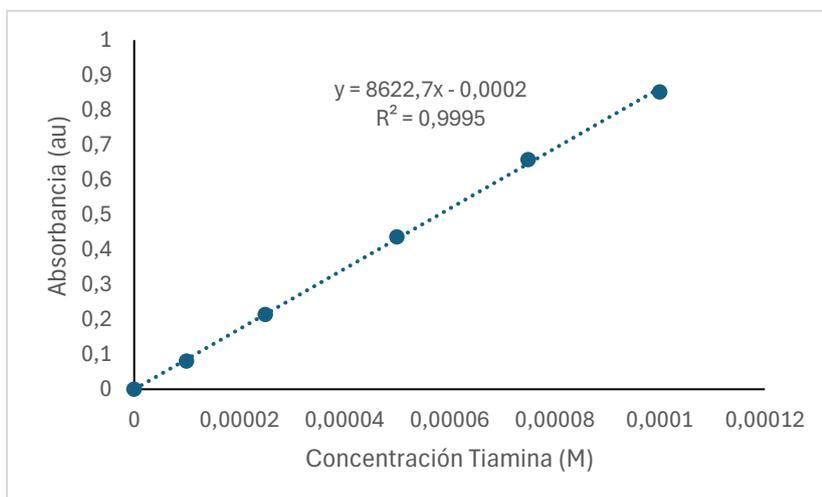


Figura 8. Recta de calibrado de la tiamina. Máximo de absorción $\lambda=267\text{nm}$

Como el valor del coeficiente de absorptividad molar depende de la longitud de onda empleada, se estudió también la respuesta analítica para $\lambda=233\text{nm}$ obteniéndose una recta de calibrado

$$y = (1,16 \cdot 10^4 \pm 1 \cdot 10^2) au/M + (6 \cdot 10^{-5} \pm 8 \cdot 10^{-3}) au \text{ con un } R^2 \text{ de } 0,9994$$

En la figura 9 se observa la recta de calibrado de riboflavina para la longitud de onda de 455nm.

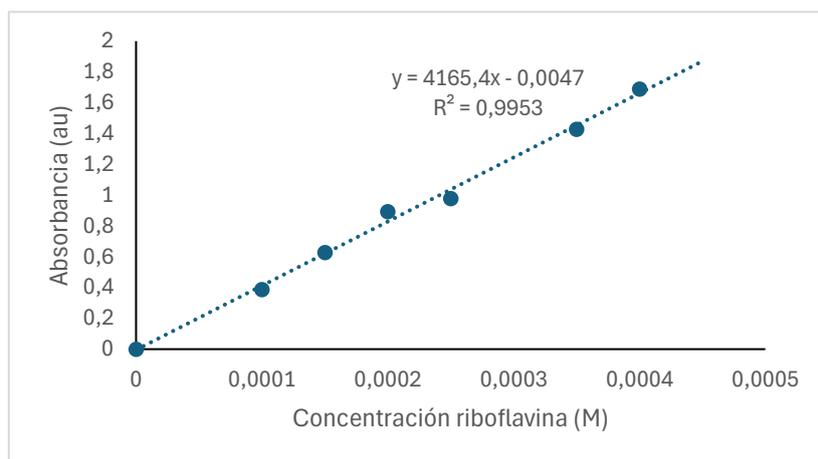


Figura 9. Recta de calibrado riboflavina máximo de absorción $\lambda=455\text{nm}$

Para el máximo de 372nm la recta de calibrado obtenida fue la siguiente:

$$y = (3,65 \cdot 10^3 \pm 1,8 \cdot 10^2) ua/M - (3 \cdot 10^{-2} \pm 5 \cdot 10^{-3}) ua \text{ con una } R^2 \text{ de } 0,9903$$

Mediante el uso de la Ley de Beer ($A = b \cdot \varepsilon \cdot c$) y la ecuación de la recta se puede obtener el coeficiente de absorptividad, ya que, como el paso óptico (b) es 1cm, el coeficiente de absorptividad molar se corresponde con la pendiente de la recta de calibrado.

En la tabla 2 se muestran los coeficientes de absorptividad molar junto con los parámetros estadísticos obtenidos en la calibración donde: S_a y S_b representan la desviación estándar de la ordenada en el origen (a) y de la pendiente (b) respectivamente, $S_{y/x}$ estima los errores aleatorios en la dirección y , así como los límites de detección y cuantificación.

El límite de detección se calcula como: $LOD = (3 \cdot S_{y/x})/b$ y el límite de cuantificación: $LOQ = (10 \cdot S_{y/x})/b$ (Miller & Miller., 2002).

Tabla 2 Características analíticas obtenidas para la calibración de tiamina y riboflavina

Parámetro	Tiamina		Riboflavina	
	$\lambda=267\text{nm}$	$\lambda=233\text{nm}$	$\lambda=455\text{nm}$	$\lambda=372\text{nm}$
$a \pm S_a$ (au)	$(-0,23 \pm 5,60) \cdot 10^{-3}$	$(0,0684 \pm 8,11) \cdot 10^{-3}$	$(-4,70 \pm 31,3) \cdot 10^{-3}$	$(-2,87 \pm 4,77) \cdot 10^{-2}$
$b \pm S_b$ (au/M)	$(8,62 \pm 0,10) \cdot 10^3$	$(1,16 \pm 0,01) \cdot 10^{+4}$	$(4,17 \pm 0,13) \cdot 10^3$	$(3,65 \pm 0,18) \cdot 10^3$
R^2	0,9995	0,9994	0,9953	0,9903
$S_{y/x}$	$8,70 \cdot 10^{-3}$	$1,26 \cdot 10^{-2}$	$4,39 \cdot 10^{-2}$	$4,68 \cdot 10^{-2}$
LOD (M)	$3,03 \cdot 10^{-6}$	$3,26 \cdot 10^{-6}$	$3,16 \cdot 10^{-5}$	$3,85 \cdot 10^{-5}$
LOQ (M)	$1,01 \cdot 10^{-5}$	$1,09 \cdot 10^{-5}$	$1,05 \cdot 10^{-4}$	$1,28 \cdot 10^{-4}$
ϵ ($\text{mol}^{-1} \cdot \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)	8620 ± 100	11600 ± 100	4170 ± 113	3650 ± 180
Rango lineal (M)	$1,00 \cdot 10^{-5}$ - $1,00 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$ - $1,00 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$ - $4 \cdot 10^{-4}$	$1,00 \cdot 10^{-4}$ - $4,00 \cdot 10^{-4}$

6.1.1.2. Quercetina

En la figura 10 se muestra el espectro de absorción UV-Vis de una disolución de quercetina en etanol donde se puede observar la presencia de dos bandas de con máximos a 254nm y 370nm respectivamente.

La quercetina es prácticamente insoluble en agua, pero se disuelve bien en alcoholes de bajo peso molecular como etanol y metanol. Es por esto por lo que para este trabajo se eligió el etanol como disolvente. (Sengupta & Sengupta., 2002)

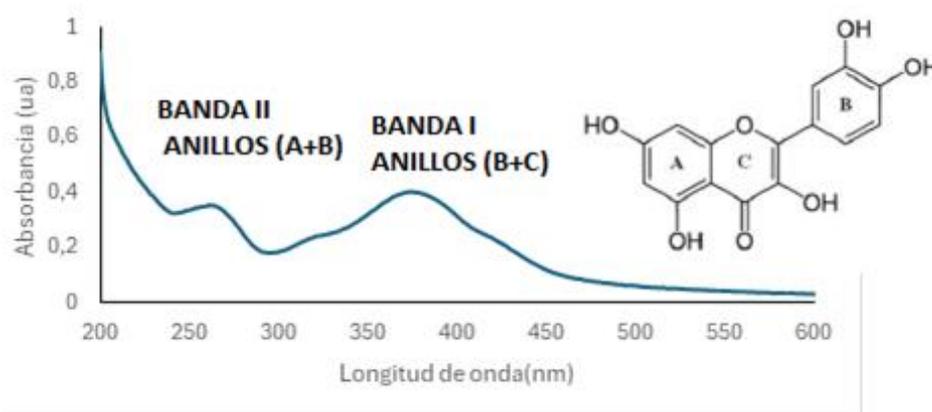


Figura 10: Espectro UV-vis del antioxidante quercetina $5 \cdot 10^{-6} \text{M}$ a pH 7,4

La banda I, más energética, aparece entre 300-400nm y está asociada a los anillos (B+C) mientras que la banda II es debida a los anillos (A+B) la cual aparece entre 240-280 nm (Patel et al., 2012).

Para los dos máximos de la quercetina, a λ de 237nm y λ de 254nm, se calculó el coeficiente de absorptividad molar y se estudió la respuesta analítica en el rango de concentraciones: $1,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ a $4,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de quercetina.

En la figura 11 se muestra la recta de calibrado obtenida para $\lambda=370\text{nm}$ y las características analíticas se resumen en la tabla 2

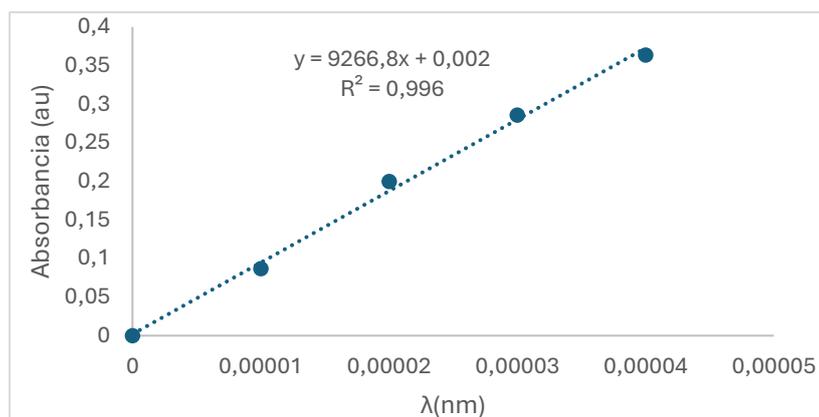


Figura 11.: Calibrado quercetina pH 7,4 $\lambda=370$ nm.

Para el máximo de absorbancia a 254nm, se obtuvo siguiente recta de calibrado:

$$y = (8,1 \cdot 10^3 \pm 2,38 \cdot 10^2) \text{ua}/M + (3 \cdot 10^{-3} \pm 6 \cdot 10^{-3}) \text{ua} \quad \text{con un } R^2 \text{ de } 0,997$$

En la tabla 3 se muestran los parámetros estadísticos obtenidos para la quercetina, la recta se recalculó sin tener en cuenta el último punto ya que está fuera del intervalo lineal.

Tabla 3: Características analíticas antioxidante quercetina

Parámetro	$\lambda=370\text{nm}$	$\lambda=254\text{nm}$
$a \pm S_a$ (au)	$(2 \pm 8) \cdot 10^{-3}$	$(3 \pm 6) \cdot 10^{-3}$
$b \pm S_b$ (au/M)	$(9,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$	$(8,1 \pm 0,2) \cdot 10^3$
R^2	0,996	0,997
$S_{y/x}$	$1,07 \cdot 10^{-2}$	$7,53 \cdot 10^{-3}$
LOD (M)	$3,45 \cdot 10^{-6}$	$2,80 \cdot 10^{-6}$
LOQ (M)	$1,15 \cdot 10^{-5}$	$9,32 \cdot 10^{-5}$
ϵ ($\text{mol}^{-1} \text{l} \cdot \text{cm}^{-1}$)	9300 ± 200	8100 ± 200
Rango lineal (M)	$1,00 \cdot 10^{-5} - 4,00 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5} - 4,00 \cdot 10^{-5}$

En la siguiente tabla, se muestra un resumen de las bandas de absorción obtenidas para la tiamina, quercetina y riboflavina junto con sus coeficientes de absortividad molar.

Tabla 4. Características analíticas riboflavina, quercetina y tiamina

Compuesto	Bandas absorbancia(nm)	ϵ ($\text{mol}^{-1}\text{l}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
Riboflavina	372	3650 ± 180
	455	4170 ± 113
Quercetina	254	8100 ± 200
	370	9300 ± 200
Tiamina	233	11600 ± 100
	267	8620 ± 100

6.1.2 Caracterización óptica mediante fluorescencia

Las técnicas fluorescentes presentan mayor sensibilidad y selectividad que las espectrofotométricas, es por ello que también se estudiaron las propiedades fotoluminiscentes de los distintos compuestos. Para el establecimiento de las condiciones adecuadas de trabajo se partió de la información proporcionada por los espectros de absorción para localizar las bandas de emisión y a partir de esta las bandas de excitación, fluorescencia convencional. Posteriormente se analizaron los compuestos por fluorescencia sincrónica.

6.1.2.1. Fluorescencia convencional

En las figuras 12, 13 y 14 se muestran los espectros de fluorescencia obtenidos para los distintos compuestos.

La disolución de riboflavina en agua de concentración $5,00 \cdot 10^{-6}\text{M}$, presenta cuatro bandas de excitación dos de las cuales, correspondientes a las transiciones menos energéticas con máximos situados a 368nm y 450 nm, se corresponden con las bandas de absorción en el ultravioleta cercano y el visible respectivamente, mientras que máximo del espectro de emisión aparece en todos los casos a 526 nm (ver Figura 12).

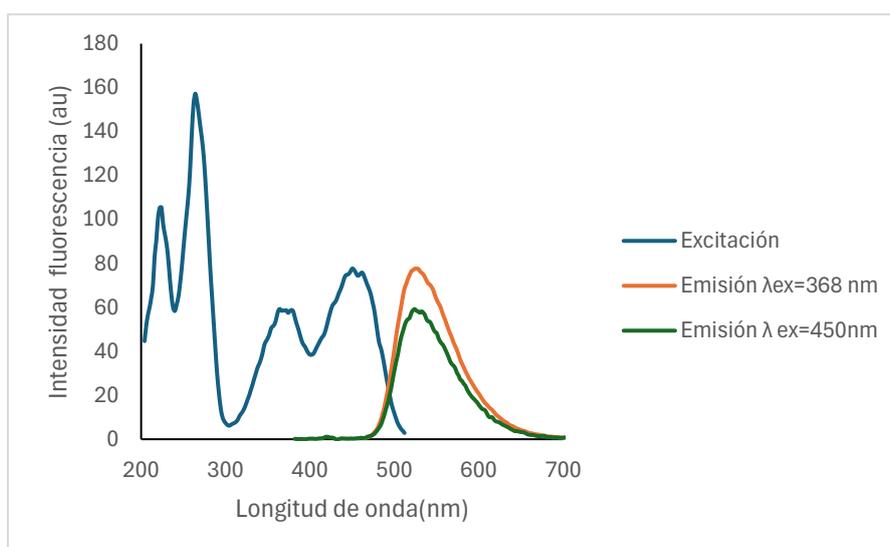


Figura 12: Espectro fluorescencia riboflavina $5,00 \cdot 10^{-6}\text{M}$. Paso de banda ex:em 5:5nm, pH=7,4

El estudio del espectro de fluorescencia de la quercetina, para una concentración de $5,00 \cdot 10^{-5} M$ en agua, revela que este compuesto presenta una banda con un máximo a 544nm, cuando se excita a una longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex}=366 \text{ nm}$) (Figura 13).

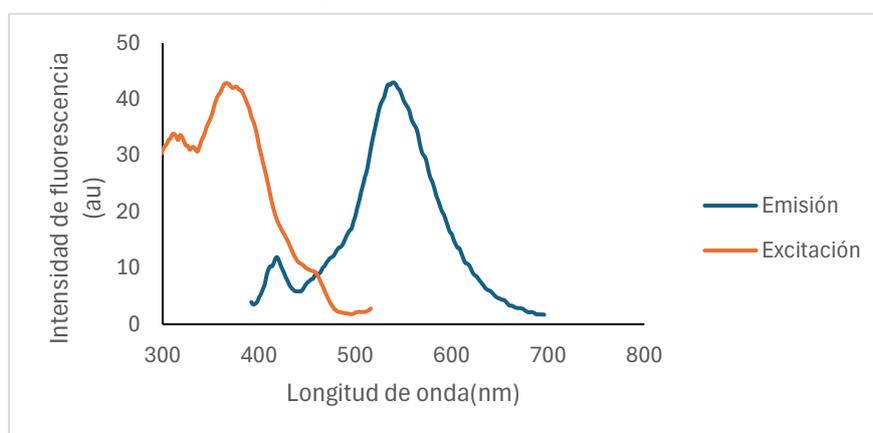


Figura 13. Espectro fluorescencia de la quercetina $5,00 \cdot 10^{-5} M$ Paso de banda ex:em 10:20nm, pH=7,4.

La intensidad de los espectros de emisión de la quercetina en las condiciones de medida de la riboflavina es significativamente menor indicando un menor rendimiento cuántico de fluorescencia, por lo que para su estudio se utilizó un ancho de banda de excitación y emisión mayor, de 10 y 20 nm respectivamente.

Además, presenta unas inusuales propiedades de emisión de fluorescencia, teniendo una gran sensibilidad a las condiciones del medio como son el pH, temperatura y polaridad (Sengupta et al, 2002).

Por último, para la tiamina, en el apartado anterior se ha visto que presenta dos máximos de absorbancia a 233 y 267 nm, por tanto, para estudiar la fluorescencia en un primer lugar se escogieron estos máximos como longitudes de onda de excitación.

Al utilizar como longitud de onda de excitación ($\lambda_{ex}=262 \text{ nm}$) se obtiene el siguiente espectro:

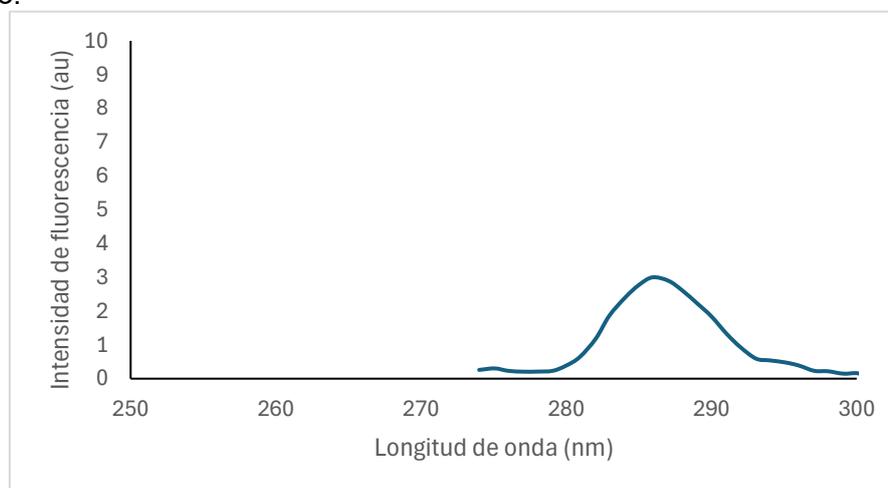


Figura 14: Espectro emisión de la tiamina $5,00 \cdot 10^{-5} M$ en agua. Paso de banda ex:em 20:20 nm, $\lambda_{ex}=262 \text{ nm}$

El pico que se observa a 286nm, en la figura 14, no es debido a la presencia del compuesto sino a la dispersión Raman del agua. Cuando la longitud de onda de excitación es de 260nm, la dispersión Raman del agua aparece a 287nm, lo cual se corresponde con el resultado obtenido.

(Yang et al., 2016) estudiaron la fluorescencia intrínseca de la tiamina y la riboflavina, utilizando para la tiamina una longitud de onda de excitación de 370nm y una longitud de onda de emisión de 460nm. Por lo tanto, se probaron diferentes pH para buscar su fluorescencia desde pH 4,00 hasta pH 8,62, no encontrándose señal de emisión analíticamente útil en ninguna de las disoluciones. Estos estudios se repitieron empleando diferentes anchos de banda y concentraciones, sin resultados positivos.

Este comportamiento se explicaría teniendo en cuenta que la tiamina posee un heterociclo (anillo de pirimidina) con varios heteroátomos que junto giro del grupo tiazol favorecen los procesos no radiacionales de desactivación frente a la emisión del fotón (Posada ,2018), (Tylicki et al, 2017).

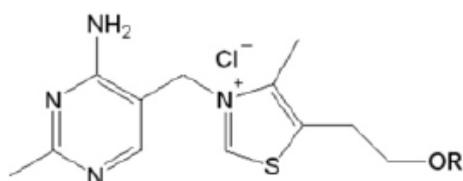


Figura 15. Estructura de la tiamina. Adaptado de Tylicki et al, 2017

En la bibliografía es frecuente detectar tiamina por luminiscencia, pero en presencia de agentes oxidantes y medio básico (Figura 16) ya que el tiocromo generado presenta una fluorescencia azul en un intervalo de λ_{ex} entre 365-375 nm y λ_{em} =425-435nm que puede usarse para su determinación (Deulofeut, 2014). Esta metodología no se presenta por tanto adecuada para nuestro estudio dado que está dirigido al análisis de mezclas y se desestima el empleo de la fluorescencia para la determinación de tiamina en estudios posteriores.

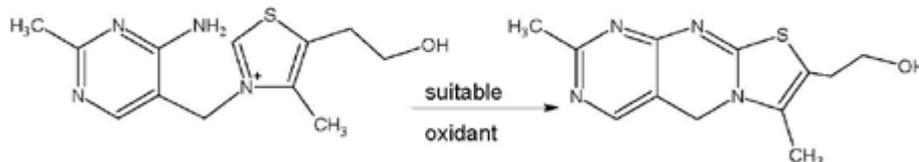


Figura 16: Reacción de oxidación de la tiamina a tiocromo. Adaptado de Mohamed et al, 2011

6.1.2.2. Estudio de la influencia del pH

Se llevó a cabo un estudio de pH para observar su influencia sobre la señal de fluorescencia de la riboflavina y quercetina. Se prepararon disoluciones de $5,00 \cdot 10^{-6}M$ y

$5,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de riboflavina y quercetina respectivamente utilizando tampón fosfato de concentración $0,2 \text{M}$ con valores de pH comprendidos entre 4 a 8.

Las condiciones utilizadas para cada compuesto se muestran a continuación:

-Riboflavina: disolución $5,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$ de riboflavina, ancho de banda de emisión y excitación de 5 y 5 nm, longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 368 \text{ nm}$)

-Quercetina: disolución $5,00 \cdot 10^{-5} \text{M}$ de quercetina con un ancho de banda de emisión y excitación de 10:20nm respectivamente, longitud de onda de excitación ($\lambda_{\text{ex}} = 366 \text{ nm}$)

La riboflavina dependiendo del pH del medio se encuentra en forma catiónica neutra o aniónica (figura 17). En medios fuertemente ácidos la forma catiónica está presente, siendo esta no fluorescente. A medida que se va aumentando el pH va habiendo en disolución más forma neutra de riboflavina (especie fluorescente). En medios fuertemente básicos predomina la forma aniónica siendo débilmente fluorescente. (Hassamin,2022) (Drosseler et al., 2002).

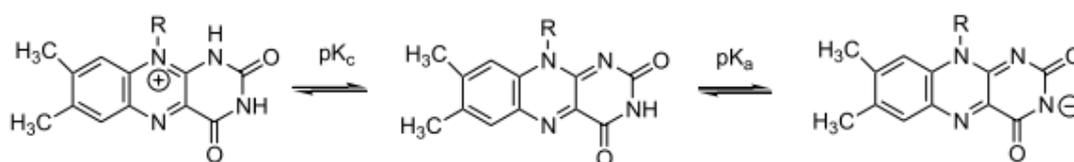


Figura 17 Forma catiónica, neutra y aniónica de la riboflavina (Drosseler et al,2002)

Para estudiar la influencia de pH en la señal de fluorescencia este se varió entre pH 4 y pH 8 donde únicamente está presente la forma neutra en disolución registrándose los espectros de fluorescencia en cada en cada caso. En la figura 18 se muestran los resultados obtenidos la condición ensayada.

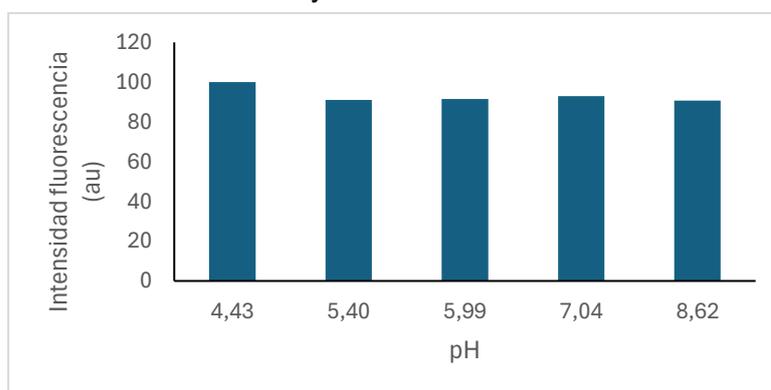


Figura 18. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia riboflavina $5,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$
Paso de banda ex:em 5:5, $\lambda_{\text{ex}} 368 \text{ nm}$

Para las disoluciones de riboflavina ensayadas, no influye significativamente en la intensidad de fluorescencia. Por lo tanto, el pH elegido para la realización de las mezclas de fluorescencia va a depender de la quercetina.

Estos resultados coinciden con los reportados por Yang y colaboradores donde se indica que la fluorescencia de la riboflavina cuando se encuentra en una disolución alcalina o ácida fuerte disminuye drásticamente en comparación con la de los medios básicos o ácidos débiles donde no hay casi variación de intensidad de fluorescencia (Yang et al,2016). A partir del pH 7,4 la intensidad de fluorescencia comienza a disminuir (Hassamin.,2022).

El efecto del pH sobre la señal analítica obtenida para la quercetina se muestra a continuación:

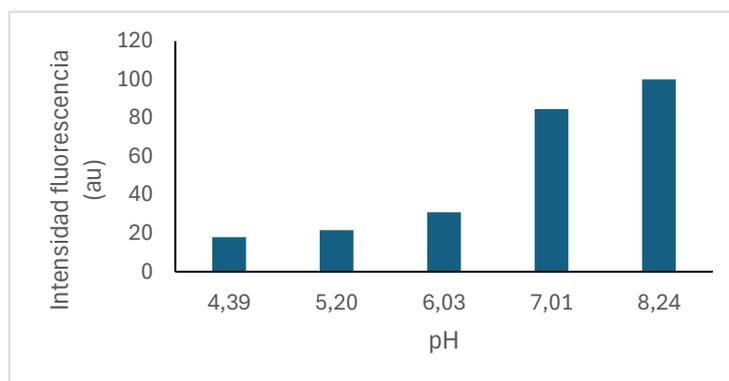


Figura 19. Efecto del pH en la intensidad de fluorescencia quercetina $5,00 \cdot 10^{-5}M$
Paso de banda ex:em 10:20, $\lambda_{ex}=366nm$

Como se puede observar el pH para la antioxidante quercetina influye notablemente en la señal analítica, siendo esta inferior cuando se trabaja en medios ácidos, pero se incrementa conforme el medio se va tornando más básico.

Además, se produce un desplazamiento de la longitud de onda del máximo de emisión, como se puede ver en la figura 20, es decir se produce una estabilización del compuesto dado que las transiciones son menos energéticas.

Esto puede ser debido a que la quercetina en su estructura presenta sustituyentes hidroxilo, los cuales están ionizados o no según el pH en el que se está trabajando. La forma ionizada o neutra de la quercetina va a presentar diferentes longitudes de excitación, emisión e intensidad.

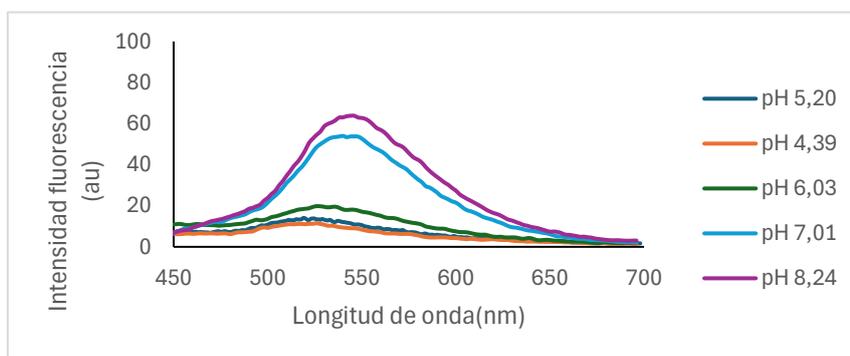


Figura 20. Variación de la longitud de onda del máximo de emisión de la quercetina $5,00 \cdot 10^{-5}M$.
Paso de banda ex:em 10:20, $\lambda_{ex}=366nm$

En medio ácido el máximo de emisión aparece sobre 526 nm, mientras que a pH neutro y en medio básico este máximo se desplaza a 540nm y 544nm respectivamente. Esto es debido a que la quercetina es un flavonoide, los cuales presentan inusuales propiedades de emisión de fluorescencia muy influenciados por el pH, temperatura y polaridad entre otros factores (Sengupta et al., 2002).

Para la realización de los estudios de mezclas se eligió trabajar a pH cercano a la neutralidad, y se fijó en 7,4 procediéndose a estudiar la variación de la concentración en la señal de fluorescencia para ambos compuestos en esta condición. La elección de un pH 7,4 se fundamentó en que, siendo el pH fisiológico, podría extenderse en un futuro la metodología para su empleo en muestra biológicas.

6.1.2.3. Características analíticas de la metodología

Una vez establecido el pH fisiológico como el adecuado para continuar con los estudios, se procedió a realizar una calibración en los rangos de concentraciones de $2,00 \cdot 10^{-7} \text{M}$ a $3,00 \cdot 10^{-6} \text{M}$ para la vitamina B₂ y de $1,50 \cdot 10^{-5} \text{M}$ a $4,50 \cdot 10^{-5} \text{M}$ para la quercetina. Este estudio se realizó utilizando un buffer de DPBS.

Para saber la relación de concentraciones entre la vitamina B₂ y la quercetina se utilizaron como referencia las cantidades de vitamina B₂ y quercetinas indicadas en el envase del complemento alimenticio Permeavit.

En la figura 21 se observan los espectros de fluorescencia obtenidos para las concentraciones estudiadas.

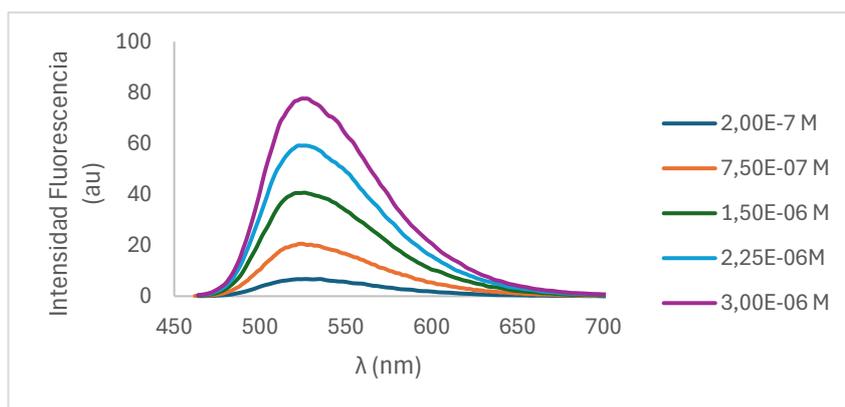


Figura21. Espectros de fluorescencia para las concentraciones de riboflavina en el rango lineal. Condiciones $\lambda_{ex}=368 \text{ nm}$, paso de banda ex:em 5:5

La linealidad obtenida se evaluó representando la fluorescencia del máximo del máximo de emisión frente a la concentración de riboflavina, obteniéndose un buen ajuste lineal con un coeficiente de determinación R^2 de 0,9994.

$$y = (2,58 \cdot 10^7 \pm 3 \cdot 10^5) \text{ au/M} + (1,1 \pm 5 \cdot 10^{-1}) \text{ au}$$

Para la quercetina las señales de fluorescencia obtenidas se pueden observar en la figura 22.

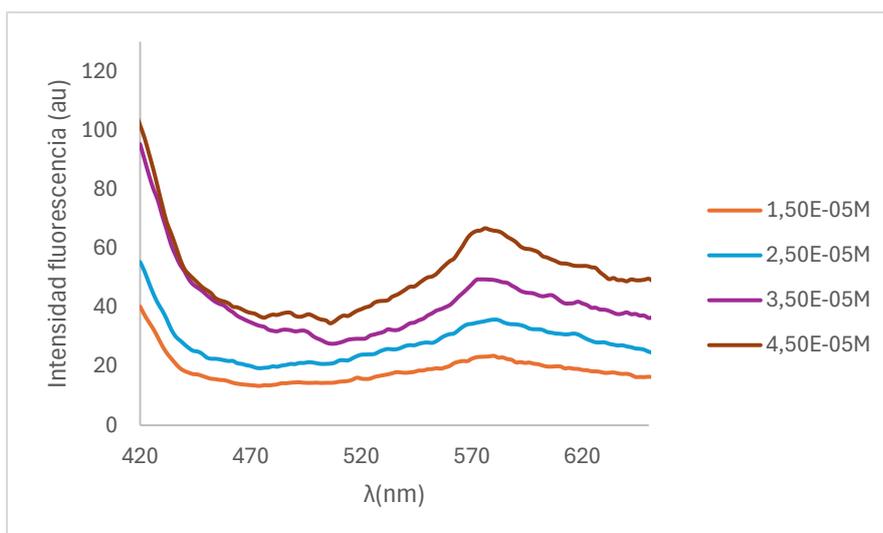


Figura 22 Espectros de fluorescencia para las concentraciones de quercetina en el rango lineal. Condiciones $\lambda_{ex}=366$ nm, paso de banda ex:em 10:20

Se representó la intensidad en el máximo de emisión frente a la concentración para estudiar la linealidad, obteniéndose un coeficiente de regresión, R^2 de 0,9973

$$y = (1,45 \cdot 10^6 \pm 4,0 \cdot 10^4) au/M + (3 \cdot 10^{-1} \pm 1,2) au$$

En la Tabla 5 se resumen los parámetros estadísticos obtenidos en la calibración para la quercetina y riboflavina

Tabla 5. Características analíticas obtenidas para la calibración de riboflavina y quercetina

Parámetro	Valores riboflavina	Valores quercetina
$a \pm S_a$ (au)	$1,1 \pm 0,5$	$0,3 \pm 1,2$
$b \pm S_b$ (au/M)	$(2,58 \pm 0,03) \cdot 10^7$	$(1,45 \pm 0,04) \cdot 10^6$
R^2	0,9994	0,9973
$S_{y/x}$	$8,03 \cdot 10^{-1}$	1,52
LOD (M)	$9,33 \cdot 10^{-8}$	$3,13 \cdot 10^{-6}$
LOQ (M)	$3,11 \cdot 10^{-7}$	$1,04 \cdot 10^{-5}$
Rango Lineal	$2,00 \cdot 10^{-7} - 3,00 \cdot 10^{-6}$	$1,50 \cdot 10^{-5} - 4,50 \cdot 10^{-5}$

6.1.2.4. Estudio de la polaridad del disolvente en la señal de fluorescencia del antioxidante quercetina

La polaridad del disolvente influye significativamente en la señal de emisión de fluorescencia. El espectro de emisión de la quercetina cuando el disolvente es agua presenta un máximo de emisión a 570 nm.

Según la proporción de etanol-agua el máximo aparece a una mayor o menor longitud de onda. Por ejemplo en etanol:agua (60:40) aparece a 527nm mientras que con una proporción 90:10 ese desplaza hasta los 484 nm. Esto indica que en disolventes menos polares tiene lugar un desplazamiento espectral hacia longitudes de onda más cortas (Díaz et al., 2019).

En la ilustración 23 se muestran las señales obtenidas para disoluciones de quercetina en etanol y mezcla etanol:agua donde se verifica experimentalmente esta particularidad.

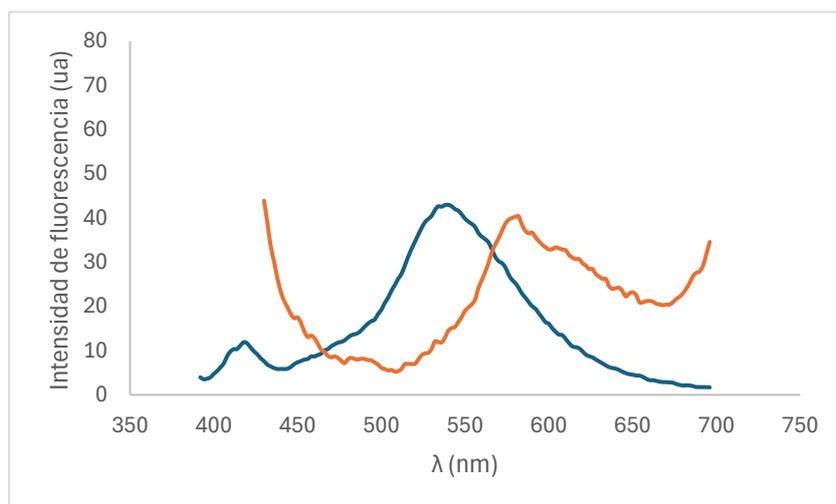


Figura 23: Variación de la longitud de onda de emisión para la antioxidante quercetina según el disolvente utilizado $\lambda_{ex}=366nm$, paso de banda 10:20nm

Para obtener los espectros de emisión la longitud de onda de excitación se fijó en 366nm, utilizándose anchos de banda 10:20 nm. En ambos casos las disoluciones presentan la misma concentración, $5 \cdot 10^{-5} M$, pero con porcentajes de etanol del 4,03 % (trazo azul) y 1,5% (trazo naranja).

La quercetina disuelta en etanol (4,03%) presenta un máximo de emisión a una longitud de onda de 540 nm, mientras que cuando se prepara una disolución acuosa este máximo se desplaza a 583nm, por lo tanto, se verifica la información reportada por Díaz et al., ya que se produce el desplazamiento espectral hacia menores longitudes de onda cuando se utilizan disolventes menos polares.

6.1.2. 5.. Fluorescencia sincrónica

Se llevó a cabo un estudio de fluorescencia sincrónica de la riboflavina, quercetina, a pH fisiológico, probando diferentes $\Delta\lambda$ (100,120,140,160,180) y ancho de banda de emisión/ excitación (10:20 y 20:20) para encontrar las mejores condiciones.

Los espectros elegidos se observan a continuación:

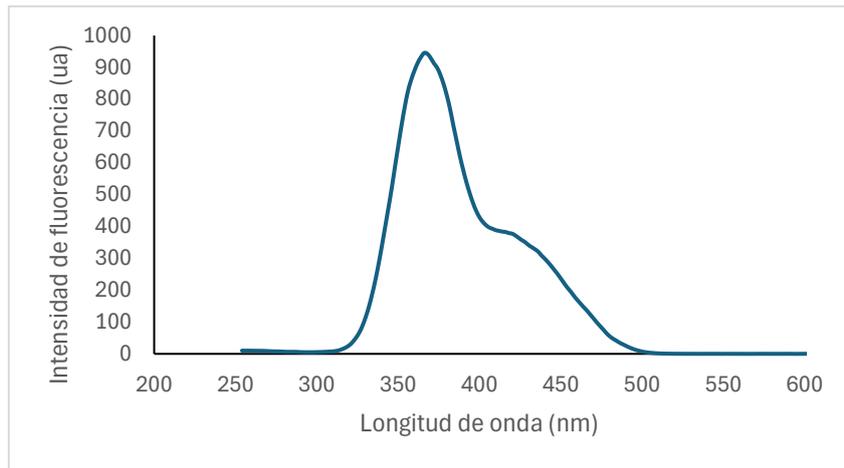


Figura 24.: Espectro sincrónico riboflavina $1,5 \cdot 10^{-6}M$, paso de banda 10:20, $\Delta\lambda=160nm$

-Para el caso de la riboflavina se ha elegido el espectro obtenido con $\Delta\lambda=160nm$ porque es el que más se aproxima a la diferencia en la longitud de onda entre el espectro de emisión y excitación:

- $\Delta\lambda=\lambda_{em}-\lambda_{ex} \rightarrow 525-368=157$ [5]
- $\Delta\lambda=\lambda_{em}-\lambda_{ex} \rightarrow 525-450=75$ [6]

No se escoge el espectro obtenido con $\Delta\lambda=100 nm$ porque el hombro de la derecha que se ve en la figura 24 desaparece y el máximo que aparece a 448nm satura el detector.

-La fluorescencia sincrónica en el caso de la quercetina no es muy adecuada ya que una de las principales características de este tipo de fluorescencia es que se obtienen bandas más estrechas y además se simplifican los espectros de emisión debido a que incrementa la intensidad de los picos más intensos.

La diferencia en la longitud de onda de emisión y excitación es de 212 nm ($\lambda_{em}=580nm$ y $\lambda_{ex}=368nm$) por lo tanto el espectro sincrónico elegido se ha obtenido empleando un $\Delta\lambda=180nm$ (figura 25)

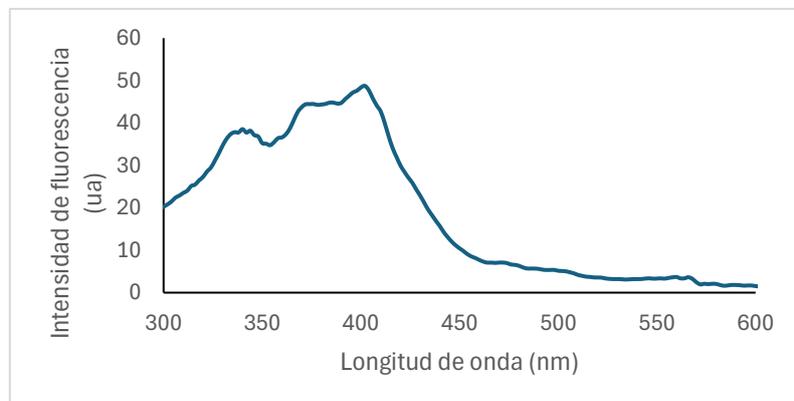


Figura 25. Espectro sincrónico de la quercetina $5,00 \cdot 10^{-6}M$ $\Delta\lambda=180 nm$, paso de banda 10:20nm

En la tabla 6 se resumen las condiciones de medida obtenidas para disoluciones acuosas de vitaminas B₁ (tiamina), B₂ (riboflavina) y el antioxidante quercetina, como longitudes de onda de emisión y excitación, los pasos de banda y los delta sincrónicos más adecuados.

Tabla6: Condiciones de medida en disoluciones acuosas

Condiciones óptimas a pH fisiológico	λ em(nm)	λ ex (nm)	Paso de banda (ex:em)nm	$\Delta\lambda$ (nm)
Riboflavina	525	450 ,368	10:20	160
Quercetina	580	366	10:20	180

6.2. Estudio de mezclas de riboflavina y quercetina: Caracterización espectroscópica y tratamiento de datos mediante calibración multivariante

Una vez realizados los estudios preliminares de las propiedades ópticas de la riboflavina, quercetina y tiamina, para obtener las condiciones óptimas de trabajo, se procedió a realizar un estudio de mezclas de riboflavina y quercetina para su determinación simultánea mediante fluorescencia y posterior tratamiento de datos utilizando la calibración multivariante mínimos cuadros parciales (PLS). Como ya se indicó, se desestimó el empleo de la tiamina, ya que, no se encontró fluorescencia intrínseca en esta sustancia en el rango de pH estudiando. (Véase apartado 6.1.2.1).

Posteriormente las mezclas se analizaron mediante fluorescencia sincrónica y absorbancia.

6.2.1. Caracterización de mezclas: Fluorescencia convencional

Las mezclas de riboflavina y quercetina descritas en el apartado 5.5 se estudiaron mediante espectroscopía de fluorescencia utilizando las condiciones optimizadas para los compuestos individuales. Como se ha descrito a lo largo de los estudios previos realizados, la riboflavina presenta dos longitudes de onda de excitación optimizadas a 368nm y 450nm; y la quercetina presenta una única longitud de onda de excitación a 366nm.

Para el estudio de mezclas, lo ideal hubiera sido que cada compuesto tuviera una longitud de onda de excitación diferente. En este caso, uno de los dos máximos de excitación de la riboflavina (λ_{ex} =368 nm) coincide con el único máximo de excitación de la quercetina (λ_{ex} =366nm), por lo tanto, para obtener el espectro de emisión de las mezclas, se escogieron como longitudes de onda de excitación λ_{ex} =366nm y λ_{ex} =450nm.

A continuación, se muestra una comparación del espectro de emisión de la mezcla de concentración $1,50 \cdot 10^{-7} M$ de riboflavina y $5,00 \cdot 10^{-5} M$ de quercetina con los espectros individuales para estas mismas concentraciones, utilizando en todos los casos un ancho de banda de excitación y emisión de 10 y 20 nm. (Figuras 26 y 27):

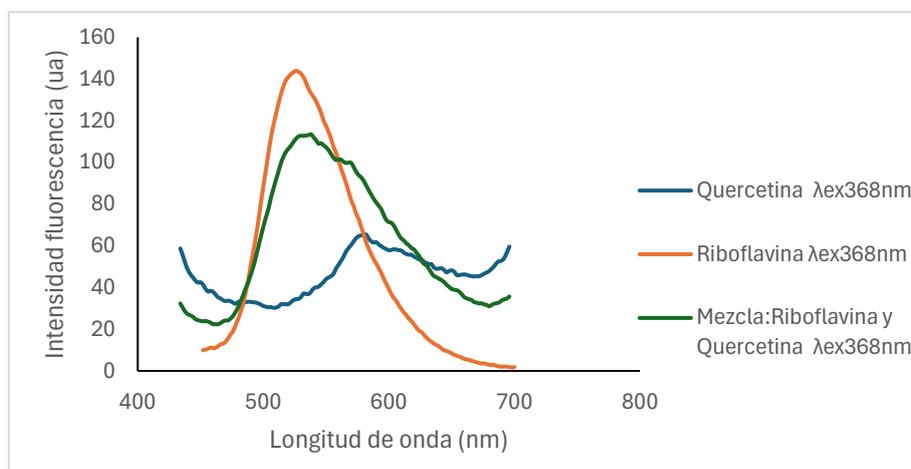


Figura 26. Comparación espectros de emisión ancho de banda ex:em 10:20. Quercetina $5,00 \cdot 10^{-5} M$ $\lambda_{ex}=366 nm$. Riboflavina $1,5 \cdot 10^{-7} M$ $\lambda_{ex}=368 nm$. Mezcla: $1,50 \cdot 10^{-7} M$ Riboflavina y $5,00 \cdot 10^{-5} M$ Quercetina $\lambda_{ex}=366 nm$

Como se puede observar la riboflavina presenta una intensidad de fluorescencia mayor que la quercetina, lo que fue un problema para el estudio de las mezclas. Por este motivo se tuvo que buscar una relación de concentraciones donde ambos compuestos tuvieran señales comparables. Aunque la quercetina está bastante más concentrada ($5,00 \cdot 10^{-5} M$) que la riboflavina, ($1,50 \cdot 10^{-7} M$) esta última sigue presentando una fluorescencia mucho mayor.

La mezcla de riboflavina y quercetina presenta una intensidad de fluorescencia menor que la riboflavina, lo cual demuestra que sus fluorescencias no son aditivas. Si fueran aditivas la fluorescencia de la mezcla debería tener una intensidad aproximada de 209 ua en vez de 113 ua (tabla 7). La mezcla parece provocar un efecto de *quenching*, desactivación de la luminiscencia, por la formación de un complejo entre la riboflavina y la quercetina.

La parte en la que más contribuye cada compuesto está claramente diferenciada en la señal. Además, se produce un desplazamiento del máximo de emisión.

Tabla 7: Comparación intensidad de fluorescencia entre los compuestos individuales y la mezcla

	Intensidad(ua)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Riboflavina	144	526
Quercetina	65	582
Mezcla	113	538

Para $\lambda_{\text{ex}}=455\text{nm}$ únicamente se puede comparar el espectro de emisión de la mezcla y de la riboflavina (figura 27)

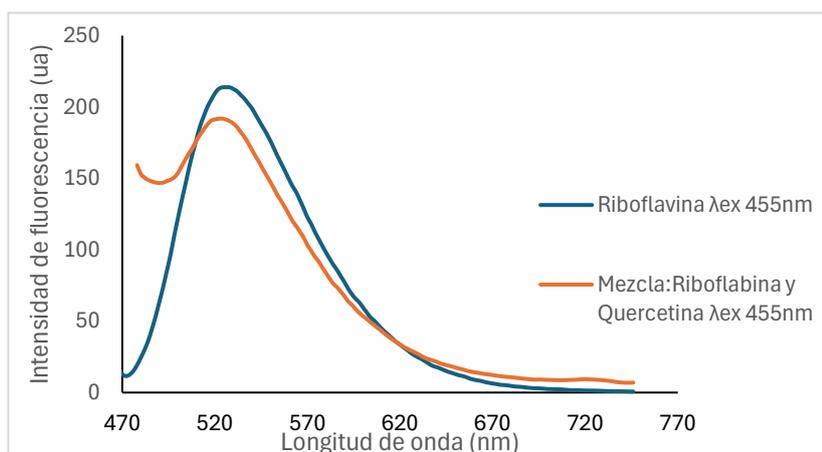


Figura 27 Espectro emisión $\lambda_{\text{ex}}=455\text{ nm}$, paso de banda ex:em 10:20.

Riboflavina $1,50 \cdot 10^{-7}M$. Mezcla: Riboflavina $1,50 \cdot 10^{-7} M$ y Quercetina $5,00 \cdot 10^{-5}M$

Como se puede observar el máximo de emisión de la mezcla y de la riboflavina son prácticamente equivalentes. Al realizar la mezcla de quercetina y riboflavina se produce una disminución de la intensidad de fluorescencia además de un leve desplazamiento del máximo de emisión, esto puede ser debido a una interacción entre la riboflavina y la quercetina, interacción que modifique los niveles de energía.

Tabla 8: Comparación intensidad de fluorescencia entre los compuestos individuales y de la mezcla riboflavina

	Intensidad(au)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)
Riboflavina	213	526
Mezcla	192	521

A continuación, se muestran los espectros de emisión obtenidos para las diferentes mezclas de riboflavina y quercetina ensayadas utilizando $\lambda_{ex}=366nm$ y un ancho de banda de excitación y emisión 10 y 20 respectivamente.

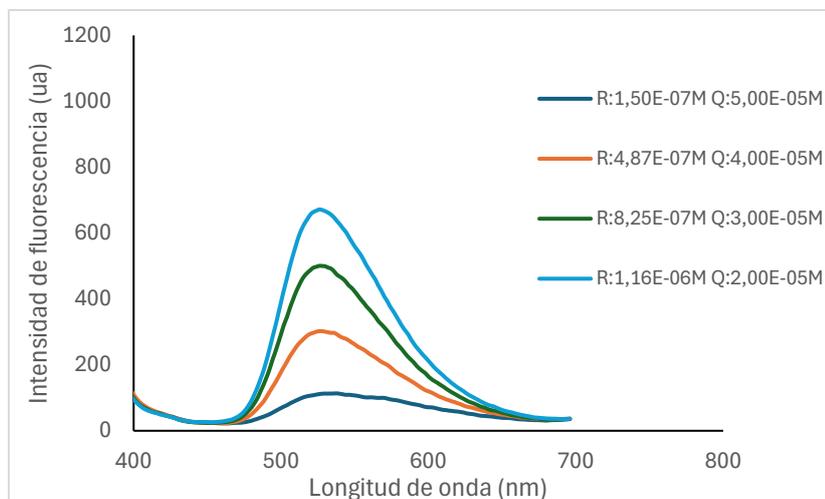


Figura 28: Variación del espectro de emisión de las mezclas $\lambda_{ex}=366nm$ paso de banda ex:em 10:20nm pH=7,4

Como se puede observar la intensidad de fluorescencia aumenta al incrementar la concentración de riboflavina y disminuir la de quercetina. Lo cual es lo esperado ya que la riboflavina presenta una mayor intensidad de fluorescencia.

6.2.2. Calibración multivariante mediante mínimos cuadrados parciales (PLS)

Una vez obtenidos los espectros de emisión de las diferentes mezclas preparadas, se utilizó el programa MATLAB para realizar el tratamiento de datos mediante la calibración multivariante por mínimos cuadrados (PLS)

Para evaluar el funcionamiento del programa se realizó un estudio preliminar empleando espectros de emisión teóricos de distintas mezclas, cuyos máximos aparecerían separados y solapados.

El primer paso para poder utilizar el programa MATLAB consiste en convertir los archivos Excel en documentos de texto. Estos se deben guardar en la misma ubicación que los códigos de PLS que se van a utilizar: pls_cv (para la validación cruzada), pls_cal (para la calibración), y pls_pred (para predecir la muestra desconocida).

Se necesitan 3 archivos de datos:

-Matriz de espectros: en ella se encuentran en columnas los valores de las intensidades que se midieron experimentalmente para cada muestra. Es importante que todas las mezclas tengan el mismo número de datos.

-Vector de concentraciones: en una única columna se escriben las diferentes concentraciones de las mezclas. El número de filas de la matriz de concentración debe coincidir con el número de columnas de la matriz de espectros.

-Matriz problema: contiene los datos del espectro de la muestra desconocida.

Una vez que se tienen los datos en el programa se procede a su tratamiento:

Se realiza una predicción de error suma de cuadrados (PRESS) calculado por validación cruzada, para ello, se separa una mezcla del conjunto de calibración, obteniéndose un conjunto de datos reducido (matriz de espectros) y se predice la mezcla que se había separado (matriz problema). El procedimiento se repite "I" veces, dejando cada vez fuera una mezcla de calibración diferente hasta que se predicen (como mínimo una vez). Esta predicción de error se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$(PRESS) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (C_i - {}^{cv}C_i)^2}{I}} \quad [7]$$

Donde ${}^{cv}c_i$ se corresponde con la concentración predicha de la muestra i del conjunto de muestras utilizando la validación cruzada y c_i se corresponde con la concentración real.

El procedimiento es el siguiente:

- Se construyen los modelos de PLS para cada componente de la mezcla, utilizando "validación cruzada" y para seleccionar el número óptimo de factores, dando lugar a modelos con un menor error de validación. La validación cruzada se lleva a cabo con la matriz de espectros y el vector de concentraciones. El número de componentes a probar tiene que ser menor al número de mezclas. Se escoge un número igual a la mitad más una de las mezclas de calibración. Con el programa se obtienen este tipo de gráficas, donde se representa el error frente al número óptimo de factores:

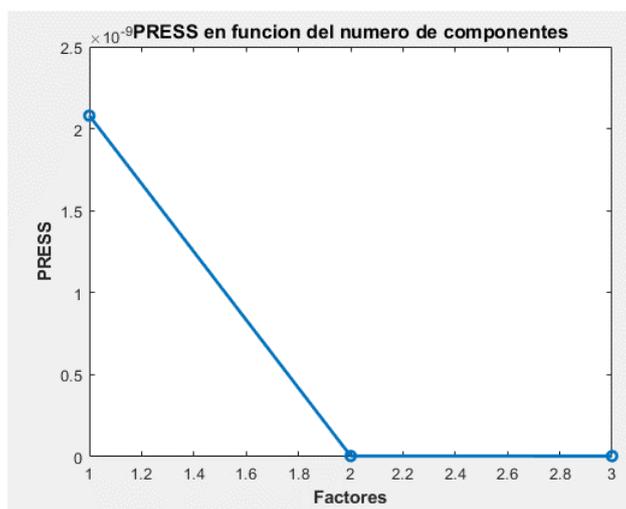


Figura 29. Variación del error con el número de factores

Como se puede observar en la gráfica 29 el error disminuye a medida que aumenta el número de factores, hasta que se estabiliza y no sigue disminuyendo. Este es el valor óptimo.

- El número óptimo de factores se utilizará posteriormente como el número de componentes principales para calibrar. Utilizando la misma matriz de espectros y el vector de concentraciones que para la validación cruzada
- Por último, se puede obtener la concentración de un espectro desconocido utilizando el código pls_pred.

Como se tienen dos componentes en la mezcla para cada concentración se repite el proceso dos veces ya que se tienen dos matrices de concentración, una para cada uno de los componentes de la mezcla.

Las concentraciones de los espectros teóricos separados junto con la concentración de la mezcla problema (mezcla 7) obtenida con el programa se muestran en las tablas siguientes

Tabla 9. Concentración obtenida mediante PLS para los espectros teóricos separados

SEPARADOS	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7
[A] (M)	$2,00 \cdot 10^{-6}$	$4,00 \cdot 10^{-6}$	$6,00 \cdot 10^{-6}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$1,20 \cdot 10^{-5}$	$7,65 \cdot 10^{-6}$
[B] (M)	$1,20 \cdot 10^{-5}$	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$8,00 \cdot 10^{-6}$	$6,00 \cdot 10^{-6}$	$4,00 \cdot 10^{-6}$	$2,0 \cdot 10^{-6}$	$7,93 \cdot 10^{-6}$
						[A] _{cal} (M)	$7,65 \cdot 10^{-6}$
						[B] _{cal} (M)	$7,92 \cdot 10^{-6}$

Tabla 10.: Concentración obtenida mediante PLS para los espectros teóricos solapados

SOLAPADOS	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5	Mezcla 6	Mezcla 7
[A] (M)	$1,00 \cdot 10^{-6}$	$3,00 \cdot 10^{-6}$	$5,00E \cdot 10^{-6}$	$7,00 \cdot 10^{-6}$	$7,00 \cdot 10^{-5}$	$9,00 \cdot 10^{-6}$	$7,70 \cdot 10^{-6}$
[B](M)	$1,00 \cdot 10^{-5}$	$9,00 \cdot 10^{-5}$	$7,00 \cdot 10^{-7}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$5,00 \cdot 10^{-6}$	$3,00 \cdot 10^{-6}$	$1,61 \cdot 10^{-6}$
						[A] _{cal} (M)	$7,69 \cdot 10^{-6}$
						[B] _{cal} (M)	$1,60 \cdot 10^{-6}$

Las concentraciones de los componentes de la mezcla 7, para los espectros solapados y separados, coinciden con las concentraciones calculadas con el programa, por lo tanto, este funciona correctamente.

A continuación, en la tabla 11, se muestran las concentraciones calculadas con el programa MATLAB para los espectros de emisión de las mezclas preparadas de riboflavina y quercetina

Tabla 11. Concentración obtenida para los espectros de emisión de las mezclas de riboflavina y quercetina

Fluorescencia	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4
[R](M)	$1,50 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,25 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$
[Q](M)	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$
[R] _{cal} (M)	$1,32 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,47 \cdot 10^{-7}$	$1,13 \cdot 10^{-6}$
[Q] _{cal} (M)	$4,91 \cdot 10^{-7}$	$4,06 \cdot 10^{-5}$	$2,97 \cdot 10^{-5}$	$1,99 \cdot 10^{-5}$
Error relativo R (%)	12	0	3	3
Error relativo Q (%)	2	1	1	1

El modelo de calibración para cada conjunto de muestras predice bien la muestra que se había separado en todos los casos, menos para la concentración de riboflavina en la mezcla 1 donde se obtiene un error relativo del 12%. posiblemente debido a un error en la preparación de la disolución.

6.2.3. Caracterización de mezclas mediante fluorescencia sincrónica y calibración multivariante PLS

Se realizó la determinación simultanea de riboflavina y quercetina mediante fluorescencia sincrónica utilizando las mismas mezclas que anteriormente se midieron

fluorescencia convencional. En las figuras 30 y 31 se muestran los resultados obtenidos para $\Delta\lambda$ de 100 nm y 180nm, utilizando un ancho de banda de excitación: emisión de 10 y 20nm respectivamente:

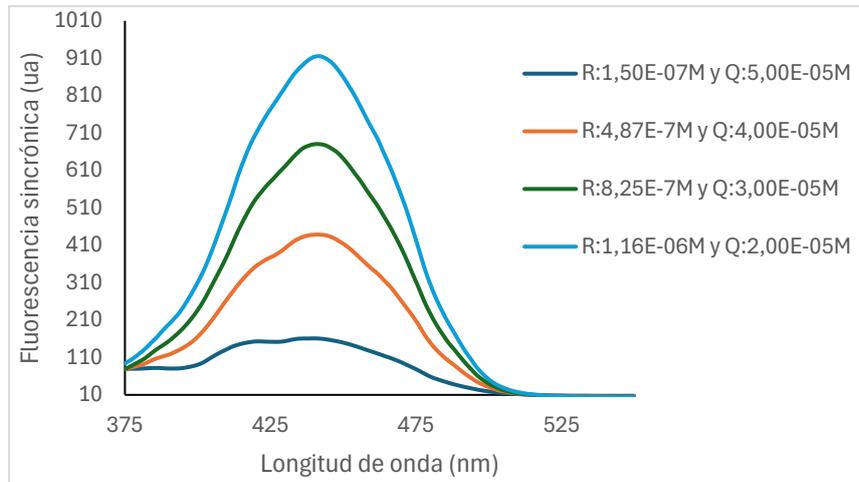


Figura30. Variación del espectro sincrónico de las mezclas $\Delta\lambda=100\text{nm}$, paso de banda ex:em 10:20nm

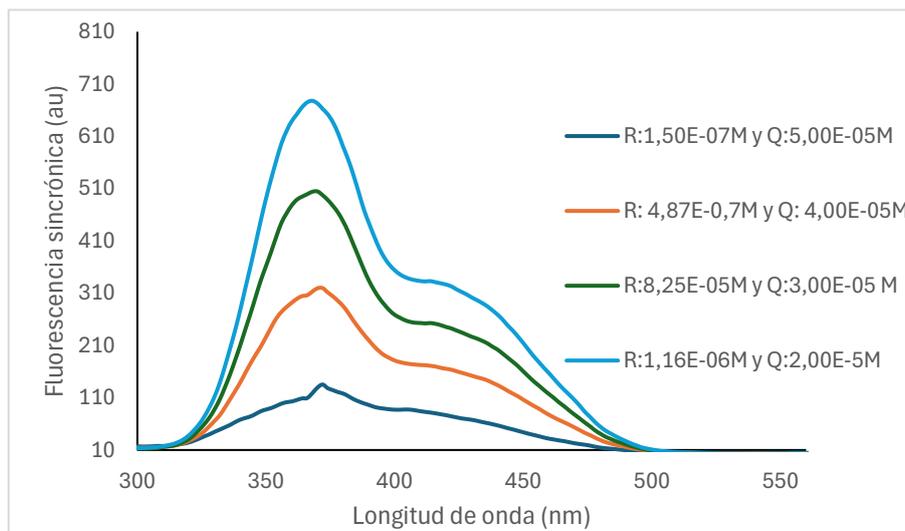


Figura 31. Variación del espectro sincrónico de las mezclas $\Delta\lambda=180\text{nm}$ paso de banda ex:em 10:20nm

Para $\Delta\lambda=100\text{nm}$ presenta más contribución la riboflavina en el espectro sincrónico, mientras que para $\Delta\lambda=180\text{nm}$ se observa tanto la contribución de la quercetina como de la riboflavina. Además, al ir aumentando la concentración de riboflavina y disminuyendo la de quercetina se obtienen bandas más definidas.

Las concentraciones calculadas mediante mínimos cuadrados parciales se muestran en las tablas 12 y 13

Tabla 12: Concentración obtenida para los espectros sincrónicos de las mezclas de riboflavina y quercetina $\Delta\lambda=100$ nm, paso de banda ex:em 10:20nm

Sincrónico	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4
[R](M)	$1,50 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,25 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-7}$
[Q](M)	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$
[R] _{cal} (M)	$9,26 \cdot 10^{-8}$	$5,77 \cdot 10^{-7}$	$8,44 \cdot 10^{-7}$	$1,11 \cdot 10^{-6}$
[Q] _{cal} (M)	$5,32 \cdot 10^{-7}$	$3,91 \cdot 10^{-5}$	$2,48 \cdot 10^{-5}$	$2,89 \cdot 10^{-5}$
Error relativo R (%)	38	18	2	4
Error relativo Q (%)	6	2	17	45

Tabla 13. Concentración obtenida para los espectros sincrónicos de las mezclas de riboflavina y quercetina $\Delta\lambda=180$ nm, paso de banda ex:em 10:20nm

Sincrónico	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4
[R](M)	$1,50 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,25 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$
[Q](M)	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$
[R] _{cal} (M)	$1,17 \cdot 10^{-7}$	$5,53 \cdot 10^{-7}$	$8,52 \cdot 10^{-7}$	$1,11 \cdot 10^{-6}$
[Q] _{cal} (M)	$5,38 \cdot 10^{-5}$	$4,08 \cdot 10^{-5}$	$2,29 \cdot 10^{-5}$	$2,92 \cdot 10^{-5}$
Error relativo R (%)	22	14	3	4
Error relativo Q (%)	8	2	24	46

Como se puede observar se obtienen errores relativos demasiado altos para la fluorescencia sincrónica con $\Delta\lambda=100$ nm y $\Delta\lambda=180$ nm por lo tanto este modelo de predicción no sería valido. Para obtener buenos resultados debería hacerse, en futuros estudios, un método específico para la fluorescencia sincrónica.

6.2.4. Caracterización de mezclas mediante absorbancia y calibración multivariante por PLS

Previamente se midió mediante absorbancia una mezcla de concentración $1,50 \cdot 10^{-5}$ M de riboflavina y $1,50 \cdot 10^{-5}$ M de quercetina y se comparó con los espectros obtenidos individualmente para estos compuestos a la misma concentración $1,50 \cdot 10^{-5}$ M. Los resultados de dicha comparación se muestran en la figura 32.

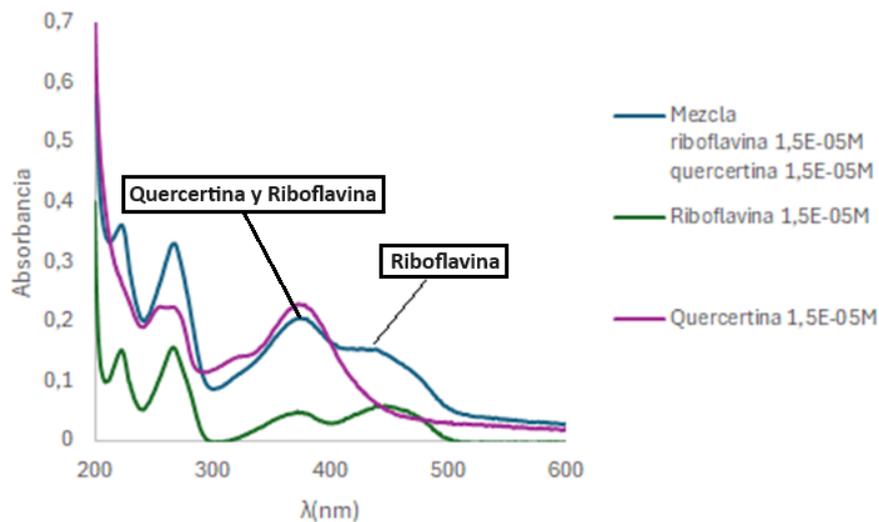


Figura 32. Comparación espectros de absorción de la mezcla y los compuestos individuales

Normalmente la absorción de una mezcla es igual a la suma de las absorciones de los componentes por separado (Ley de Beer para una mezcla binaria) (Cazar et al., 2019).

$$A = \varepsilon_1 \cdot b \cdot c_1 + \varepsilon_2 \cdot b \cdot C_2 \quad [8]$$

Por lo que cabría esperar que el máximo de la absorción de la mezcla a 374 nm tuviera una intensidad mayor que la riboflavina y la quercetina por separado, pero no es así ya que la absorción de la mezcla no es una suma simple sino ponderada, de las absorciones de riboflavina y quercetina. Efecto que se correlaciona con el ya observado en fluorescencia.

Esto es debido a que se produce una transferencia de electrones o hidrógeno desde el flavonoide (quercetina) a la flavina reactiva (riboflavina). La vitamina B₂ induce la dimerización de flavonoides cuando las disoluciones acuosas se exponen a luz Uv-Vis (Huvaere et al., 2012).

También se ve claramente diferenciado qué parte de los máximos de la mezcla se corresponden con los máximos de los componentes individuales:

- Para el espectro de la mezcla (trazo azul de la figura 32) el máximo de 374 nm está constituido por una contribución de riboflavina y quercetina, con los factores de ponderación de 0,7 para la quercetina y 0,9 para la riboflavina, siendo mayor la contribución de quercetina debido a su mayor absorción a pesar del menor peso de su contribución a la mezcla.
- El máximo de 425 nm de la mezcla es prácticamente una contribución única de la absorción de la riboflavina, que presenta aquí un máximo.

- El máximo de 254nm no se tuvo en cuenta porque los máximos de absorbancia de la vitamina B₂ debidas al anillo de flavina, que es el que les confiere el color amarillo a las disoluciones, aparecen a 372 nm y 445nm.

-Posteriormente se hizo un estudio para la determinación simultánea de las concentraciones de riboflavina y quercetina utilizando las mismas muestras que se habían preparado para el estudio de la fluorescencia. En la figura 33 se muestran los espectros de absorbancia obtenidos. Las concentraciones calculadas mediante el programa MATLAB se muestran en la tabla 14.

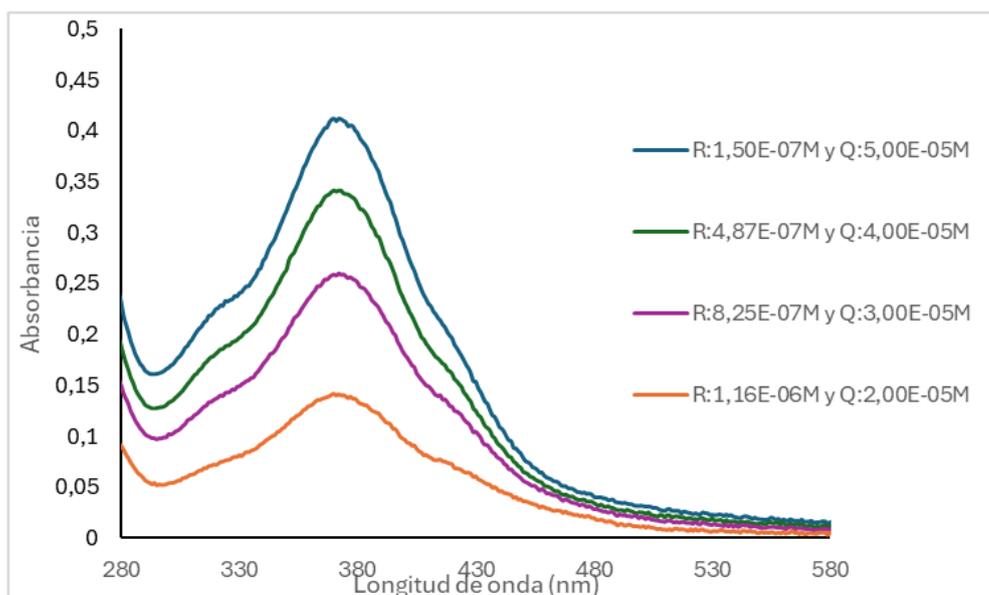


Figura 33. Variación del espectro de absorbancia de las mezclas

Tabla 14: Concentración obtenida para los espectros de absorbancia para las mezclas de riboflavina y quercetina

Absorbancia	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4
[R](M)	$1,50 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,25 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$
[Q](M)	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$
[R] _{cal} (M)	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$3,85 \cdot 10^{-7}$	$6,79 \cdot 10^{-7}$	$9,13 \cdot 10^{-7}$
[Q] _{cal} (M)	$4,31 \cdot 10^{-5}$	$3,70 \cdot 10^{-5}$	$2,91 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$
Error relativo R(%)	23	21	18	21
Error relativo Q (%)	14	8	3	50

Los errores obtenidos son demasiado altos, esto es debido a que las disoluciones medidas están demasiado diluidas, obteniéndose unas bandas de absorbancia con una intensidad muy baja. Esto se debe a que la relación de concentraciones entre la

riboflavina y la quercetina se optimizó para tener una buena señal de fluorescencia para ambos compuestos en las mezclas, no para estudios de mezclas por absorbancia.

El estudio de mezclas por absorbancia fue un estudio inicial para ver como de válido era el método. En futuros estudios se debería utilizar unas mezclas con una relación de concentraciones adecuado para obtener unas bandas de absorbancia con mayor intensidad.

6.3. Aplicabilidad del método a muestras reales:

El método optimizado, para la fluorescencia convencional, se aplicó a muestras de refresco *Aquarius* para estudiar si hay efecto matriz, comparando los espectros de emisión de las mezclas en agua con los espectros obtenidos en el refresco. Este refresco no reporta en su composición ninguno de los analitos modelos. Por lo cual, en principio la concentración indicada de los mismos es la correspondiente al enriquecimiento realizado.

En la figura 34 se observa la comparación de los espectros obtenidos para la mezcla de concentración $1,50 \cdot 10^{-7}M$ de riboflavina y $5,00 \cdot 10^{-5}M$ de quercetina

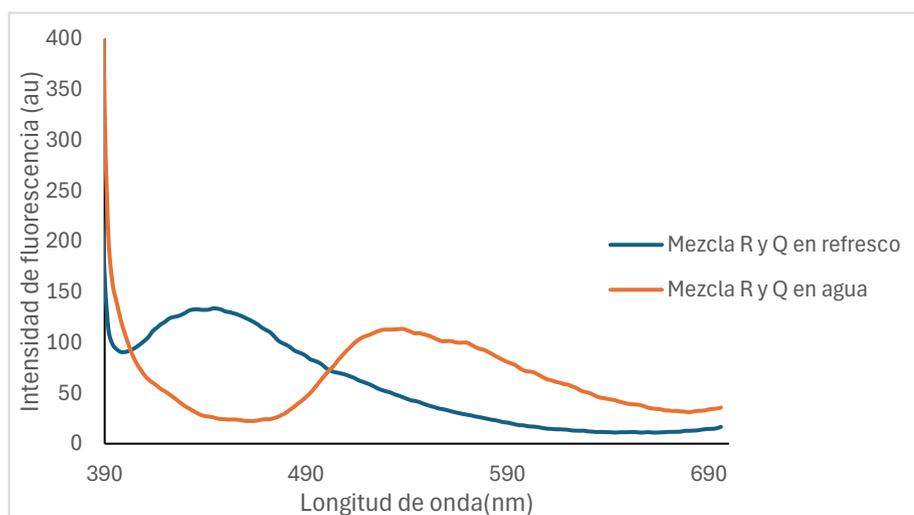


Figura 34: Comparación espectros emisión Mezclas: $1,50 \cdot 10^{-7}M$ riboflavina y $5,00 \cdot 10^{-5}M$ quercetina $\lambda_{ex}=366 \text{ nm}$. Paso de banda ex:em 10:20nm

Como se puede ver, el máximo de emisión se desplaza para la muestra de refresco. Esto puede ser debido a la interacción de la quercetina y riboflavina con los componentes fluorescentes del refresco, que modifican sus niveles de energía.

Este desplazamiento y aumento en la intensidad de fluorescencia puede indicar que hay efecto matriz, es decir, un aumento o disminución de la señal del analito debido a la presencia de otros componentes presentes en la muestra (Miller & Miller., 2002).

Se podrían realizar futuros estudios utilizando el método de adiciones estándar, que es el utilizado para estos casos.

Para la longitud de onda de 455nm se obtienen los siguientes espectros de emisión

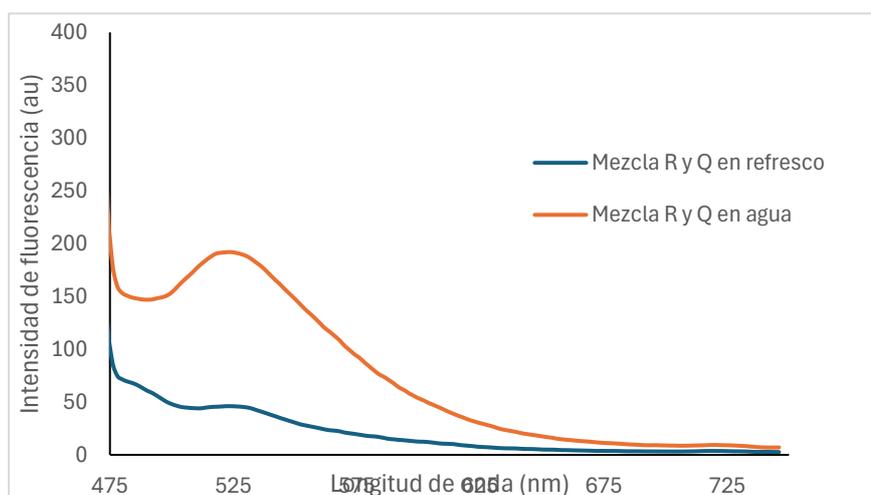


Figura 35: Comparación espectros de emisión $\lambda=455\text{nm}$. Paso de banda ex:em 10:20 nm. Mezclas: riboflavina $1,50 \cdot 10^{-7}\text{M}$ y quercetina $5,00 \cdot 10^{-5}\text{M}$

En este caso no se produce un desplazamiento del máximo de emisión, pero se observa una disminución significativa en la señal de fluorescencia debida a una interacción de la mezcla con los componentes del refresco.

6.3.1. Calibración multivariante mediante PLS

En la muestra de refresco la señal de fluorescencia no sigue el comportamiento esperado, ya que, a medida que aumenta la concentración de riboflavina y disminuye la de quercetina, la señal de fluorescencia disminuye (figura 36). Al contrario de lo que pasaba en la calibración en agua (figura 28) apartado 6.2.1

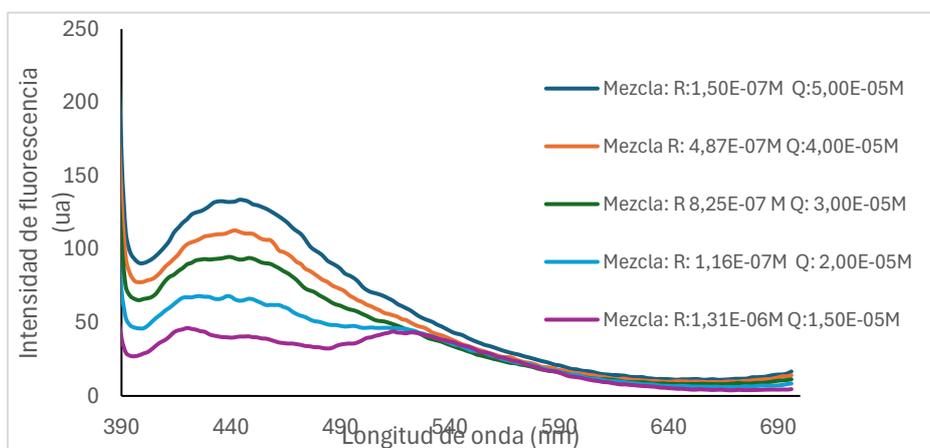


Figura 36.: Espectros de emisión mezclas riboflavina-quercetina en refresco $\lambda=366\text{ nm}$. Paso de banda ex:em 10:20

Además, a medida que aumenta la concentración de riboflavina en la mezcla el máximo se desplaza. (figura 36)

En la tabla 15 se muestra una comparación entre concentraciones experimentales y calculadas mediante mínimos cuadrados parciales.

Tabla 15: Concentraciones calculadas mediante PLS mezcla riboflavina-quercetina en refresco

Fluorescencia	Mezcla 1	Mezcla 2	Mezcla 3	Mezcla 4	Mezcla 5
[R](M)	$1,50 \cdot 10^{-7}$	$4,87 \cdot 10^{-7}$	$8,25 \cdot 10^{-7}$	$1,16 \cdot 10^{-6}$	$1,31 \cdot 10^{-6}$
[Q](M)	$5,00 \cdot 10^{-5}$	$4,00 \cdot 10^{-5}$	$3,00 \cdot 10^{-5}$	$2,00 \cdot 10^{-5}$	$1,50 \cdot 10^{-5}$
[R] _{cal} (M)	$4,54 \cdot 10^{-7}$	$3,19 \cdot 10^{-7}$	$6,43 \cdot 10^{-7}$	$1,57 \cdot 10^{-6}$	$8,43 \cdot 10^{-7}$
[Q] _{cal} (M)	$4,28 \cdot 10^{-5}$	$4,05 \cdot 10^{-5}$	$3,36 \cdot 10^{-5}$	$1,95 \cdot 10^{-5}$	$9,49 \cdot 10^{-6}$
Error relativo R(%)	203	34	22	35	36
Error relativo Q(%)	14	1	12	3	37

Como se puede ver, al aplicar el calibrado a muestras de refresco no se obtienen buenos resultados ya que las concentraciones de riboflavina teóricas son muy diferentes a las calculadas con el programa.

Es necesario realizar ensayos futuros encaminados a reducir las interferencias debidas a la matriz.

7. CONCLUSIONES

De los resultados alcanzados en el presente TFM se puede concluir que se consiguió establecer un procedimiento para la determinación simultánea de riboflavina y quercetina mediante fluorescencia.

Mediante métodos quimiométricos como la calibración multivariante por mínimos cuadrados parciales se ha conseguido crear un modelo para la cuantificación de la quercetina y la vitamina B₂ de manera rápida sin necesidad de separación previa en mezclas sintéticas.

La metodología propuesta se aplicó a muestras de *Aquarius* que habían sido fortificadas con riboflavina y quercetina, encontrándose un comportamiento espectroscópico diferente de las mismas cuando se lleva a cabo el análisis en agua y en muestras de refresco por fluorescencia.

Los modelos obtenidos para la muestra de refresco presentan errores de predicción elevados.

En conclusión, se ha establecido un método rápido, para la determinación de riboflavina y quercetina en muestras de refresco si bien se considera necesario realizar ensayos futuros encaminados a reducir las interferencias debidas a la matriz para mejorar la sensibilidad de la metodología propuesta.

8. BIBLIOGRAFIA

- Aghababaei, F., & Hadidi, M. (2023). Recent Advances in Potential Health Benefits of Quercetin. *Pharmaceuticals*, 16(7),10-20.
- Barbieri, D., Gabriele, M., Summa, M., Colosimo, R., Leonardi, D., Domenici, V., & Pucci, L. (2020). Antioxidant, nutraceutical properties, and fluorescence spectral profiles of bee pollen samples from different botanical origins. *Antioxidants*, 9(10),1–17.
- Bartzatt, R., & Wol, T. (2014). Detection and Assay of Vitamin B-2 (Riboflavin) in Alkaline Borate Buffer with UV/Visible Spectrophotometry. *International Scholarly Research Notices*,2014, pp 7.
- Beltran, J. L., Ferrer, R., & Guiteras, J. (1998). Multivariate calibration of polycyclic aromatic hydrocarbon mixtures from excitation-emission fuorescence. *Analytica Chimica Acta*, 373, 311-319.
- Brereton R. G (2000).Introduccion to multivariate calibration.*Analytical Chemistry, Analyst* 125,2125-2514.
- Britton N.L., Riter.L.K., Smallidge.R.L (2003). Reversed-Phase Liquid Chromatographic Determination of Riboflavin in Feeds. *Journal of AOAC International*, 86(2),197-201.
- Cazar, R., Medina, C., Bravo, W., & Sánchez, V. (2019). Análisis cuantitativo de una mezcla binaria a partir de datos espectrofotométricos UV usando un método alternativo. *Maskana*, 10(2), 89–92.
- Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (2012). Condiciones de uso de determinadas sustancias distintas de vitaminas, minerales y plantas para ser empleadas en complementos alimenticios. *Revista del comité científico nº 17*.

- Directiva 2002/46/CE, de 10 de junio de 2002, relativa a la aproximación de las legislaciones de los Estados Miembros en materia de complementos alimenticios. *Diario Oficial de Comunidades Europeas* 183 pp 51-57.
- Díaz Macarena. (Julio 2016). Encapsulación de antioxidantes en nanopartículas de Zeína, TFM, Universidad de Oviedo.
- Drosseler P. (2002). pH dependence of the absorption and emission behaviour of riboflavin in aqueous solution. *Chemical Physics*, 282, 429-439.
- Fernández, W. O., Aguilera, Y., Rodríguez, M.E., Mayancha D.M.G; Salinas, M.H, C., Sánchez, L.R.W (2016). Desarrollo y Validación de Técnicas Espectrofotométricas para la Determinación de Flavonoides Totales, Basada en Quercetina, en las Hojas de *Psidium guajava* L. *Revista Amazónica Ciencia y Tecnología*, 5 (3), 276-288.
- Giménez Serrano Salvador (2002). Vitaminas Componentes Esenciales. *Farmacia Profesional* 16(6), 62-67
- Guiteras, J. Ferrer, R., Beltrán, J. L., (1998). Multivariate calibration applied to synchronous fluorescence spectrometry. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Analytical Chimica Acta*, 373, 311-319.
- Harris, Daniel C. (2001). *Análisis Químico Cuantitativo*, Editorial Reverte, SA
- Hassanin, H. A. (2022). Investigation on the interaction of riboflavin with aquacobalamin (Vitamin B12): A fluorescence quenching study. *Journal of Photochemistry and Photobiology . Chemistry*, 430 (113), 968-977.
- Hrubša, M., Siatka, T., Nejmanová, I., Vopršalová, M., Krčmová, L. K., Matoušová, K., Javorská, L., Macáková, K., Mercolini, L., Remião, F., Mát'uš, M., & Mladěnka, P. (2022). Biological Properties of Vitamins of the B-Complex, Part 1: Vitamins B1, B2, B3, and B5. *Nutrients*, 14 (3), 400-484.
- Huvaere, K., Sinnaeve, B., Van Bocxlaer, J., & Skibsted, L. H. (2012). Flavonoid deactivation of excited state flavins: Reaction monitoring by mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(36), 9261–9272
- Jiménez Ana María (2007). Aplicaciones Analíticas en luminiscencia molecular en combinación con metodologías dinámicas, Tesis Doctoral. Universidad de Extremadura.
- Joye, I. J., Davidov-Pardo, G., Ludescher, R. D., & McClements, D. J. (2015). Fluorescence quenching study of resveratrol binding to zein and gliadin: Towards a more rational

- approach to resveratrol encapsulation using water-insoluble proteins. *Food Chemistry*, 185, 261–267.
- Khalkho, B. R., Kurrey, R., Deb, M. K., Shrivastava, K., Thakur, S. S., Pervez, S., & Jain, V. K. (2020). L-cysteine modified silver nanoparticles for selective and sensitive colorimetric detection of vitamin B1 in food and water samples. *Heliyon*, 6(2),416-423.
- Lesniewicz, A., Grzesiak, M., Zyrnicki, W., Borkowska-Burnecka, J. (2015). Mineral composition and nutritive value of isotonic and energy drinks. *Journal of Food Composition and Analysis*, 170(2),485-95
- Li, Y., Yao, J., Han, C., Yang, J., Chaudhry, M. T., Wang, S., Liu, H., & Yin, Y. (2016). Quercetin, inflammation and immunity. *Nutrients* 8 (3),167-181.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2002). *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*, Madrid:Pearson Educación,S.A
- Mosegaard, S., Dipace, G., Bross, P., Carlsen, J., Gregersen, N., & Olsen, R. K. J. (2020). Riboflavin deficiency—implications for general human health and inborn errors of metabolism. *International Journal of Molecular Sciences* 21 (11),3847-3873.
- Murphy K.R., Stedmon.C.A., Graeber.D., Bro.R (2013).Fluorescence spectroscopy and multi-way techniques. PARAFAC.*Anal.Methods* 23(5),6557-6566.
- Office of Dietary supplements. (2022) Strengthening Knowledge and Understanding of Dietary Supplement.
- Patel, A. R., Heussen, P. C. M., Hazekamp, J., Drost, E., & Velikov, K. P. (2012). Quercetin loaded biopolymeric colloidal particles prepared by simultaneous precipitation of quercetin with hydrophobic protein in aqueous medium. *Food Chemistry*, 133(2), 423–429.
- Posada Adrian (Julio 2018). Vitaminas B1 y B2 en suplementos alimenticios:Determinación espectroscópica mediante el uso de nanopartículas y clústeres de oro,TFM, Universidad de Oviedo.
- Sengupta, B., & Sengupta, P. K. (2002). The interaction of quercetin with human serum albumin: a fluorescence spectroscopic study. In *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299,400-403
- Sikorska, E., Gliszczyńska-Świgło, A., Insińska-Rak, M., Khmelinskii, I., De Keukeleire, D., & Sikorski, M. (2008). Simultaneous analysis of riboflavin and aromatic amino acids in beer using fluorescence and multivariate calibration methods. *Analytica Chimica Acta*, 613(2), 207–217

Skoog, West, Holler y Crouch. *Fundamentos de química analítica* Ed Thonson 9º edición.

Suplementos nutricionales quercetina y riboflavina. Disponible en:

<https://www.cienporciennatural.com/productos/permeavit>

Suplemento nutricional Quercetin Plus. Disponible en:

<https://www.naturahealthproducts.com/content/product-pdf/QuercetinPlusPS.pdf>

Tylicki, A., Lotowski, Z., Siemieniuk, M., & Ratkiewicz, A. (2018). Thiamine and selected thiamine antivitamin — biological activity and methods of synthesis. *Bioscience Reports* 38(1), 1148-1171.

Valverde-Som, L., Arce, M. M., Sarabia, L. A., & Ortiz, M. C. (2023). Analytical quality by design using a D-optimal design and parallel factor analysis in an automatic solid phase extraction system coupled to liquid chromatography. Determination of nine PAHs in coffee samples. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 243(15), 8-23.

Vicente-Vicente, L., Prieto, M., Morales, A. (2013). Eficacia y seguridad de la quercetina como complemento alimenticio. *Revista de Toxicología*, 30(2), 171-181.

Yang, H., Xiao, X., Song ZHAO, X., Feng XUE, X., & Song, J. Y. (2016). Study on Fluorescence Spectra of Thiamine and Riboflavin. *MATEC Web Conferences* 63, pp 7

Zanetti-Polzi, L., Aschi, M., Daidone, I., & Amadei, A. (2017). Theoretical modeling of the absorption spectrum of aqueous riboflavin. *Chemical Physics Letters*, 669, 19–28.

Zhang, X., Fales, A., & Vo-Dinh, T. (2015). Time-resolved synchronous fluorescence for biomedical. *Sensors (Switzerland)*, 15(9), 21746–21759.

Zhang, Y., Zhou, W. E., Yan, J. Q., Liu, M., Zhou, Y., Shen, X., Ma, Y. L., Feng, X. S., Yang, J., & Li, G. H. (2018). A review of the extraction and determination methods of thirteen essential vitamins to the human body: An update from 2010. *Molecules* ,23(6),1484-1509.

Zia, H., Fischbach, N., Hofsommer, M., & Slatnar, A. (2023). Development and validation of HPLC-MS/MS method for simultaneous analysis of B vitamins present naturally or after fortification in fruit juices. *Food Science and Technology* 184,103-112.