



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

Trabajo Fin de Grado

Grado en Química

**DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DERIVADOS
DEL PROCESADO DE ALIMENTOS**

Autora: Paula Carnicero Balbís

Tutores: Dr. Luis Debán Miguel y Dra. M^a Isabel Campos Labadie
Departamento de Química Analítica

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| ABSTRACT | 1 |
| INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| OBJETIVOS..... | 3 |
| PARTE I: ACRILAMIDA | 4 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 4 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 9 |
| 3. TÉCNICAS UTILIZADAS | 10 |
| 3.1. CROMATOGRAFÍA | 10 |
| 3.2. TÉCNICAS ESPECTROSCÓPICAS | 11 |
| 3.3. MÉTODOS PARA LA EXTRACCIÓN DE ACRILAMIDA | 11 |
| 4. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS..... | 13 |
| 4.1. ESTUDIO EN PATRONES DE ACRILAMIDA. | 13 |
| 4.1.1. Preparación de patrones de Acrilamida. | 13 |
| 4.1.2. Análisis por CG-FID de patrones de acrilamida. | 13 |
| 4.1.3. Análisis por HPLC-UV/Vis de patrones de acrilamida. | 17 |
| 4.1.4. Análisis por espectroscopía Raman de acrilamida..... | 27 |
| 4.2. EXTRACCIÓN DE ACRILAMIDA | 29 |
| 4.2.1. Preparación de las muestras | 29 |
| 4.2.2. Extracción procedimiento Carrez..... | 29 |
| 4.2.3. Extracción con baño María. | 30 |
| 4.2.4. Extracción con Soxhlet. | 31 |
| 4.3. DETERMINACIÓN POR HPLC- UV/VIS DE AA EN MUESTRAS | 32 |
| 4.3.1. Muestras extraídas por procedimiento Carrez | 32 |
| 4.3.2. Muestras extraídas con Baño María..... | 35 |
| 4.3.3. Muestras extraídas mediante Soxhlet..... | 40 |
| 4.3.4. Determinación de muestras por espectroscopia Raman..... | 41 |
| 5. CONCLUSIONES | 43 |

| | |
|---|----|
| PARTE II. ACEITES ESENCIALES | 44 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 44 |
| 2. MATERIALES Y MÉTODOS | 47 |
| 3. TÉCNICAS UTILIZADAS | 48 |
| 3.1. TÉCNICAS DE SEPARACIÓN Y DETECCIÓN. | 48 |
| 3.2. MÉTODOS DE EXTRACCIÓN | 48 |
| 4. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS..... | 50 |
| 4.1. ESTUDIO EN PATRONES DE α -TERPINEOL..... | 50 |
| 4.1.1. Preparación de patrones. | 50 |
| 4.1.2. Análisis por GC-FID de patrones de α -Terpineol en hexano. | 50 |
| 4.1.3. Análisis por HPLC-UV/Vis de patrones α - Terpineol en metanol. | 52 |
| 4.2. EXTRACCIÓN DEL ACEITE ESENCIAL..... | 56 |
| 4.2.1. Extracción mediante Soxhlet. | 57 |
| 4.2.2. Extracción mediante destilación por arrastre con vapor. | 58 |
| 4.3. DETERMINACIÓN DE LAS MUESTRAS POR CROMATOGRAFÍA..... | 59 |
| 4.3.1. Análisis por GC-FID de α -Terpineol en muestras. | 59 |
| 4.3.2. Análisis por HPLC-UV/Vis de α -Terpineol en muestras. | 61 |
| 5. CONCLUSIONES | 65 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 66 |
| ABREVIATURAS | 68 |
| ANEXOS..... | 69 |

RESUMEN

Se realiza, en la primera parte del trabajo, un estudio para la determinación de acrilamida en muestras, previa extracción con diferentes procedimientos: baño maría, Soxhlet y procedimiento Carrez. El estudio se lleva a cabo mediante diferentes técnicas: cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID), cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con detector UV/Vis y espectroscopía Raman.

En la segunda parte se lleva a cabo la extracción del aceite esencial (AE) en cáscara de naranja y en vaina de pistacho mediante los métodos de arrastre con vapor de agua, hidrodestilación y extracción Soxhlet. Se procedió a la identificación de uno de los compuestos en los extractos obtenidos, α -terpineol, mediante cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) y cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con detector UV/Vis.

ABSTRACT

A study for the determination of acrylamide in samples is carried out in the first part of the project, previous extraction with different procedures: water bath, soxhlet and extraction with Carrez reagent. The study is carried out using different techniques, gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID), high-performance liquid chromatography (HPLC) with UV / Vis detector and Raman spectroscopy.

In the second part is carried out the extraction of essential oils (EO) in orange peel and pistachio hulls by means of steam distillation, hydrodistillation and solvent extraction methods (Soxhlet). It proceeded to the identification of one of the compounds in the obtained extracts, α -terpineol, by gas chromatography (GC) with flame ionization detector (FID) an high performance liquid chromatography (HPLC) with UV / Vis detector.

INTRODUCCIÓN GENERAL

En el presente trabajo se lleva a cabo el estudio de diferentes compuestos vinculados al sector de la alimentación. En él se plantean dos vías, una relacionada con compuestos que pueden tener características nocivas para el ser humano y que pueden formarse durante el tratamiento de la materia prima y otra con los compuestos que se pueden obtener de los desechos derivados del procesado de algunos alimentos, como frutas y frutos secos.

Dentro de estas dos vertientes, nos centraremos en el primer caso, en el estudio de acrilamida, la cual puede formarse en una gran cantidad de alimentos, como: bollería, café, pan, patatas fritas.... En el segundo, nos planteamos, la extracción y determinación de alguno de los compuestos presentes en el aceite esencial de la vaina del pistacho, y de la cáscara de la naranja.

OBJETIVOS

Se pueden destacar dos propósitos principales en la realización de este trabajo, relacionados con las dos líneas que se llevan a cabo a lo largo del mismo.

- 1- Realizar un estudio para la determinación de acrilamida [C_3H_5NO] por Cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID), Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector UV/Vis y espectroscopia RAMAN, en distintos tipos de muestras, previa extracción por diferentes procedimientos.
- 2- Llevar a cabo diferentes métodos de extracción del aceite esencial de la vaina de pistacho y de la cáscara de naranja y una vez extraído, hacer un estudio para la determinación de α -terpineol [$C_{10}H_{18}O$], por cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) y cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detector UV/Vis.

PARTE I: ACRILAMIDA

1. Introducción

La acrilamida es un compuesto orgánico de tipo amida, también conocido como etilcarboxamina, vinilamida o 2-propanamida. Es un compuesto de bajo peso molecular (71g/mol), muy hidrosoluble, que se presenta en forma de cristales blancos y carece de aroma. La estructura de la acrilamida, molécula muy polar, se muestra en la Figura 1, tiene un doble enlace reactivo deficiente de electrones y un grupo amida.

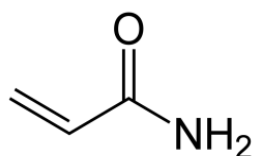


Figura 1. Estructura química de la Acrilamida

Tabla 1. Características químicas y físicas de Acrilamida

| DATOS QUÍMICOS | | |
|--|----------------------------------|-------------------|
| Fórmula química | C ₃ H ₅ NO | |
| Peso molecular | 71,08 g/mol | |
| DATOS FÍSICOS | | |
| Aspecto físico | Sólido blanco | |
| Densidad | 1,27 g/cm ³ | |
| Punto de fusión | 84,5°C | |
| Punto ebullición | 125°C | |
| Solubilidad | Disolvente | g L ⁻¹ |
| | Agua | 2040 |
| | Metanol | 1550 |
| Cancerígeno, mutagénico, tóxico irritante, sensibilizante. | | |

La acrilamida es un intermediario químico usado en la síntesis de poliacrilamidas. Tiene un amplio número de aplicaciones industriales, sus principales usos son como floculante de agua y en la fabricación de papel. Otras de las aplicaciones se encuentran en el procesado de petróleo, minerales, textiles, lentes de contacto, en la industria de los cosméticos como aditivo, plásticos o adhesivos.

Hasta 2002 se creía que la principal vía de exposición humana a la acrilamida era el agua y los cigarrillos. Sin embargo, en Abril de ese mismo año la Administración Nacional de Alimentos de Suecia (NFA) junto con la universidad de Estocolmo informan de los niveles de acrilamida (del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$) encontrados en diversos tipos de alimentos ricos en almidón cuando son sometidos a altas temperaturas [1]. Surge la necesidad de controlar dicha sustancia pues la acrilamida está clasificada, desde 1994, por la Agencia internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como probable carcinogénico en humanos con actividad genotóxica [2] (1)

La comisión Europea publicó en 2003 recomendaciones dirigidas a las industrias alimentarias para reducir o eliminar este compuesto. Además en colaboración con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA), se creó una base de datos de acrilamida que incluye las investigaciones desarrolladas e información sobre los grupos de alimentos. (2)

La normativa más reciente es el reglamento (UE) 2017/2158 de la comisión de 20 de noviembre de 2017 por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en alimentos y que entró en vigor en Abril de 2018.

A nivel internacional evaluaciones llevadas a cabo por el comité mixto FAO/OMS de Experto en Aditivos Alimentarios (JECFE) han concluido que son necesarias más investigaciones para establecer una ingesta diaria tolerable (IDT) de acrilamida en alimentos. (3)

Los niveles de acrilamida encontrados en alimentos han llegado a ser del orden de partes por millón, y se estima una ingesta diaria a través de la comida entre 0,4 – 0,6 $\mu\text{g/Kg}$ de peso corporal. Como simple comparación, la Organización Mundial de la Salud limita el contenido de acrilamida en agua potable en 0,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ aunque en Europa, la recomendación se fijó en 0,1 $\mu\text{g L}^{-1}$ siendo este el único valor legislado hasta el momento, en España, en el agua potable de consumo y envasada, según los Reales Decretos 140/2003 (BOE, 2003) y 1799/2010 (BOE, 2010).

Efectos de la Acrilamida.

A pesar de que se ha demostrado que la vía principal de exposición es el humo del tabaco, la vía más rápida de absorción es la oral debido a su elevada solubilidad en agua de manera que ingerida se absorbe y distribuye más rápidamente.

En cuanto a sus efectos, se ha comprobado que en ensayos de laboratorio sobre ratas provoca genotoxicidad, es decir, tiene la capacidad de inducir daño hereditario a nivel genético y cromosómico. También se ha comprobado su potencial para generar carcinogenicidad y neurotoxicidad en estos animales. [3]

En el organismo, en humanos, se considera que la acrilamida se metaboliza principalmente a glicidamida, metabolito muy reactivo formado tras la epoxidación del doble enlace, *Figura 2*. Ambos compuestos tienen efectos genotóxicos pero la formación de la glicidamida es considerada como el paso crítico ya que reacciona rápidamente con macromoléculas como hemoglobina o enzimas formando aductos y con el ADN, generando mutaciones y provocando cáncer, teniendo especial afinidad por el sistema nervioso. [4]

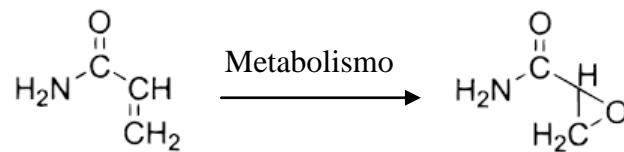


Figura 2. Metabolismo de la Acrilamida en el organismo.

Formación de Acrilamida.

La Acrilamida se forma durante el procesado de algunos alimentos ricos en almidón y carbohidratos a temperaturas superiores 120 grados y con baja humedad, *Figura 3*. La formación se atribuye principalmente a la reacción de Maillard. Esta se da en ciertos aminoácidos, generalmente la asparagina, con los azúcares reductores (glucosa y, fructosa principalmente). Otros aminoácidos como: alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina pueden también producir bajas cantidades de acrilamida. La formación depende principalmente de los citados precursores (composición química de las materias primas), así como del tiempo, temperatura y humedad.

Aparentemente esta reacción se manifiesta confiriéndole a los alimentos un cierto pardeamiento y además alterando su sabor y olor.

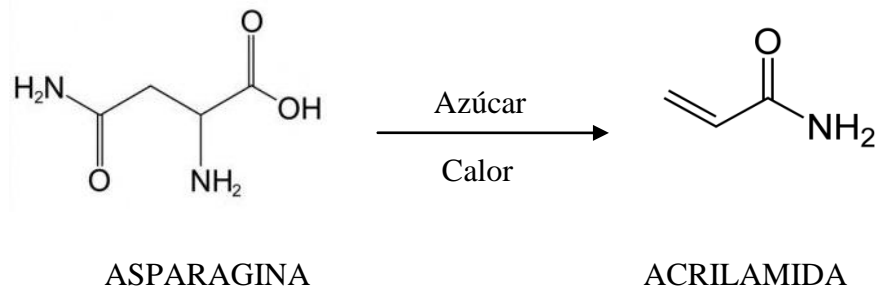


Figura 3. Reacción de Maillard simplificada.

En la Figura 4 se presentan las reacciones principales que tienen lugar en la formación de acrilamida. La reacción se da por una vía que involucra una base de Schiff como molécula precursora resultante de la reacción entre el aminoácido (asparagina libre) y el azúcar reductor (compuesto carbonílico). Según las investigaciones, la reacción continúa con una descarboxilación y degradación posterior de la base de Schiff, la cual se produce por una rotura en un puente entre carbono y nitrógeno que puede darse por dos mecanismos principales. Por un lado, puede ocurrir la eliminación de una imina de la base de Schiff descarboxilada, dando como resultado acrilamida. La otra vía posible consiste en una hidrólisis de la base de Schiff descarboxilada, para formar un compuesto carbonílico y además un precursor denominado 3-aminopropioamida, que puede perder una molécula de amoníaco para formar acrilamida [5].

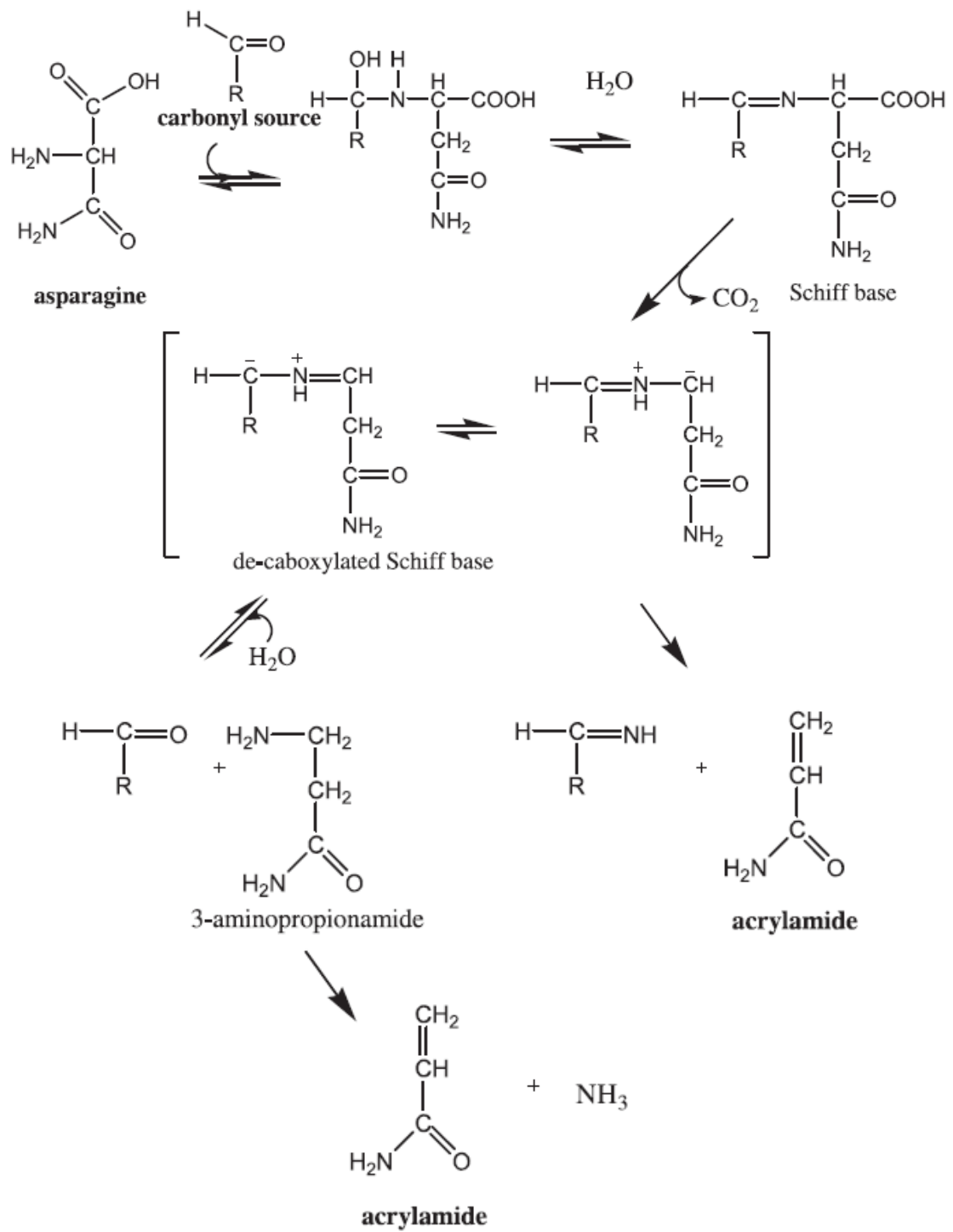


Figura 4. Mecanismo de formación de acrilamida: reacción de Maillard. [4]

2. Materiales y métodos

Las características de los equipos utilizados se muestran a continuación:

| Espectrofotómetro UV-Vis | |
|---------------------------------|-------------------------------|
| Equipo | HEWLERTT PACKARD AGILENT 8453 |
| Cubeta | Cuarzo |
| Lámparas | Deuterio y Wolframio |

| Cromatógrafo de líquidos de alta eficacia | |
|--|--------------------------------------|
| Equipo | Agilent 1200 |
| columna | Col KROMAPHASE C18 5,0 150mm x 4,6mm |
| Fase móvil | Agua : Acetonitrilo : Metanol |

| Cromatógrafo de gases | |
|------------------------------|--|
| Equipo | Agilent Technologies 6890N |
| columna | GC Capillary column BP x 1,6m x 0,53mm x2,650m |
| Gas portador | Nitrógeno |

| Espectrofotómetro Raman | |
|--------------------------------|------------------------------------|
| Equipo | i-Raman B&W TEK modelo BW S415-785 |
| Sonda | Laser Diodos |

- Balanza analítica
- Agitador Vórtex
- Centrífuga
- Material Soxhlet y de destilación simple.
- Baño termostatado.

Los reactivos utilizados han sido:

- Acrilamida (AA) pureza $\geq 99\%$ (HPLC) forma en polvo, Sigma-Aldrich.
- L-Asparagina, (Asn) pureza $\geq 98\%$ sólida, Sigma-Aldrich.

- Acetonitrilo 99,9%, PanReac.
- Metanol 99,9%, PanReac AppliChem.
- Hexano 96%, Scharlau.
- Agua desionizada.
- Acetona $\geq 99\%$, Sigma Aldrich.
- Reactivo de Carrez I y Carrez II, PanReac AppliChem.

3. Técnicas utilizadas

3.1. Cromatografía

Las técnicas de separación se han basado en la cromatografía, método de separación de los componentes de una muestra que se distribuyen en dos fases, una estacionaria y otra móvil.

Cromatografía de gases (GC-FID). La cromatografía de gases nos permite separar los componentes de una muestra vaporizada en función de cómo se distribuyen entre una fase gaseosa móvil y una fase estacionaria líquida o sólida contenida en una columna. La muestra a analizar es inyectada en el portal de inyección, se volatiliza y pasa a la columna arrastrada por un gas portador inerte. En la columna se produce la separación de los distintos analitos en función de su interacción con la fase estacionaria, los cuales salen de la misma a diferentes tiempos y llegan a un detector. En el detector se produce la señal característica de cada analito que se registra y refleja en un cromatograma, permitiendo su análisis cualitativo y cuantitativo.

Detector de ionización de llama (FID): Consiste en un quemador de hidrógeno/oxígeno al cual llega el gas portador con el analito procedente del cromatógrafo y se mezclan con hidrógeno. El gas mezclado se enciende mediante una chispa eléctrica que produce una llama a elevada temperatura. A estas temperaturas, la mayoría de los compuestos orgánicos se ionizan y generan una diferencia de potencial entre el quemador y un electrodo colector situado encima de la llama. Esta diferencia de potencial es amplificada y registrada permitiendo la detección de los compuestos de una muestra.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC-UV/Vis) es un método de separación en el que la fase móvil es un líquido. La muestra se inyecta en el sistema cromatográfico y mediante un sistema de bombeo pasa a la columna, donde los analitos se separan dependiendo de su afinidad por los componentes de la fase móvil y el sólido de la fase estacionaria en la columna. Estos analitos eluyen a distinta velocidad y en consecuencia llegan a diferentes tiempos al detector de ultravioleta visible, produciendo una señal para cada uno de los analitos, la cual se registra en un cromatograma.

3.2. Técnicas espectroscópicas

Espectrofotometría de absorción molecular UV/Vis: La espectroscopía UV-Vis está basada en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible por una molécula en dicho intervalo (190-850 nm).

Espectroscopía Raman: El análisis mediante espectroscopía Raman se basa en la radiación dispersada por una muestra al incidir sobre ella un haz de luz monocromática (láser) visible o infrarroja de alta intensidad. Se trata de una técnica de análisis rápida y sencilla que se realiza directamente sobre el compuesto o muestra a analizar, generalmente sin necesidad de ningún tipo de preparación y sin alteración de la misma.

3.3. Métodos para la extracción de acrilamida

La extracción tiene, como su propio nombre indica, el objetivo de extraer un determinado compuesto o analito de la matriz más o menos compleja. Una vez realizada la extracción, el compuesto de interés es determinado por las técnicas correspondientes. Las técnicas utilizadas para la extracción de acrilamida han sido: la extracción mediante procedimiento Carrez, con baño maría y Soxhlet.

Extracción mediante procedimiento Carrez: La clarificación con Carrez se utiliza muy frecuentemente para preparar muestras en análisis de alimentos. Esta técnica sirve para la precipitación de proteínas, eliminación de turbidez y para destruir emulsiones que puedan interferir en el análisis. Si la muestra en disolución acuosa se trata con las disoluciones de Carrez I y II, se forma un complejo entre los dos reactivos insoluble, que precipita y diversas sustancias solubles de peso molecular elevado (p. ej. proteínas o carbohidratos) se unen por

adsorción a dicho precipitado, que a continuación se separa fácilmente de la disolución de la muestra por filtración o centrifugación.

Extracción con baño maría: Solubilidad del compuesto en agua con aporte de calor. Se introduce la muestra previamente pesada y triturada en una cápsula permeable de celulosa, a continuación dicha cápsula se coloca en un recipiente de vidrio con agua desionizada que se introduce en el baño termostático controlando la temperatura y el tiempo de ensayo.

Extracción Soxhlet: Esta técnica consiste en una extracción continua, utilizando un volumen de disolvente, que pasa varias veces de forma repetitiva a través de la muestra. Consta de un cuerpo central donde se sitúa la muestra, finamente pulverizada y previamente pesada, en un cartucho de un material permeable al disolvente, el sistema se indica en la Figura 5. El tiempo de extracción es de unas cinco horas (aproximadamente veinte ciclos). Además del cuerpo central se precisa de un matraz acoplado al extremo inferior y un refrigerante en la parte superior. El funcionamiento se basa en el calentamiento del disolvente hasta ebullición y su condensación posterior en el refrigerante. De esta manera se llena la cámara del Soxhlet y se produce un efecto sifón volviendo a iniciar el proceso. Conseguimos así que se disuelvan los componentes solubles de la muestra y recojan en el matraz.

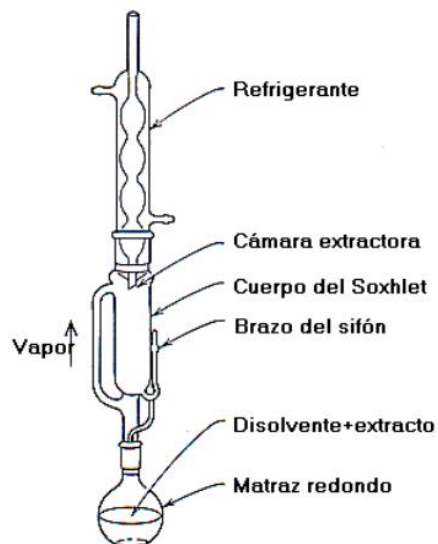


Figura 5. Esquema del montaje soxhlet.

4. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

4.1. Estudio en patrones de acrilamida.

Se preparan patrones de AA en agua desionizada, metanol y acetonitrilo para poner a punto el método que se utiliza más adelante en las determinaciones de acrilamida, previa extracción en muestras alimentarias.

4.1.1. Preparación de patrones de Acrilamida.

Todas las disoluciones patrón se preparan a partir de acrilamida de pureza del 99.9% pesando del orden de 0.1 g del reactivo, con precisión de ± 0.01 mg, a continuación se disuelve en el correspondiente medio y es llevada a 100 ml en matraz aforado obteniendo así una concentración de 1000 mg L^{-1} . A partir de esta disolución madre se preparan otros patrones tomando alícuotas y enrasando al volumen conveniente en función de la concentración deseada según cálculos realizados previamente.

4.1.2. Análisis por CG-FID de patrones de acrilamida.

Se hicieron ensayos previos para determinar los tiempos de retención de los patrones en metanol. En todos los casos, las temperaturas de inyección y detección, se fijaron en 250°C y 300°C respectivamente, mientras que para el horno se realizaron diferentes gradientes de temperatura, Tabla 2 y Figuras 6 a 11.

Tabla 2. Tiempos de retención en función de rampas de temperatura, patrones de AA en Metanol.

| Rampa | Aumento $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ | temperatura | Tiempo min | t_R min |
|-------|---------------------------------------|-------------|------------|-----------|
| a) | inicio | 180 | 1 | 2.498 |
| | 10 | 240 | 5 | |
| b) | inicio | 150 | 1 | 4.053 |
| | 10 | 190 | 5 | |
| | 20 | 220 | 3 | |
| c) | inicio | 100 | 1 | 5.294 |
| | 25 | 200 | 1 | |
| | 20 | 220 | 3 | |

| Rampa | Aumento °C/min | temperatura | Tiempo min | t _R min |
|-------|----------------|-------------|------------|--------------------|
| d) | inicio | 100 | 1 | 5.885 |
| | 20 | 200 | 1 | |
| | 20 | 220 | 3 | |
| e) | inicio | 100 | 1 | 6.788 |
| | 15 | 200 | 1 | |
| | 20 | 220 | 3 | |
| f) | inicio | 100 | 1 | 8.371 |
| | 10 | 200 | 1 | |
| | 20 | 220 | 3 | |

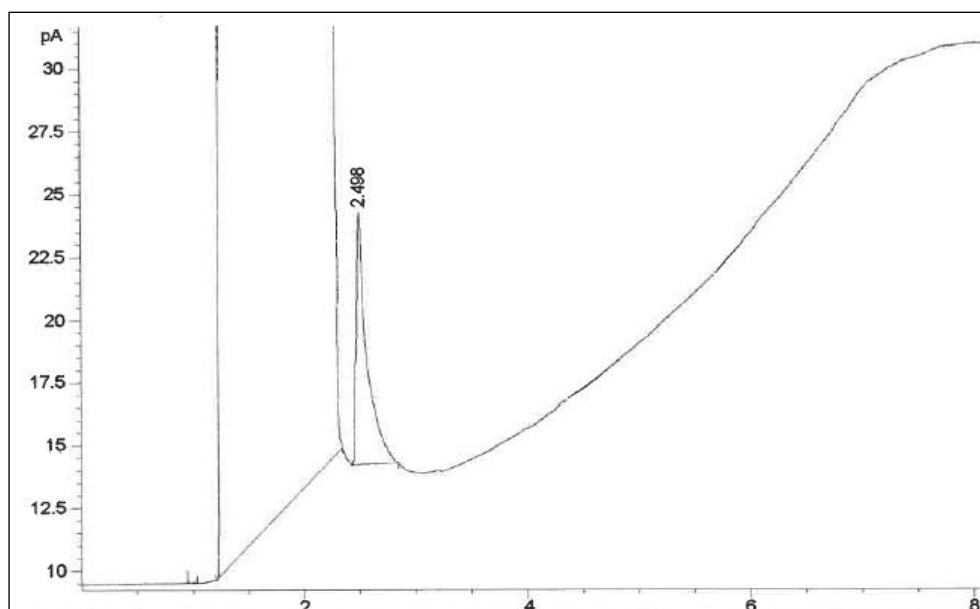


Figura 6. Patrón de acrilamida en metanol, 0.4 mg L⁻¹. Rampa a)

En la Figura 6, se observa el resultado para la Rampa a), aparece un pico bien definido pero muy próximo al del metanol. En base a su posterior determinación en muestras complejas, en las que pudiera darse lugar a solapamientos de pico, se procedió al estudio de otras rampas de temperatura con el fin de ampliar el tiempo de retención. Los resultados se recogen en las Figuras 7 a 11, donde los tiempos varían según el tipo de rampa entre los 2.498 min de la rampa a) hasta los 8,371 min de la rampa f).

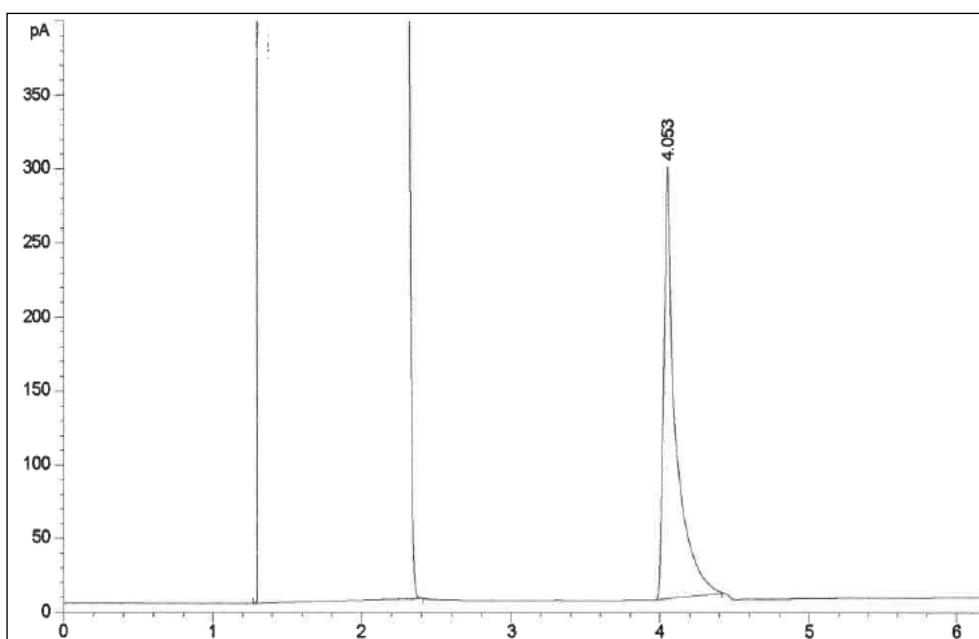


Figura 7. Patrón de acrilamida en metanol, 1000 mg L⁻¹. Rampa b)

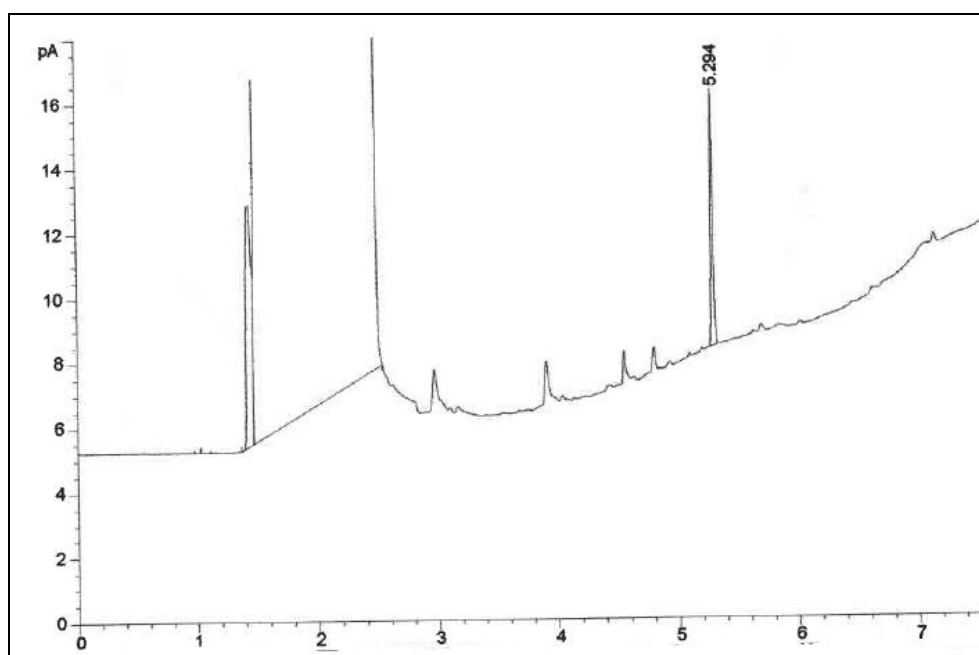


Figura 8. Patrón de acrilamida en metanol, 4 mg L⁻¹. Rampa c)

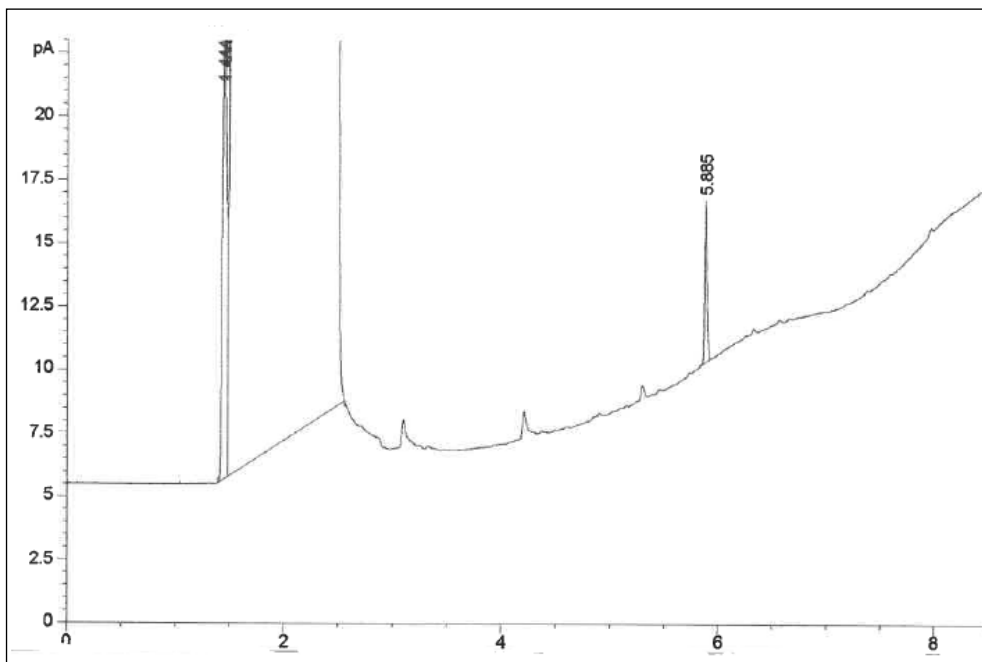


Figura 9. Patrón de acrilamida en metanol, 3 mg L⁻¹. Rampa d)

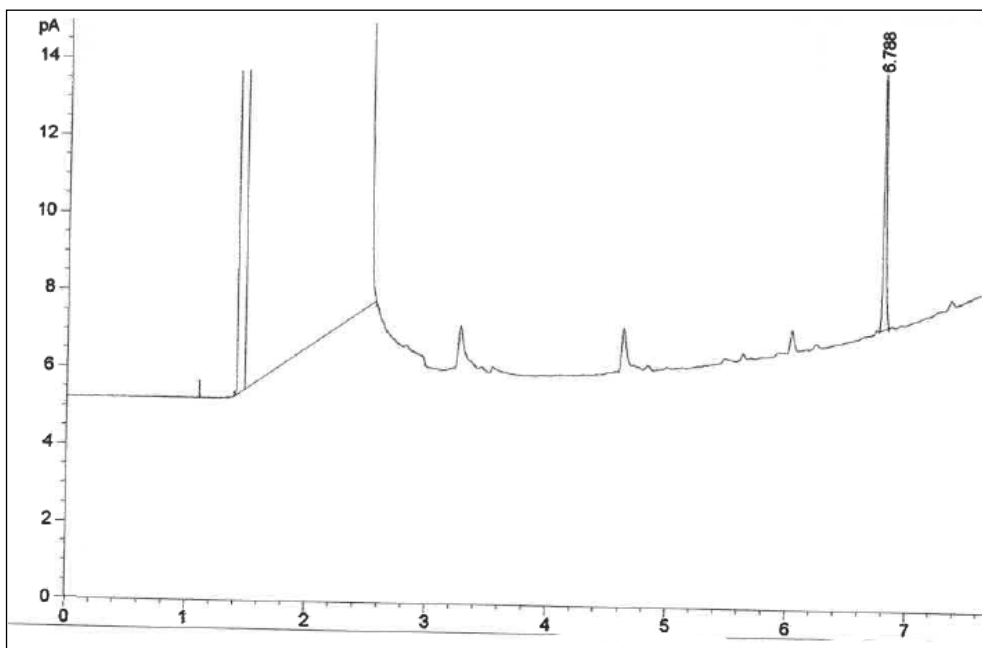


Figura 10. Patrón de acrilamida en metanol, 4 mg L⁻¹. Rampa e)

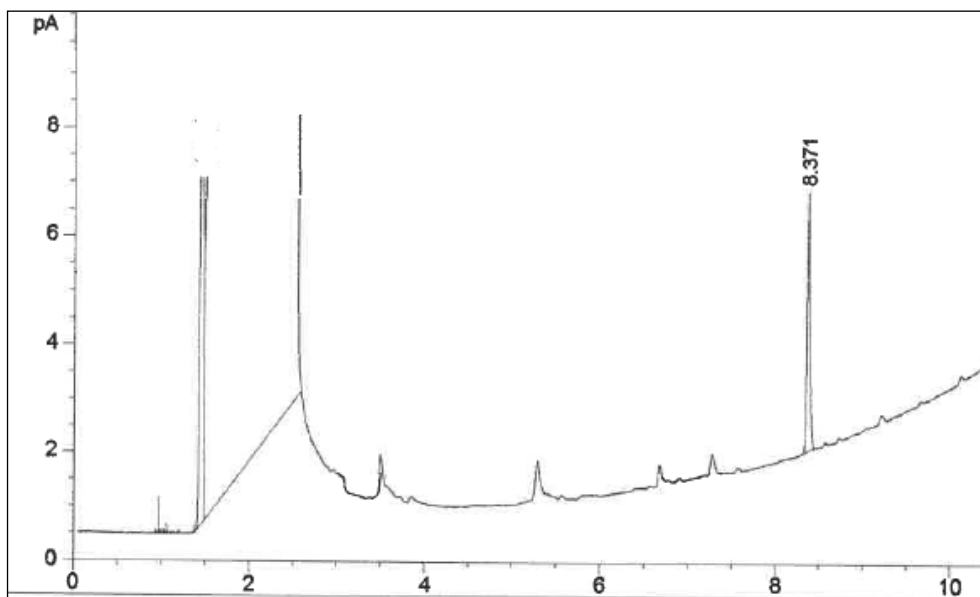


Figura 11. Patrón de acrilamida en metanol, 4 mg L⁻¹ Rampa f)

La rampa de temperaturas d) es considerada la más adecuada por el tiempo de retención intermedio y la buena resolución del pico, Figura 9.

Influencia de la concentración

Utilizando las condiciones d) de Tabla 2, para la temperatura del horno, realizamos medidas con patrones de diferentes concentraciones entre 0.4 y 3 mg L⁻¹. El límite de detección, LOD, obtenido fue de 0.18 mg L⁻¹ y el de cuantificación, LOQ, de 0.61 mg L⁻¹. En el anterior cromatograma, Figura 9, se muestra el patrón correspondiente a la concentración 3 mg L⁻¹.

Se repite el mismo estudio para patrones en acetonitrilo, los resultados en cuanto a tiempos de retención y límites de detección y cuantificación, coinciden prácticamente con los de metanol, en los anexos se recogen algunos de los cromatogramas obtenidos en este medio.

4.1.3. Análisis por HPLC-UV/Vis de patrones de acrilamida.

Estudio de acrilamida por espectroscopia UV/Vis.

Previamente a su determinación cromatográfica, se realiza un estudio de la capacidad de absorción de acrilamida por espectroscopia UV/Vis para determinar la longitud de onda óptima de absorción.

Se hacen barridos de los patrones de acrilamida en agua y en metanol, entre 200 y 400 nm. En los espectros obtenidos, Figura 12 y 13, se observa una banda con máximo de absorción alrededor de los 210 nm para ambos disolventes.

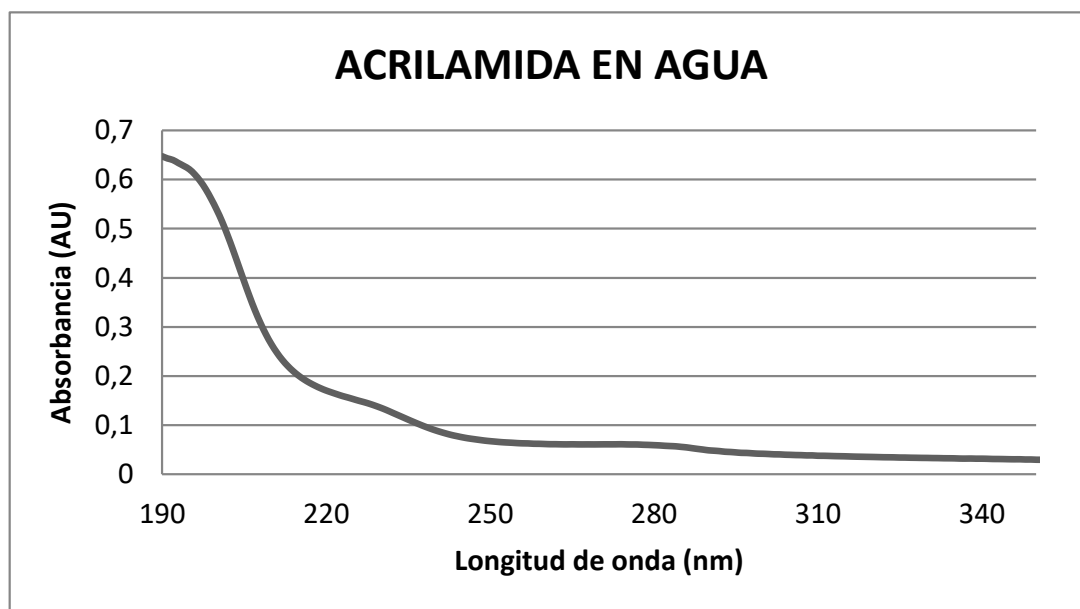


Figura 12. Espectro UV/Vis de acrilamida en agua.

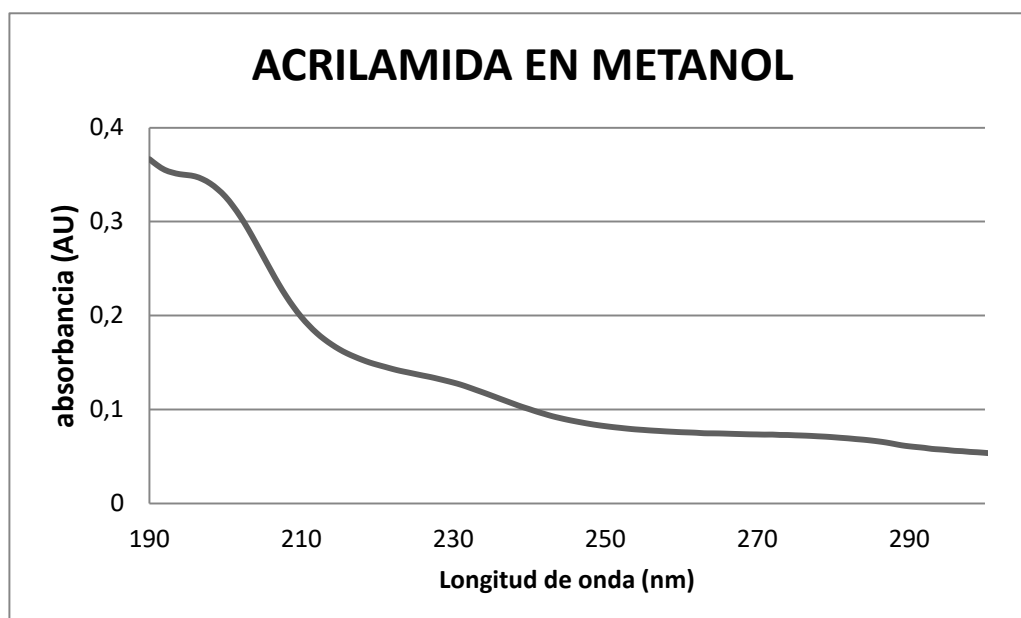


Figura 13. Espectro UV/Vis de acrilamida en metanol.

Estudio de la fase móvil de análisis: Patrones de acrilamida en agua

Una vez fijada la longitud de onda de absorción en 210 nm para el detector UV-Vis, se hacen medidas por HPLC variando las proporciones de los componentes de la fase móvil (agua, metanol y acetonitrilo) a fin de comprobar la influencia del porcentaje de cada uno de ellos en los tiempos de retención. Los resultados y cromatogramas se reflejan en la Tabla 3, y Figura 14 a 17.

Tabla 3. Tiempos de retención en función de la composición de la fase móvil: Patrones AA en agua.

| Condiciones | % Agua | % Acetonitrilo | % Metanol | t _R (min) |
|-------------|--------|----------------|-----------|----------------------|
| a) | 60 | 30 | 10 | 1.538 |
| b) | 70 | 20 | 10 | 1.623 |
| c) | 50 | 40 | 10 | 1.479 |
| d) | 40 | 30 | 30 | 1.535 |

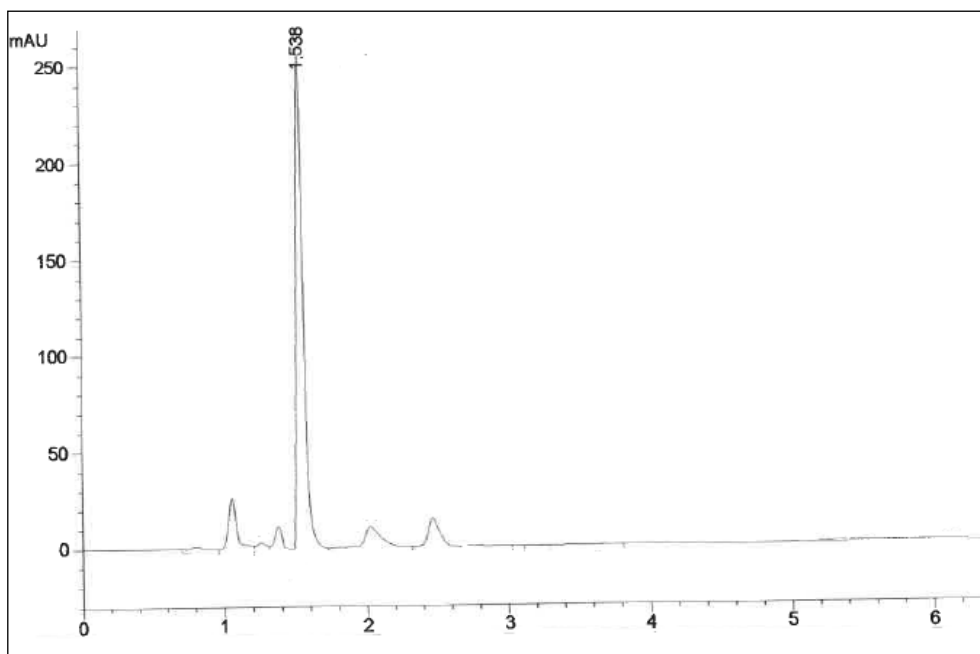


Figura 14. Patrón de AA en agua 10 mg L⁻¹. Condiciones a) tabla 3

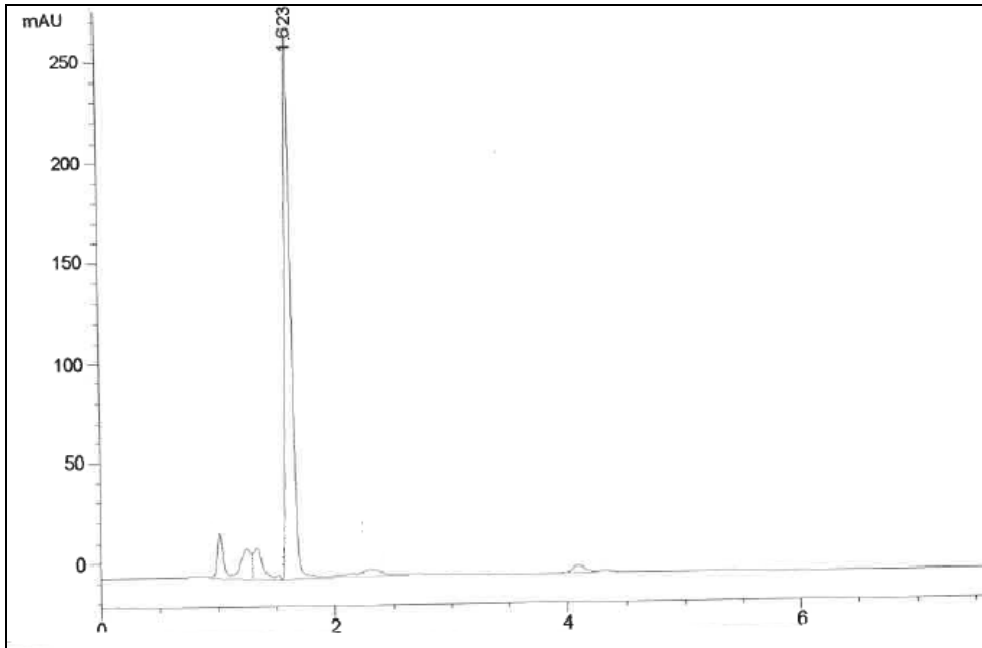


Figura 15. Patrón de AA en agua, 10 mg L⁻¹. Condiciones b) tabla 3

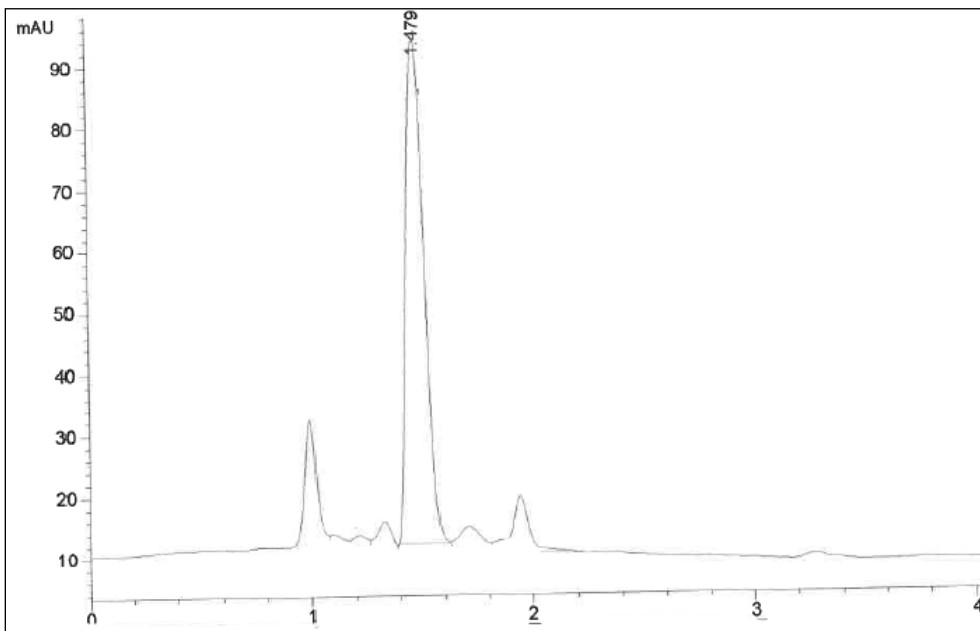


Figura 16. Patrón de AA en agua, 5 mg L⁻¹. Condiciones c) tabla 3

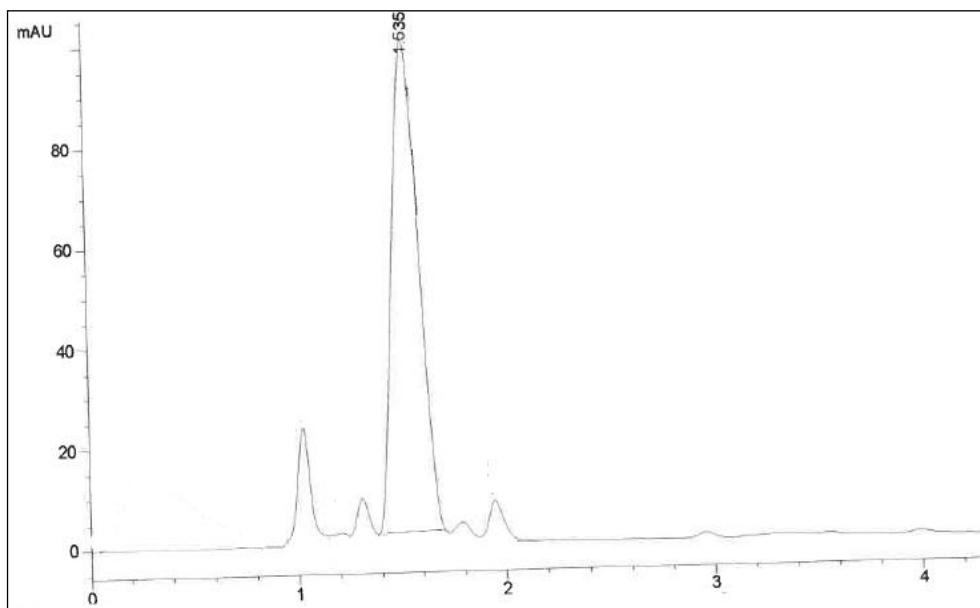


Figura 17. Patrón de AA en agua, 10 mg L⁻¹. Condiciones d) tabla 3

Como podemos observar en las figuras anteriores el aspecto del cromatograma no varía mucho con las modificaciones planteadas para la fase móvil, obteniéndose un pico para la acrilamida en todos ellos bien definido, en torno a 1.5 minutos.

Estudio de la concentración

Se realizan una serie de estudios variando la concentración para ver la influencia de la misma en el área. Los patrones utilizados tienen concentraciones entre 0.1 y 10 mg L⁻¹.

- Fase móvil: 60% Agua, 30% ACN, 10% Metanol [condiciones a) Tabla 3].

En la Figura 18 se puede observar el cromatograma correspondiente al patrón de concentración 5 mg L⁻¹. Los cromatogramas referentes al resto de concentraciones se muestran en los Anexos.

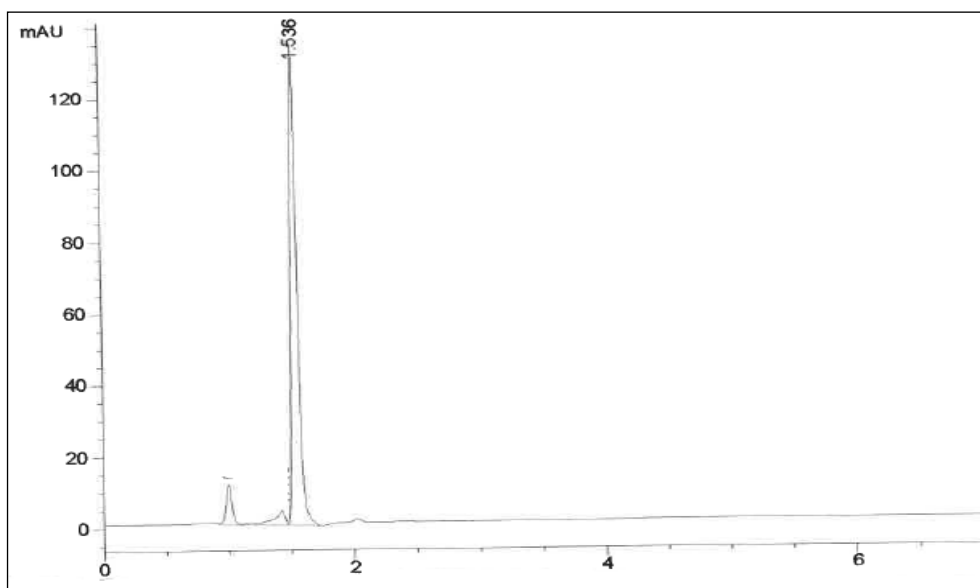


Figura 18. Patrón de Acrilamida en agua, 5 mg L⁻¹.

A continuación se muestran los resultados para cada patrón (área de pico) y la línea de calibrado obtenida, Tabla 4 y Figura 19.

Tabla 4. Concentraciones y Áreas acrilamida en agua. Condiciones a) tabla 3.

| Patrón AA (mg L⁻¹) | Área (mAU) |
|--------------------------------------|-------------------|
| 0.1 | 17.90 |
| 0.2 | 21.97 |
| 0.4 | 37.33 |
| 1.0 | 90.67 |
| 5.0 | 455.21 |
| 10.0 | 918.00 |

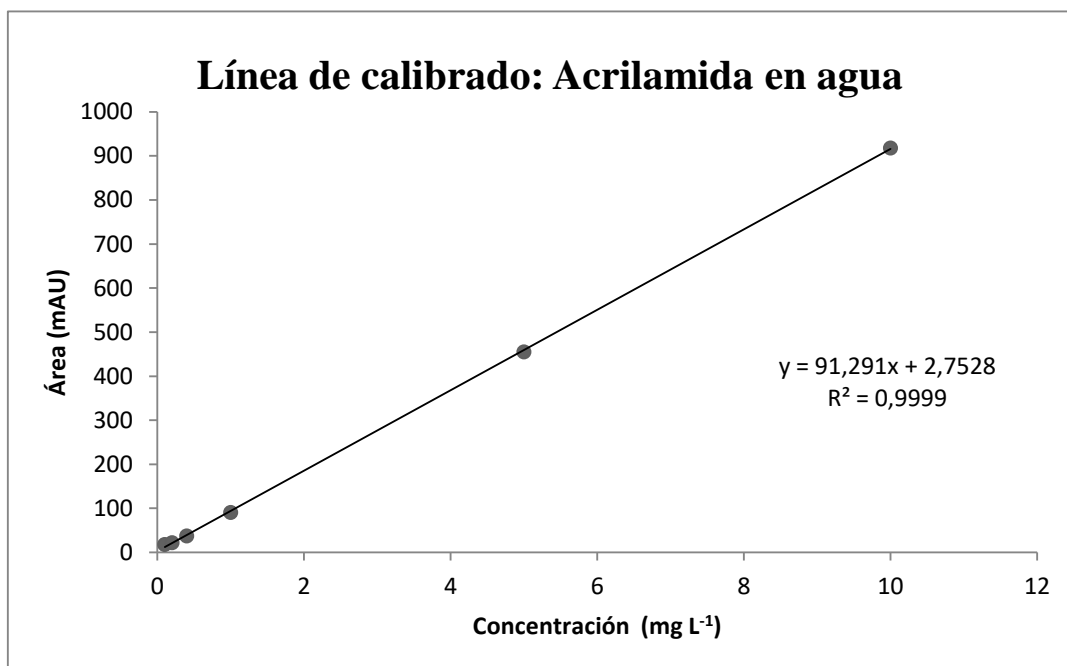


Figura 19. Línea de calibrado para AA en agua. Condiciones a) tabla 3.

Estudio de la fase móvil de análisis: Patrones de acrilamida en metanol

Los cromatogramas obtenidos y los porcentajes utilizados en cada una de las fases móviles para los diferentes patrones se muestran en la Tabla 5 y Figura 20, 21 y 22.

Tabla 5. Tiempos de retención y condiciones de la fase móvil para acrilamida en Metanol.

| Condiciones | % agua | % Acetonitrilo | % Metanol | t _R min |
|-------------|--------|----------------|-----------|--------------------|
| a) | 60 | 30 | 10 | 1.864 |
| b) | 90 | 10 | 0 | 2.144 |
| c) | 98 | 2 | 0 | 2.134 |

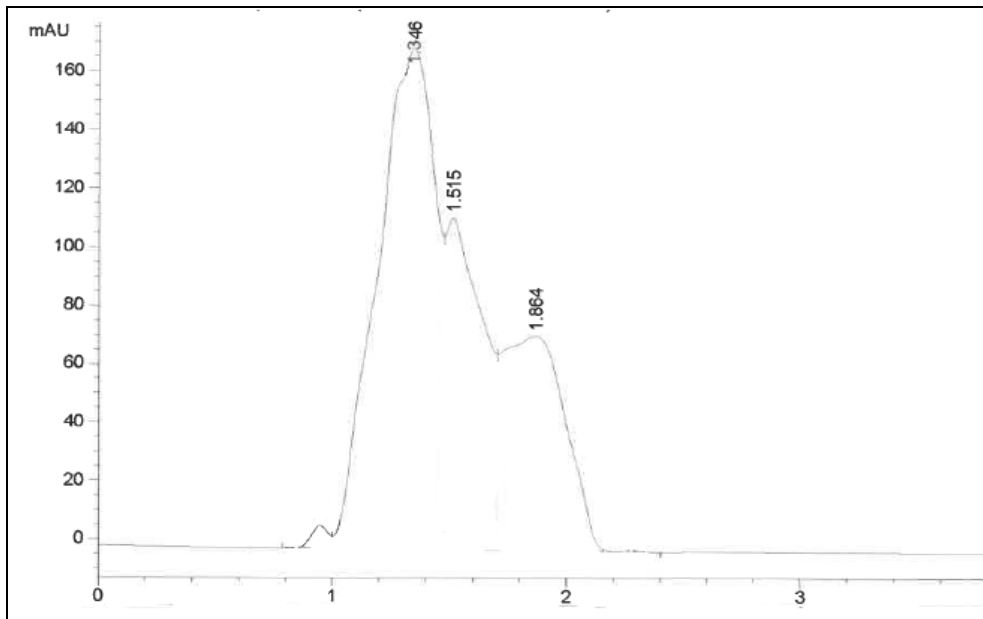


Figura 20. Patrón de AA en Metanol 5 mg L⁻¹. Condiciones a) tabla 5

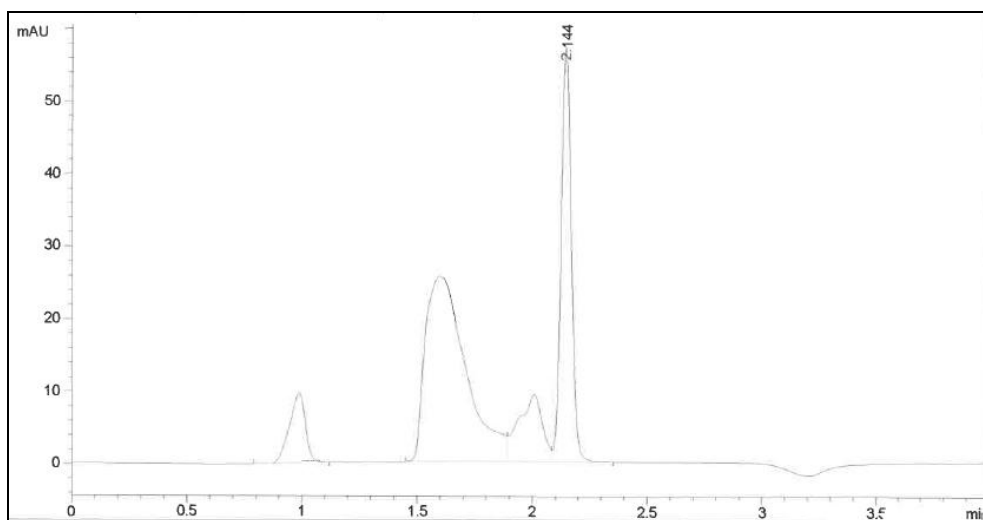


Figura 21. Patrón de AA en Metanol 5 mg L⁻¹. Condiciones b) tabla 5

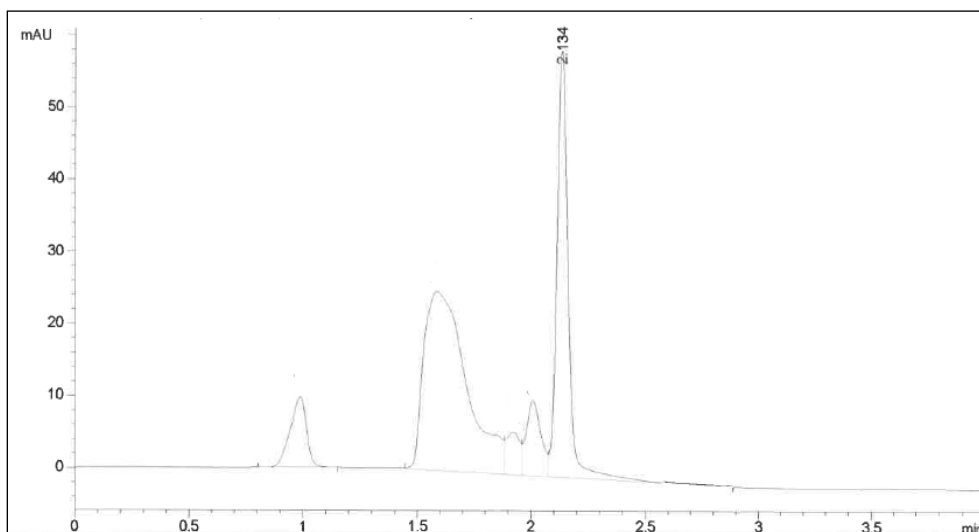


Figura 22. Patrón de AA en Metanol 5 mg L⁻¹. Condiciones c) tabla 5

Como se observa en la Figura 20, con la fase móvil, Agua: Acetonitrilo: Metanol en proporciones 60:30:10, el cromatograma no se resuelve bien, aparecen los picos solapados. Los mejores resultados se obtienen en las condiciones b y c siendo b) agua y acetonitrilo en proporción 90:10, la que no presenta solapamientos, por lo que consideramos esta como la más adecuada para realizar las medidas. En estas condiciones se obtiene un pico bien definido a 2.144 minutos, Figura 21.

Estudio de la concentración

Se hacen análisis de los patrones con concentraciones entre 0.1 y 25 mg L⁻¹ para ver la influencia de la concentración. La determinación se lleva a cabo en las condiciones b) anteriormente indicadas. En la anterior Figura 21, se refleja el cromatograma correspondiente a la concentración de 5.0 mg·L⁻¹ y en la Figura 23 se recoge el cromatograma correspondiente a 1.0 mg L⁻¹,

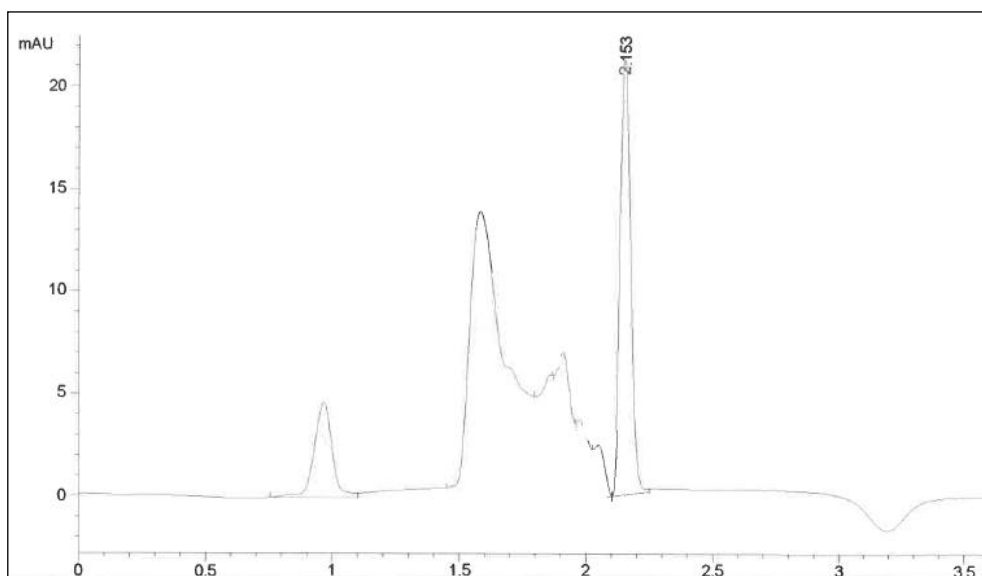


Figura 23. Patrón de AA en metanol, 1 mg L⁻¹.

A continuación se muestran los resultados para cada patrón (área de pico) y línea de calibrado obtenida, Tabla 6 y Figura 24.

Tabla 6. Concentraciones y áreas de los patrones de AA en metanol.

| Patrón AA (mg L ⁻¹) | Área (mAU) |
|---------------------------------|------------|
| 25 | 875,00 |
| 5,0 | 175,53 |
| 1,0 | 51,35 |
| 0,4 | 23,35 |
| 0,1 | 5,39 |

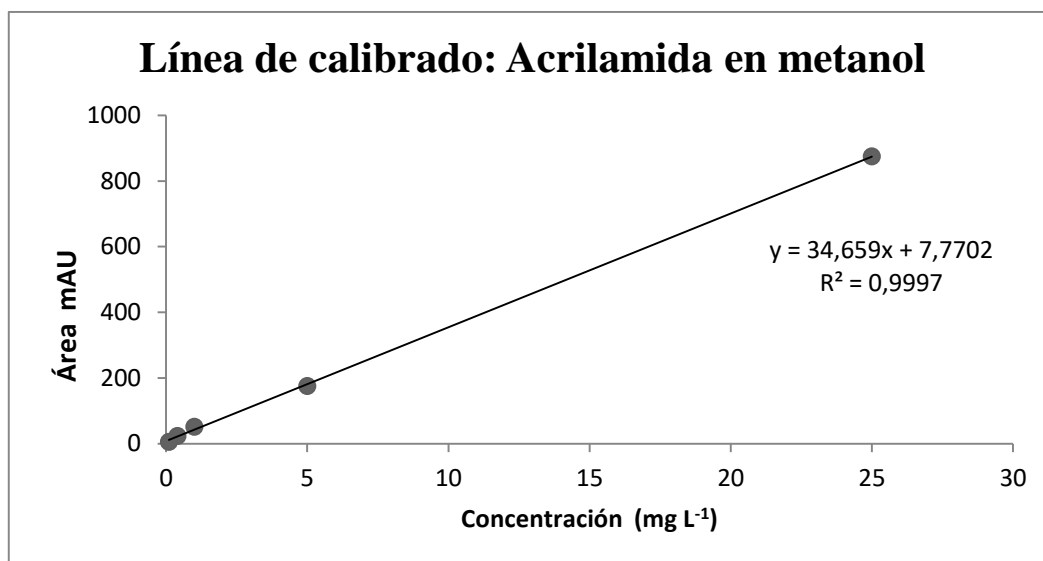


Figura 24. Línea de calibrado para patrones de Acrilamida en metanol.

El límite de detección, LOD, se encuentra en 0.10 mg L^{-1} y LOQ en 0.31 mg L^{-1} muy próximo a los valores que se obtenían con los patrones en agua.

4.1.4. Análisis por espectroscopía Raman de acrilamida.

Se realiza la caracterización por espectroscopía Raman, de acrilamida en estado sólido, con el fin de plantearnos las posibilidades de determinación del compuesto de forma directa en muestras alimentarias, los resultados se observan en la Figura 25 y Tabla 7.

De las 19 vibraciones fundamentales que se encuentran en la bibliografía entre 200 y 2000 cm^{-1} , para la AA, observamos 15 de manera clara en el espectro obtenido experimentalmente. La asignación de los movimientos de vibración a las frecuencias se hizo en base a los datos encontrados en la bibliografía. [6]

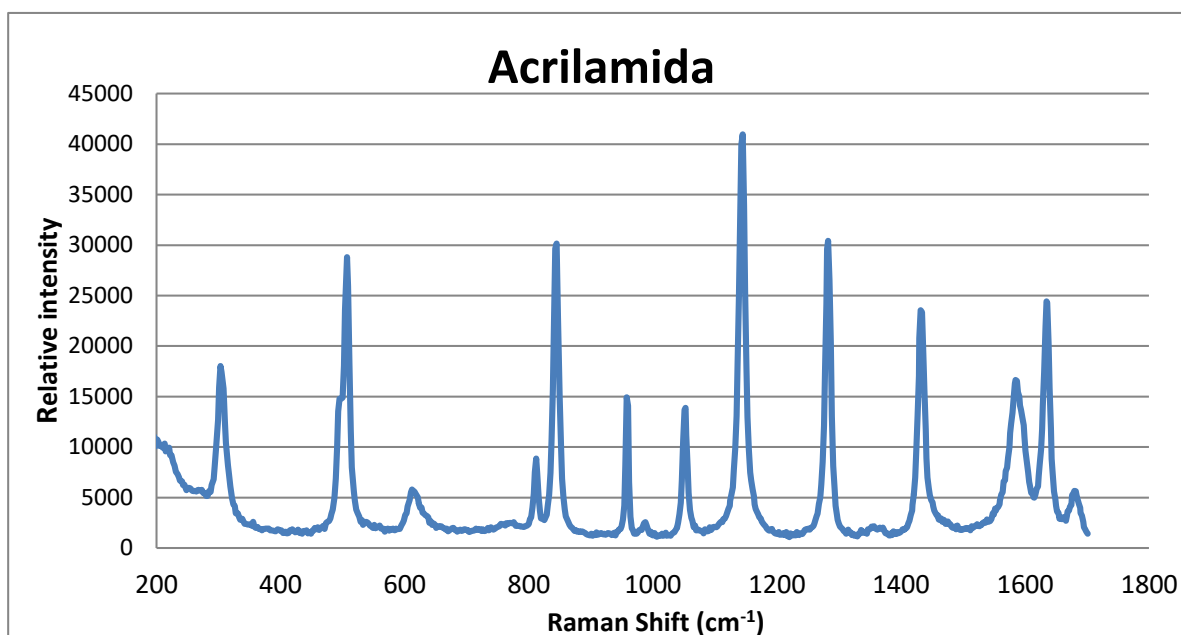


Figura 25. Espectro de Acrilamida pura por espectroscopia Raman.

Tabla 7. Bandas características de acrilamida.

| Desplazamiento Raman (cm ⁻¹) | Intensidad relativa | Asignación Vibracional | |
|--|---------------------|------------------------|-----------------|
| | | Movimiento | Grupo |
| 213 | 10363 | Torsión | C-C |
| 303 | 18014 | Deformación | C=C-C |
| 495 | 14797 | Torsión | C=O |
| 507 | 28803 | Deformación | O=C-N |
| 612 | 5815 | Balanceo | C-C |
| 812 | 8874 | Aleteo | C-H |
| 845 | 30150 | Flexión en plano | C-H |
| 958 | 14924 | Aleteo | CH ₂ |
| 1053 | 13883 | Balanceo | CH ₂ |
| 1145 | 40977 | Tijera | CH ₂ |
| 1283 | 30425 | Balanceo | NH ₂ |
| 1432 | 23555 | Estiramiento | C-N |
| 1585 | 16639 | Estiramiento | C-C |
| 1635 | 24419 | Estiramiento | C=C |
| 1680 | 5668 | Estiramiento | C=O |

4.2. Extracción de Acrilamida

4.2.1. Preparación de las muestras

Con el fin de comprobar la capacidad de extracción de los diferentes procedimientos utilizados. Se toma un volumen de disoluciones patrón de acrilamida en metanol y agua, se añaden sobre muestras de harina de trigo, se mezcla bien y una vez homogeneizada la muestra se deja secar.

4.2.2. Extracción procedimiento Carrez.

Muestras utilizadas.

Las muestras analizadas, fueron contaminadas según, el siguiente procedimiento: Se mezclan 5 gramos de harina de trigo con 5 ml de disolución AA (1000, 200, 100 y 20 mg L⁻¹), mínimo de tres réplicas y se deja secar a temperatura ambiente del laboratorio, las muestra con su contenido en acrilamida se recogen en la Tabla 8.

Tabla 8. Muestra utilizada para la extracción con reactivos Carrez.

| Muestra | Acrilamida por gramo de muestra (mg/g) |
|---------|--|
| A | 1.0 |
| B | 0.2 |
| C | 0.1 |
| D | 0.02 |

La disolución de Carrez I y II utilizada están preparadas a partir de ferrocianuro de potasio trihidratado y acetato de zinc respectivamente:

| | |
|------------------------------|--|
| Reactivo de Carrez I | Disolución formada por 239 g de Zn(O ₂ CCH ₃) ₂ / 1L de agua destilada |
| Reactivo de Carrez II | Disolución formada por 107 g de K ₄ [Fe(CN) ₆]*3H ₂ O / 1L de agua destilada |

Procedimiento de la extracción.

1. Pesar $1,0 \pm 0,1$ g de muestra en tubos de polipropileno de 50 ml
2. Añadir 8 ml de una disolución agua acetona, 80:20
3. Agitar el tubo en vórtex durante un minuto (facilitando la extracción)
4. Decantar y recuperar la fase acuosa superior y llevar a centrifugación 5 min a 4000 rpm.
5. Adicionar 1 ml del reactivo Carrez I y 1 ml del reactivo Carrez II.
6. Agitar en el vórtex durante 1 min
7. Centrifugar 10 min a 6000 rpm.
8. Separar la fase acuosa, donde se encuentra la acrilamida, de la fase sólida por decantación y filtrar.

Finalmente la disolución obtenida se llevó a un matraz de 10 ml enrasando con agua destilada.

4.2.3. Extracción con baño María.

La muestra utilizada para la extracción fueron de unos 5 g de Harina de trigo, dopada con 5 ml de una disolución de 1000 mg L^{-1} (muestra E) y 5 g con una disolución de 200 mg L^{-1} (muestra F) de acrilamida en agua. La muestra con su contenido en acrilamida se recogen en la Tabla 9.

Tabla 9. Muestra utilizada para la extracción con baño maría.

| Muestra | Harina de trigo “contaminada” (gramos) | Acrilamida en la muestra (mg) |
|----------------|---|--|
| E | 4.290 | 4.29 |
| F | 3.634 | 0.727 |

La extracción de la muestra, previamente triturada, se realizó en un baño a temperatura constante de $55 \text{ }^\circ\text{C}$ durante 24 horas. En este caso al no usar reactivos Carrez hay que tener en cuenta que el extracto obtenido puede contener otros componentes solubles en agua. La harina utilizada tenía los valores nutricionales que se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Valores nutricionales de la Harina de trigo.

| Harina | g por cada 1000 g |
|-----------------|--------------------------|
| Grasa | 1,3 |
| Azúcares | 2,7 |
| Fibra | 3,5 |
| Proteína | 10 |
| Sal | < 0,1 |

Los extractos obtenidos se filtran, para evitar partículas en suspensión, con un filtro de 0,24 micras antes de ser analizado en el equipo de HPLC. Ambos extractos se llevan a un matraz de 100 ml y se enrasa cada uno con agua desionizada.

4.2.4. Extracción con Soxhlet.

La muestra utilizada se realizó contaminando 5 gramos de harina con 5 ml de disolución patrón de 1000 mg L⁻¹ de AA en metanol y se dejó secar a la temperatura ambiente del laboratorio, de ésta muestra se pesan 3,1371 g y se procede a la extracción.

Tabla 11. Muestra utilizada para la extracción mediante Soxhlet.

| Muestra | Harina de trigo “contaminada” (gramos) | Acrilamida en la muestra (mg) |
|----------------|---|--|
| G | 3.1371 | 3.13 |

Procedimiento de la extracción:

Trituramos la muestra y la pesamos, se coloca en un cartucho de celulosa permeable al disolvente, y se deposita en el elemento de extracción. Para la extracción se utilizan unos 250 mL de metanol y se dejó como margen de error 10 ml de exceso previendo las pérdidas por evaporación. Se Realizan 20 extracciones a una temperatura de 65 °C (temperatura de ebullición del metanol) con una duración total de 5 horas.

Una vez realizada la extracción concentramos el extracto mediante destilación, la disolución presenta color amarillo y olor a caramelo, se lleva a un matraz de 100 ml y se enrasa con metanol.

4.3. Determinación por HPLC- UV/Vis de AA en muestras

Se realiza un estudio de las disoluciones extraídas con el fin de ver los resultados del análisis cromatográfico de acrilamida en medios más complejos. A la vista de los resultados obtenidos para los patrones de AA por GC y HPLC, decidimos utilizar esta última técnica en el análisis de las muestras, dado que los límites de detección y cuantificación eran mejores y además nos permitía realizar las medidas a tiempos más cortos.

4.3.1. Muestras extraídas por procedimiento Carrez

En este caso las disoluciones extraídas se encuentran en medio acuoso, por lo tanto utilizaremos las condiciones óptimas obtenidas para los patrones en ese medio. Hay que tener en cuenta que en el extracto final tendremos también cierta cantidad de acetona y otros restos procedentes de los reactivos Carrez I y Carrez II.

- Fase móvil: 60% agua, 30% acetonitrilo, 10% metanol.

A continuación se muestran los resultados obtenidos, en concentración decreciente, en las Figura 26 a 29.

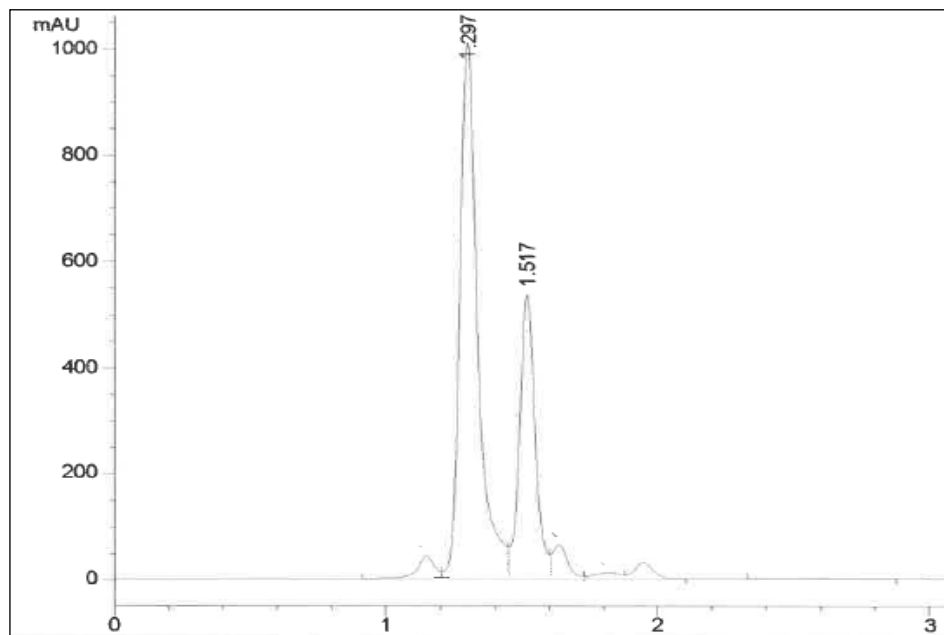


Figura 26. Extracción "Carrez" muestra A.

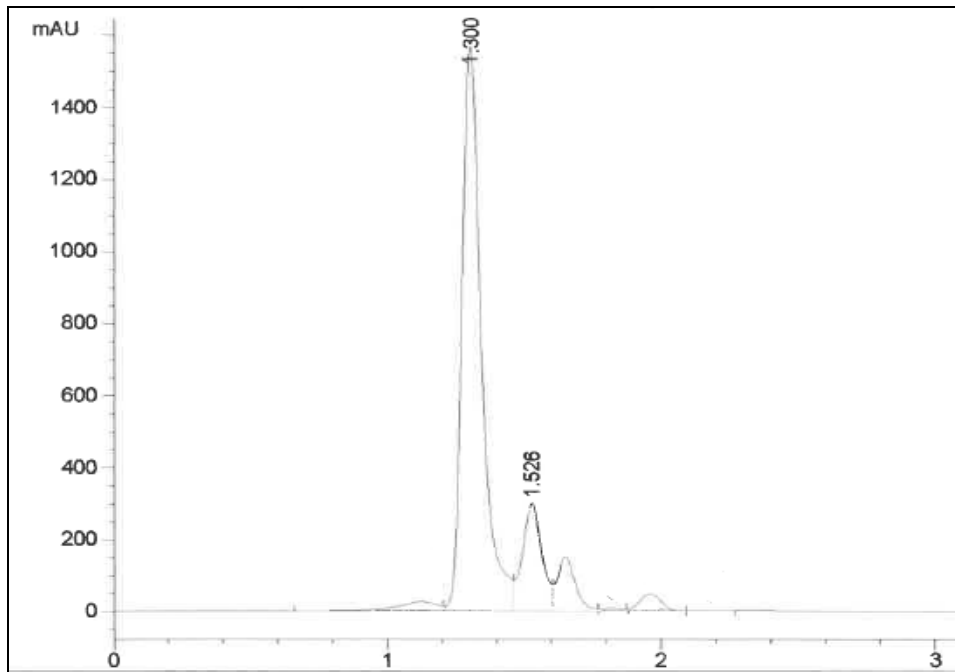


Figura 27. Extracción "Carrez", muestra B.

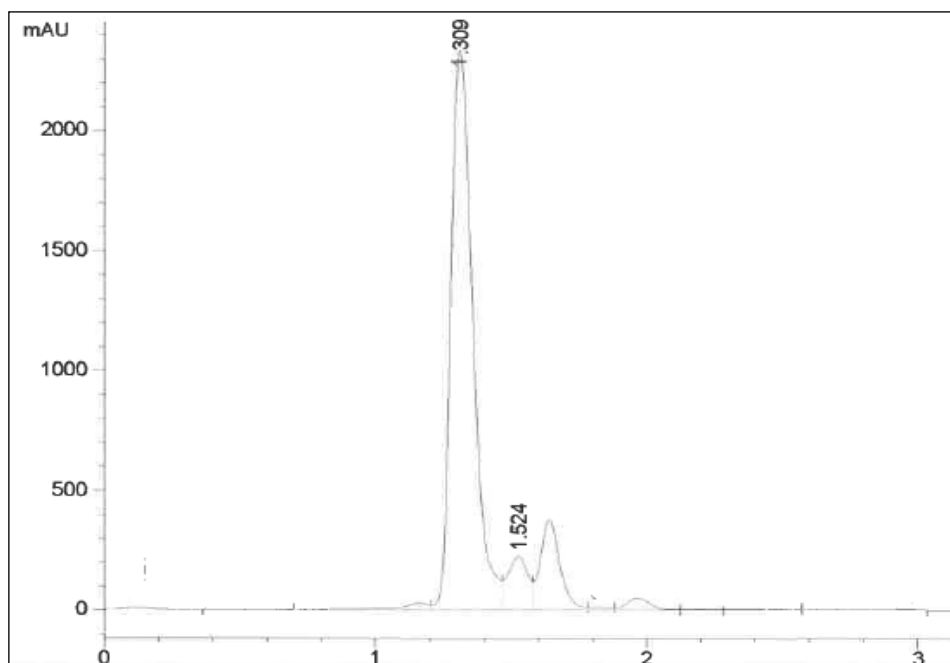


Figura 28. Extracción "Carrez", muestra C.

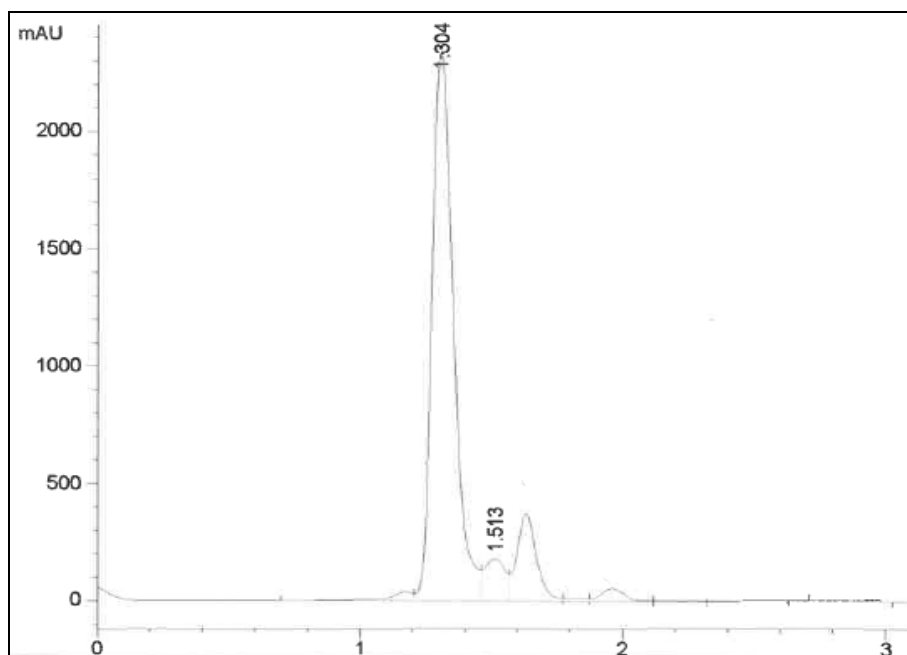


Figura 29. Extracción "Carrez", muestra D.

Obtenemos el pico de AA hacia 1.52 minutos, este disminuye a medida que lo hace la concentración. El pico que aparece a 1.3 min, se comprueba procede de las disoluciones Carrez. Se observa que a bajas concentraciones se acentúa un solapamiento con señales de otros compuestos presentes en el extracto de la muestra.

La cantidad de AA extraída se calcula a partir de la línea de calibrado, Figura 19, y nos permite determinar el rendimiento de las extracciones realizadas, Tabla 12.

$$\text{Rendimiento \% (w/w)} = \text{Cantidad extraída} \times 100 / \text{Cantidad inicial}$$

Tabla 12. Rendimiento de la extracción de AA con reactivos Carrez.

| Muestra | Área (mAU) | Acrilamida extraída (mg) | Rendimiento de extracción % |
|---------|------------|--------------------------|-----------------------------|
| A | 1821.48 | 0.199 | 19.9 |
| B | 788.75 | 0.086 | 43.0 |
| C | 394.83 | 0.043 | 42.9 |
| D | 182.44 | 0.019 | 98.4 |

Como se puede apreciar el mayor rendimiento se obtiene para bajas concentraciones del orden de 0.02 mg de acrilamida.

4.3.2. Muestras extraídas con Baño María.

En las condiciones de fase móvil utilizadas en el caso anterior, se obtenían para los extractos por baño maría cromatogramas con poca resolución, debido a solapamiento de picos, posiblemente de otros compuestos extraídos por este procedimiento, por lo que se procedió a modificar las condiciones de la fase móvil, Tabla 13 y cromatogramas de Figura 30 y 33.

Tabla 13. Tiempos de retención para AA en agua extraída con baño maría

| Condiciones | % Agua | % Acetonitrilo | % Metanol | t_R |
|-------------|--------|----------------|-----------|-------|
| a) | 60 | 30 | 10 | 1.518 |
| b) | 60 | 40 | 0 | 1.513 |
| c) | 70 | 30 | 0 | 1.582 |
| d) | 90 | 10 | 0 | 2.044 |

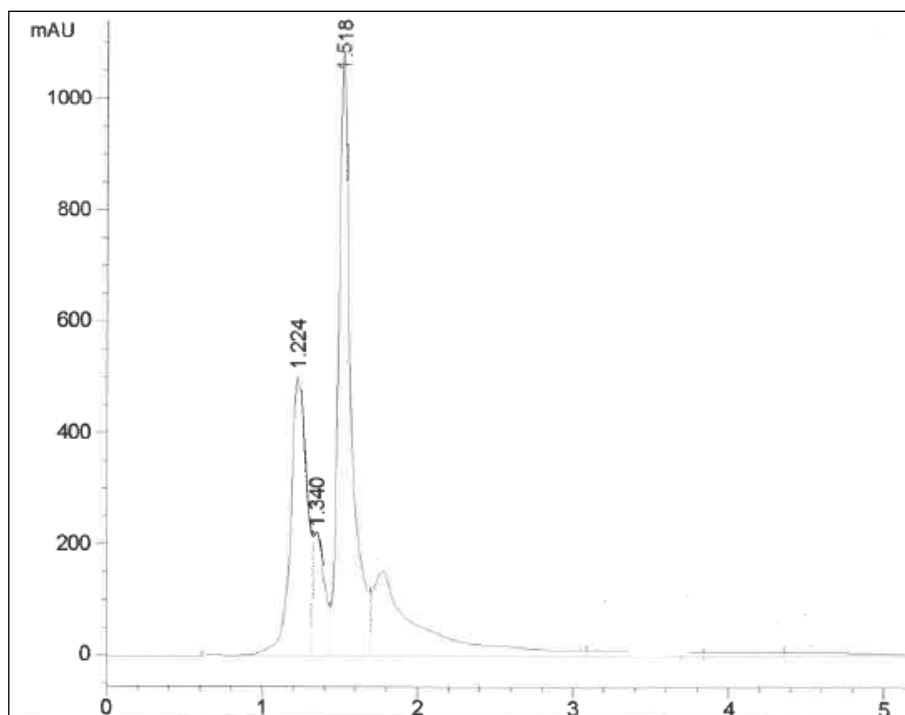


Figura 30. Extracción baño maría, muestra E. Condiciones a)

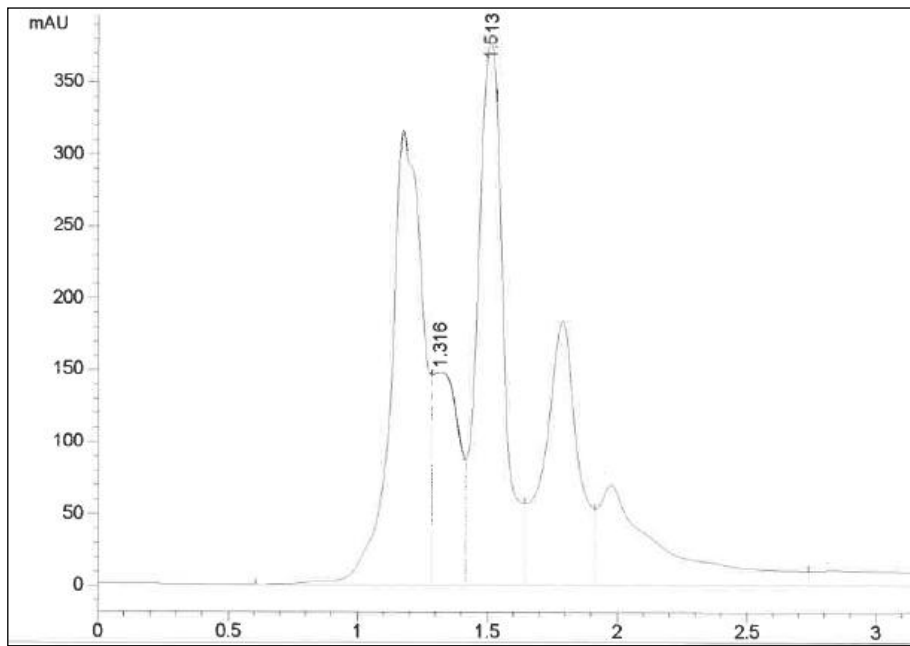


Figura 31. Extracción baño maría, muestra E. Condiciones b)

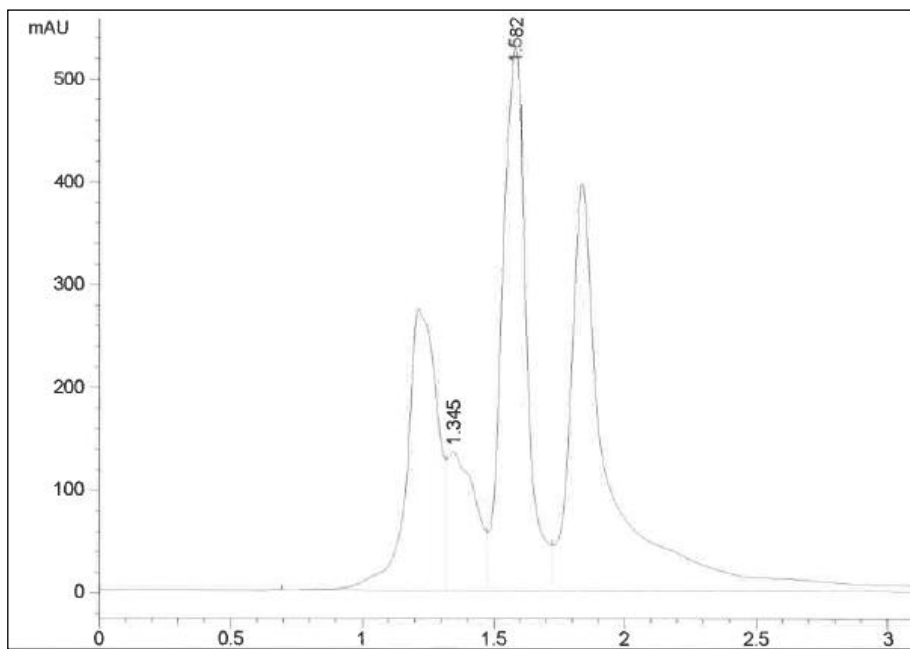


Figura 32. Extracción, baño maría, muestra E, condiciones c)

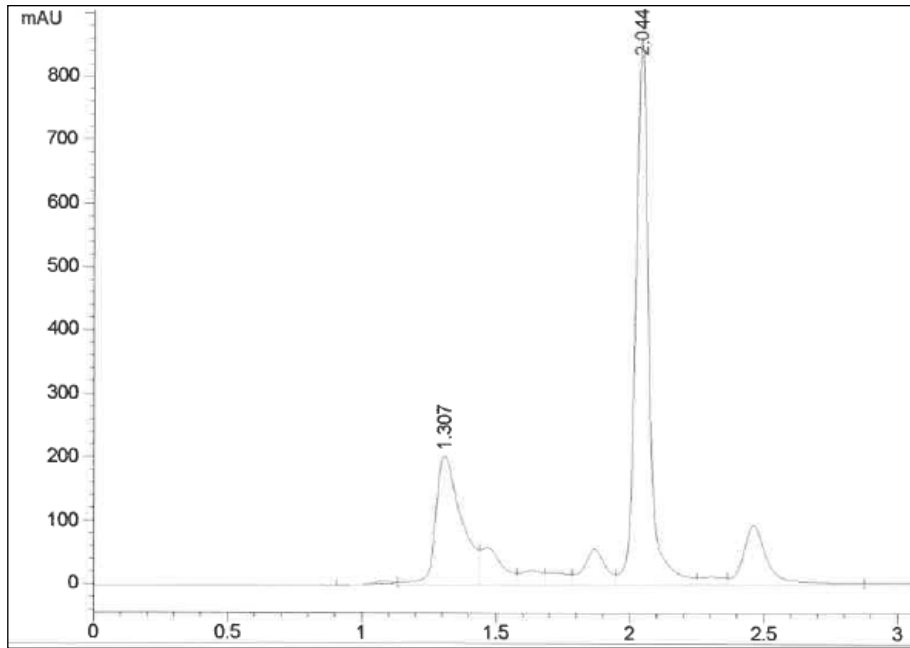


Figura 33. Extracción baño maría, muestra E. Condiciones d)

Observamos que el mejor análisis, corresponde a las condiciones d) 90% de agua y 10% de acetonitrilo de la Tabla 13; como se puede ver en la Figura 33, aparece un pico perfectamente definido a 2.044 minutos.

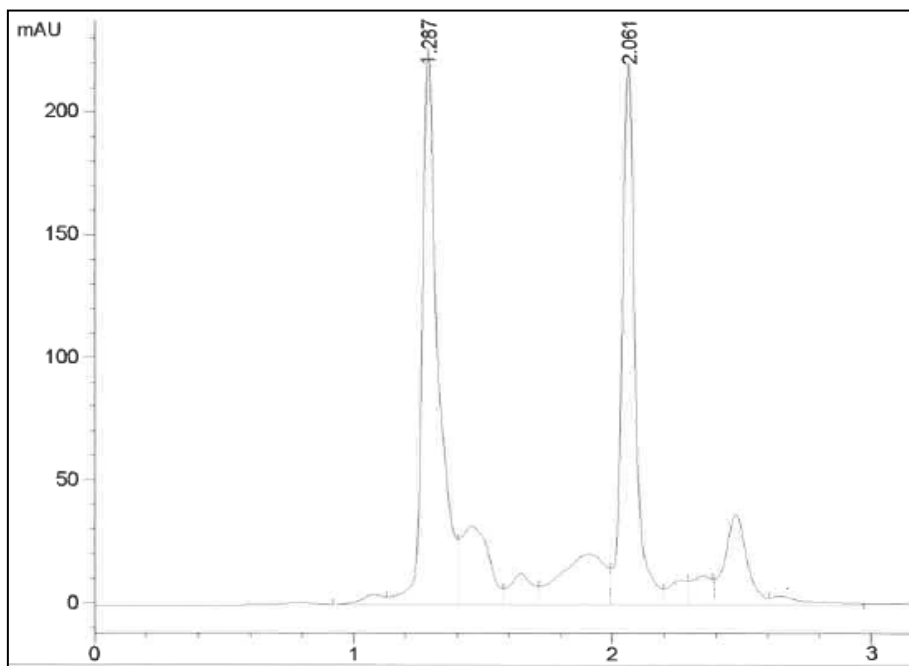


Figura 34. Extracción baño maría muestra F. Condiciones e)

En la Figura 34 se muestra el cromatograma obtenido para la muestra dopada de menor concentración, muestra F, donde se observa el pico de acrilamida a 2,061 minutos.

La cantidad de AA extraída se calcula como en el caso anterior a partir de la línea de calibrado realizada en las nuevas condiciones (90% agua, 10% acetonitrilo), Tabla 22 y Figura 70 de los anexos, los resultados se muestran a continuación junto con los rendimientos de la extracción en cada caso, Tabla 14.

Tabla 14. Rendimiento de la extracción con baño maría.

| Muestra | Área (mAU) | Acrilamida extraída (mg) | Rendimiento extracción % |
|---------|------------|--------------------------|--------------------------|
| E | 3141.7 | 3.33 | 77.7 |
| F | 554.05 | 0.587 | 80.7 |

El rendimiento de la extracción para concentraciones elevadas, por este procedimiento, es prácticamente constante y mayor que en la extracción Carrez a altas concentraciones.

Pruebas con Asparagina.

La asparagina se encuentra en la harina y es el precursor de la acrilamida y por lo tanto podría encontrarse en los extractos de las muestras y aparecer en los cromatogramas. Con el fin de identificar el compuesto en los cromatogramas de las disoluciones extraídas con baño maría se realizó un estudio en las condiciones consideradas idóneas para el análisis de acrilamida: longitud de onda 210 nm y fase móvil: 90% agua, 10% acetonitrilo.

En la Figura 35 se muestra el resultado obtenido, para una disolución patrón de asparagina con una concentración de 50 mg L⁻¹, se observa un pico bien definido a 1.363 min.

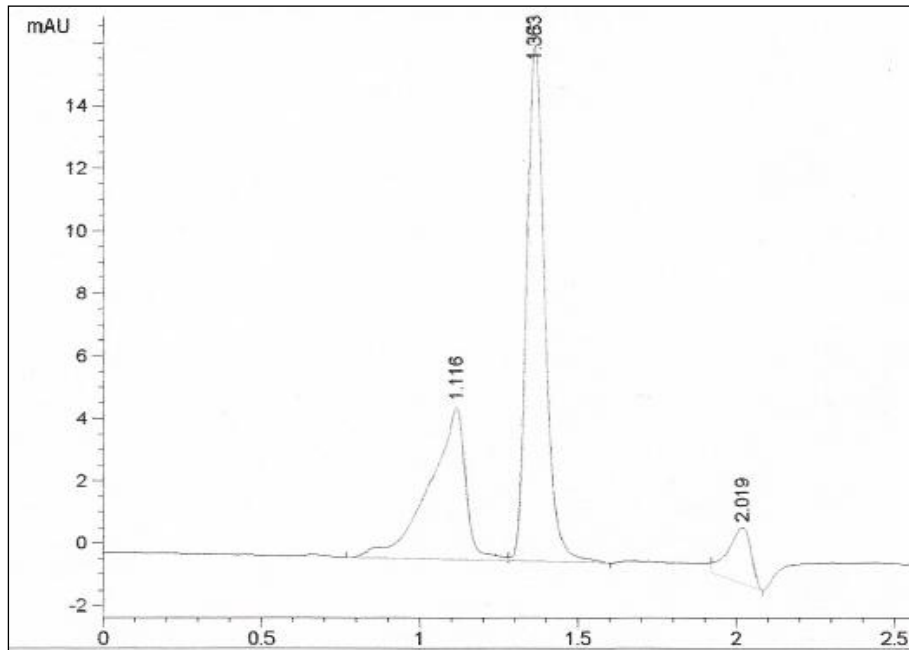


Figura 35. Patrón de Asparagina en agua, 50 mg/L.

A continuación y con el fin de confirmar dicho pico sobre un patrón de acrilamida, se adiciona asparagina, Figura 36, observándose un incremento del pico correspondiente a 1.363 minutos, lo que permitiría confirmar la presencia de dicho compuesto en los cromatogramas correspondientes a los extractos en nuestras muestras, aunque dicho pico se podría ver solapado por otros compuestos de similares características, presentes en las muestras.

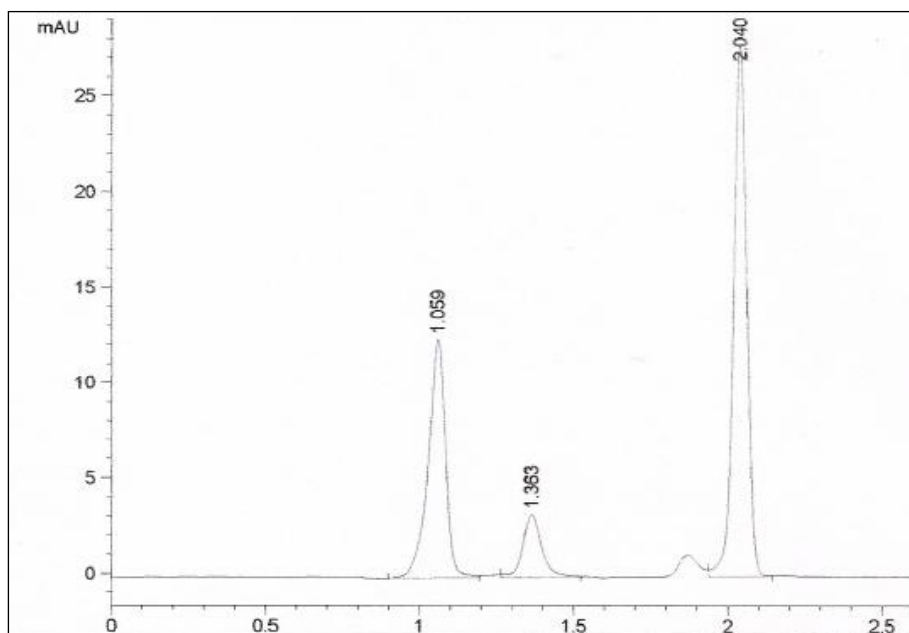


Figura 36. Patrón de Asparagina + Acrilamida.

Como se puede observar, la presencia de dicho compuesto se detecta en el cromatograma a 1,363 minutos, no interfiriendo la determinación de la acrilamida que aparece a un tiempo de retención de 2.040 min.

4.3.3. Muestras extraídas mediante Soxhlet

La muestra se encuentra en metanol por lo tanto utilizaremos las condiciones de la puesta a punto del método referentes a dicho disolvente, fase móvil 90% agua y 10% acetonitrilo. Los resultados se muestran en el cromatograma siguiente, **Figura 37**.

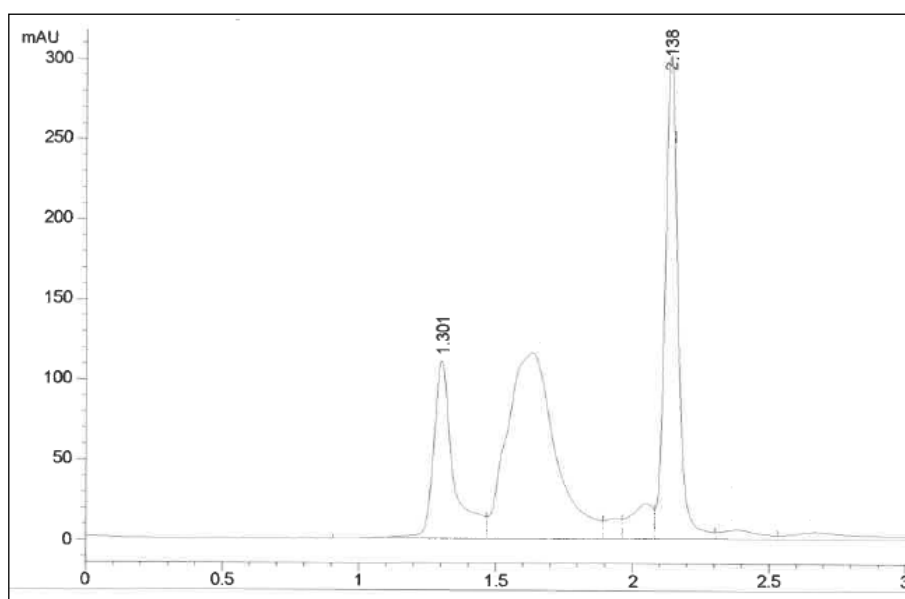


Figura 37. Extracción "Soxhlet" muestra contaminada.

Obtenemos un pico de acrilamida a 2.138 minutos. En el cromatograma se observa también asparagina, tiempo de retención 1.3 minutos.

La cantidad de AA extraída y el rendimiento de la extracción se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Rendimiento de la extracción con Soxhlet

| Muestra | Área (mAU) | Acrilamida extraída (mg) | Rendimiento extracción % |
|---------|------------|--------------------------|--------------------------|
| G | 842.6 | 2.41 | 76.8 |

Obtenemos un rendimiento similar al obtenido mediante la extracción con baño maría.

4.3.4. Determinación de muestras por espectroscopia Raman

Se han sido utilizado muestras de: harina de trigo, arroz y pan rallado, a la que se adiciona diferentes volúmenes de disolución de acrilamida en metanol. Se toma alrededor de un gramo de muestra y se hacen adiciones de disolución de acrilamida, de tal manera que la muestra resultante contenga entre un 10% y un 75% de dicho compuesto, se mezcla bien y se deja secar a temperatura ambiente de laboratorio. Antes de proceder a su análisis por RAMAN, la muestra resultante se tritura en un mortero de ágata y se toma una pequeña muestra pulverizada y homogeneizada.

En la Tabla 16 se muestran las bandas de AA que se observan en los espectros de las muestras contaminadas.

Tabla 16. Bandas características.

| Muestra | Acrilamida | Bandas características de AA (cm ⁻¹) |
|-----------------|------------|---|
| Harina de arroz | 10% | Se pueden observar picos al superponerlo con el de Acrilamida, pero no de gran intensidad. 845, 958, 1145, 1283. |
| | 20% | 301, 507, 845, 958, 1145, 1283, 1432, 1584. |
| | 50% | 301, 507, 812, 845, 958, 1053, 1145, 1283, 1432, 1584, 1635. |
| | 75% | 301, 507, 612, 812, 845, 958, 1053, 1145, 1283, 1432, 1584, 1635, 1680. |
| Harina de trigo | 10% | 507, 845, 1283 Débiles |
| | 20% | 301, 507, 612, 812, 845, 1053, 1145, 1283, 1584, 1635, 1680. |
| | 50% | 301, 507, 612, 812, 845, 958, 1053, 1145, 1283, 1432, 1584, 1635. |
| | 75% | 301, 507, 812, 845, 958, 1053, 1145, 1283, 1432, 1584, 1635. |

En el caso del pan rallado solo obtenemos ruido en el que no aprecian bandas definidas.

A continuación se muestra en la Figura 38 y Figura 39 espectros comparativos donde se puede observar la señal de la harina utilizada, la harina contaminada al 50% de AA y acrilamida. En los anexos se pueden observar los espectros para el resto de muestras de harina de trigo y harina de arroz contaminadas con 10%, 20% y 75% de AA (Figura 79 a 84).

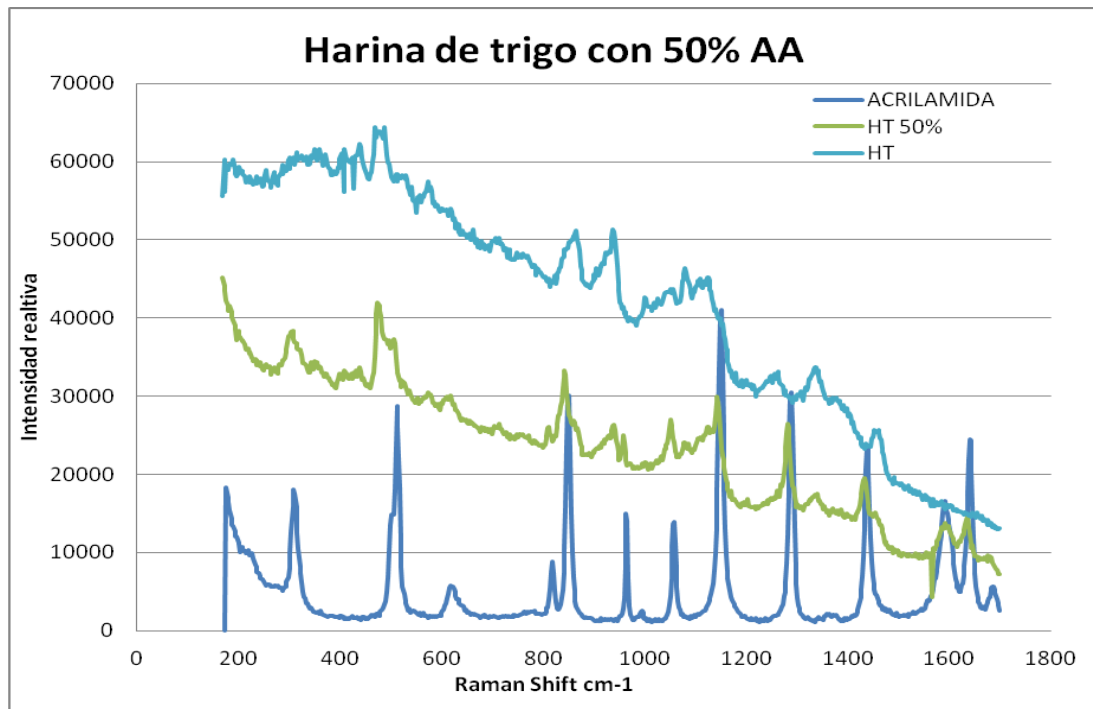


Figura 38. Espectro Raman de Acrilamida, Harina de trigo con 50% de acrilamida y Harina de trigo.

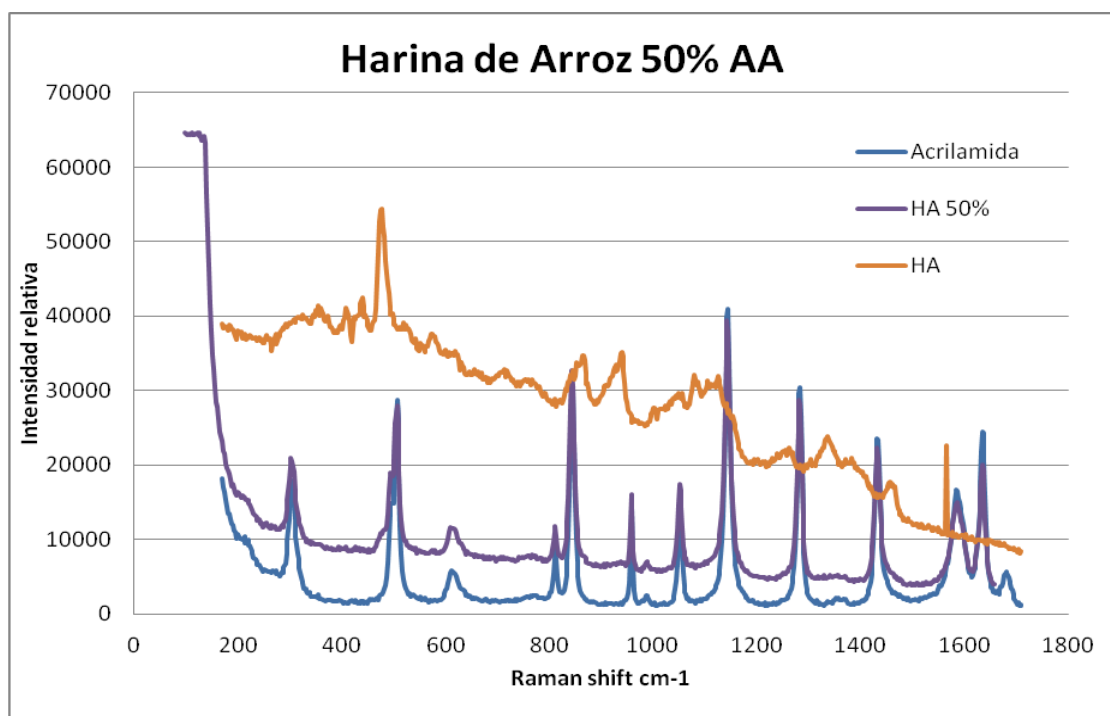


Figura 39. Espectro Raman de Acrilamida, Harina de arroz con 50% de acrilamida y Harina de arroz.

5. CONCLUSIONES

- Se ha puesto a punto un método para la determinación de acrilamida por GC con detector FID, con un límite de detección entorno a 0.2 mg L^{-1} y un tiempo de análisis inferior a 10 min.
- Se ha puesto a punto un método para la determinación de acrilamida por HPLC con detector UV/Vis. con un límite de detección del orden de 0.15 mg L^{-1} y un tiempo no superior a 5 min.
- Se ha conseguido la extracción de acrilamida de muestras de harina previamente contaminadas, mediante diferentes técnicas de extracción, como así se ha comprobado en la aplicación del método por HPLC, donde se ha logrado identificar acrilamida en el extracto. Se han obtenido rendimientos alrededor del 80% para concentraciones similares en las extracciones con baño maría y Soxhlet, e inferiores para la extracción mediante procedimiento Carrez.
- Se ha aplicado espectroscopía Raman para una identificación rápida de acrilamida tanto en patrones como en muestras de harina contaminadas. Identificando desde 3 bandas características de Acrilamida (muestras harina de trigo de 10% AA) hasta un máximo de 13 (muestras de harina de arroz 75% de AA) de las 15 bandas identificadas para el patrón.

PARTE II. ACEITES ESENCIALES

1. Introducción

Definición general de los Aceites esenciales (AE)

Los aceites esenciales o esencias son las sustancias aromáticas naturales responsables del olor de las flores y frutos. Actualmente se emplea esta definición solo si se obtienen a partir de una materia prima natural de origen vegetal mediante destilación con vapor de agua, por procesos mecánicos del epicarpio de los frutos cítricos, o por destilación seca, después de la separación de la fase acuosa, si la hubiera, mediante procesos físicos, como así lo dice la definición de la Norma UNE – en ISO 9235:2013.

Los aceites esenciales se localizan en diversas partes de la planta como la raíz, las flores, las hojas, el fruto o su cáscara... y están almacenados en las glándulas, conductos, dentro del vegetal, encontrándose en las plantas más usada para este fin en torno al 0.5 - 5 % en masa de aceite respecto a toda la planta. [7]

Composición

En lo relativo a su composición química, los AE son mezclas de elevada complejidad constituidas principalmente por terpenoides volátiles cíclicos o acíclicos, formados por unidades de isopreno en estructuras de 10 carbonos (monoterpenos) y 15 carbonos (sesquiterpeno). Los terpenos son un grupo de hidrocarburos inodoros que contribuyen muy poco al aroma y actúan como “base” diluyente del aceite esencial que contiene unos 10 o 15 componentes principales y otros tantos escasos o trazas. Los responsables del aroma y sabor característico suelen ser esas sustancias que se encuentran en menor proporción, aquellos compuestos con grupos funcionales carbonílicos (como aldehídos y cetonas), fenólicos, alcohólicos, éteres alcohol, éster, peróxidos, epóxidos, ésteres, Etc..¹

El número y tipo de componentes cambian dentro de una misma especie por diferentes razones: ecológicas (luz temperatura, altitud) agronómicas (época de siega, abonado, método de cultivo, maduración de la planta) o genéticas (quimiotipos). En cuanto al AE extraído tiene

gran relevancia en el tipo de constituyentes, el método de obtención y almacenamiento del mismo.

Métodos de extracción

Los AE pueden ser extraídos mediante diversas de técnicas, algunas de ellas se resumen en el siguiente cuadro:

| Métodos de extracción de los Aceites Esenciales | |
|--|---|
| Extracción mecánica | Expresión, incisiones, prensado, extrusión. |
| Destilación | Por arrastre con vapor (clevenger, hidrodestilación ...) |
| Extracción con solventes | Enflorado, maceración, infusión, percolación |
| Vanguardia | Utilización de fluidos supercríticos Extracción con microondas Ultrasonidos previa a hidrodestilación |

Las técnicas utilizadas más comunes son la destilación por arrastre con vapor e hidrodestilación.

Usos y propiedades

Los aceites esenciales tienen alto valor comercial y una importante demanda en la industria de alimentos (como condimentos y saborizantes, aromatizantes), farmacéutica y de cosméticos (perfumería, jabones, ambientadores, licores). Los usos y propiedades varían con la proporción de compuestos presentes ya que depende de los constituyentes mayoritarios. Actualmente también son utilizados como bio-pesticidas o herbicidas. Diferentes investigaciones muestran que algunos aceites poseen actividades antibacteriana, antifúngica y antiviral [8][9]; insecticida, antitóxica [9] y antioxidante, por ejemplo retrasando o inhibiendo la oxidación de aceites y lípidos en general [10]. También se habla de actividad antimicrobiana, ya que minimizan la probabilidad de contaminación microbiana inhibiendo el crecimiento de microorganismos.

Aceites esenciales en la cáscara de Naranja y vaina de pistacho

En nuestro estudio nos centramos en un compuesto concreto del aceite esencial, α -Terpineol, que se encuentra tanto en el AE de la cáscara de naranja como en la vaina de pistacho.

Los AE se encuentran en los cítricos en porcentajes de 1% hasta el 5%, con cantidades de α -terpineol del 0.15 al 1.5% [11][12]. En cuanto a la vaina de pistacho podemos encontrar valores que oscilan entre 0.06 - 0.5 % de AE [13][14] con cantidades de α -terpineol de 0.3 a 4 % [15][16].

El α -terpineol, Figura 40, es un hidrocarburo oxigenado (alcohol terciario monotérmico, monocíclico) y isómero predominante del terpineol. Tiene un olor agradable a lila, es ingrediente en perfumes y cosméticos. Además el α -terpineol tiene un gran interés en aplicaciones biológicas como antioxidante, anticonvulsivo o insecticida [17]. Algunos autores han comprobado su carácter anti-inflamatorio [18] o actividad antitérmica con efecto inhibidor [19]. También están comprobados los efectos cardiovasculares inducidos por α -terpineol en ratas hipertensas, induce hipotensión, que se puede atribuir a una disminución en la resistencia vascular [20]

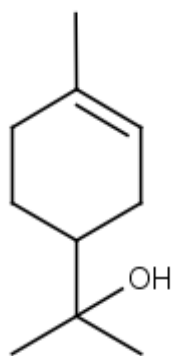


Figura 40. Estructura de α - terpineol.

Tabla 17. Datos químicos y físicos de α -terpineol

| DATOS QUIMICOS | |
|-------------------------|--|
| Fórmula química | $C_{10}H_{18}O$ |
| Peso molecular | 154.25 g/mol |
| Aspecto físico | Líquido cristalino |
| DATOS QUIMICOS | |
| Densidad | 0.9338 g/ml (25°C) |
| Punto de fusión | 31-35°C |
| Punto ebullición | 217-218 °C |
| Solubilidad | Disolvente g L⁻¹ |
| | Agua 7100 |

2. Materiales y métodos

Los equipos empleados han sido explicados en el apartado Materiales y Métodos de la Parte I del presente trabajo y han sido:

- Espectrómetro UV-Vis (medio, cubetas, lámparas...)
- Cromatógrafo de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID)
- Cromatógrafo de líquidos, HPLC – UV/Vis
- Material Soxhlet y de extracción simple.
- Baño termostático con sistema de “dedo frío”

Reactivos y muestras utilizados:

- α -Terpineol 90%, Sigma-Aldrich
- Cáscara de naranja
- Vaina de pistacho

- Éter dietílico para análisis 99,5% , PanReac
- Metanol 99,9%, PanReac AppliChem.
- Hexano 96%, Scharlau.

3. Técnicas utilizadas

3.1. Técnicas de separación y detección.

Las técnicas de separación empleadas han sido la cromatografía de gases (GC) con detector de ionización de llama (FID) y la cromatografía de líquidos de alta eficacia (HPLC) con detector UV/Vis. Ambas han sido explicadas con más detalle en el apartado de las técnicas utilizadas de la Parte I de este trabajo (página 10).

3.2. Métodos de extracción

Las técnicas utilizadas han sido la destilación arrastre de vapor de agua e hidrodestilación y la destilación con solventes a través de un equipo Soxhlet.

3.2.1. Destilación por arrastre con vapor.

Es quizá la técnica más utilizada debido a su bajo coste y altos rendimientos. En esta técnica se utiliza el vapor de agua para vaporizar los componentes volátiles de la muestra. Como en la mayoría de métodos el material debe ser previamente troceado en tamaño pequeño y uniforme para facilitar así el paso de vapor y la extracción. El proceso consiste en hacer pasar un flujo de vapor de agua sobrecalentado a través de la materia. Este vapor denominado “vapor de arrastre” es el encargado de arrastrar el AE de la muestra.

El AE arrastrado, es posteriormente enfriado hasta su condensación dando lugar a un líquido con dos fases, orgánica y acuosa, siendo separada la primera de la segunda por decantación. Si se trabaja a presión atmosférica, la destilación se produce a una temperatura inferior a 100°C, consiguiéndose así la obtención del aceite esencial a una temperatura que evita su posible degradación.

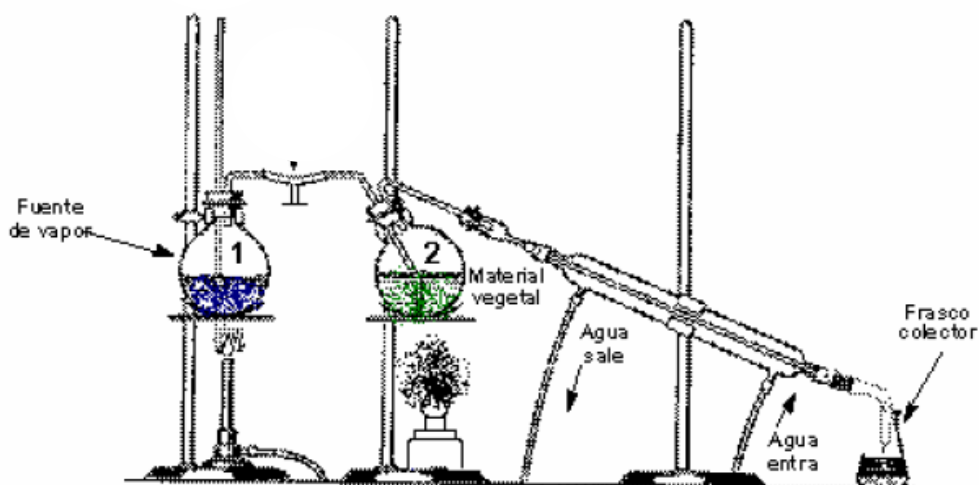


Figura 41. Esquema del montaje de destilación por arrastre con vapor de agua [21]

3.2.2. Hidrodestilación

Este método es considerado también como una variante de la extracción por arrastre con vapor: El compuesto a destilar se encuentra sumergido en el agua y la generación de vapor se produce dentro del propio recipiente. El recipiente generador de vapor y el que contiene la muestra serían en este último caso el mismo.

3.2.3. Extracción Soxhlet

Esta técnica se encuentra dentro de los métodos de extracción con solventes volátiles, que consiste en poner la muestra en contacto con disolventes, que penetran en el material, solubilizan y extraen las sustancias.

Se realiza una extracción Soxhlet, cuyo fundamento está explicado en apartado 3.3 de la parte de la acrilamida (página 11). Después de la extracción, la disolución resultante se filtra y se elimina el disolvente del aceite por destilación simple. Como inconveniente de esta técnica está la posibilidad de la extracción de otras sustancias solubles, como colorantes, pigmentos, etc.

4. EXPERIMENTACIÓN Y RESULTADOS

4.1. Estudio en patrones de α -Terpineol.

4.1.1. Preparación de patrones.

Se lleva a cabo la puesta a punto de un método para la determinación de α -terpineol. Los patrones utilizados se prepararon en hexano y metanol.

Se toma 0.100 g del compuesto con precisión de ± 0.001 g, se disuelve en el medio correspondiente y se lleva a un matraz de 100 ml obteniendo una disolución madre de 1000 mg L⁻¹, a partir de cual se preparan patrones de concentración entre 0.1 y 50 mg L⁻¹.

4.1.2. Análisis por GC-FID de patrones de α -Terpineol en hexano.

Se hizo un estudio previo, para determinar el tiempo óptimo de retención. Las temperaturas de inyección y detección, se fijaron, en todos los casos, en 250°C y 300°C respectivamente, en cuanto al horno se realizaron los gradientes de temperatura que se muestran en la Tabla 18. Los resultados se reflejan en los cromatogramas, Figura 42 y 43.

Tabla 18 . Rampas de temperatura y tiempo de retención: α -Terpineol en hexano.

| Rampa | Aumento °C/min | temperatura | Tiempo min | t _R min |
|-------|----------------|-------------|------------|--------------------|
| A) | inicio | 110 | 1 | 5.519 |
| | 10 | 190 | 3 | |
| ----- | | | | |
| B) | inicio | 80 | 1 | 6.657 |
| | 20 | 120 | 1 | |
| | 30 | 150 | 1 | |
| | 25 | 200 | 1 | |

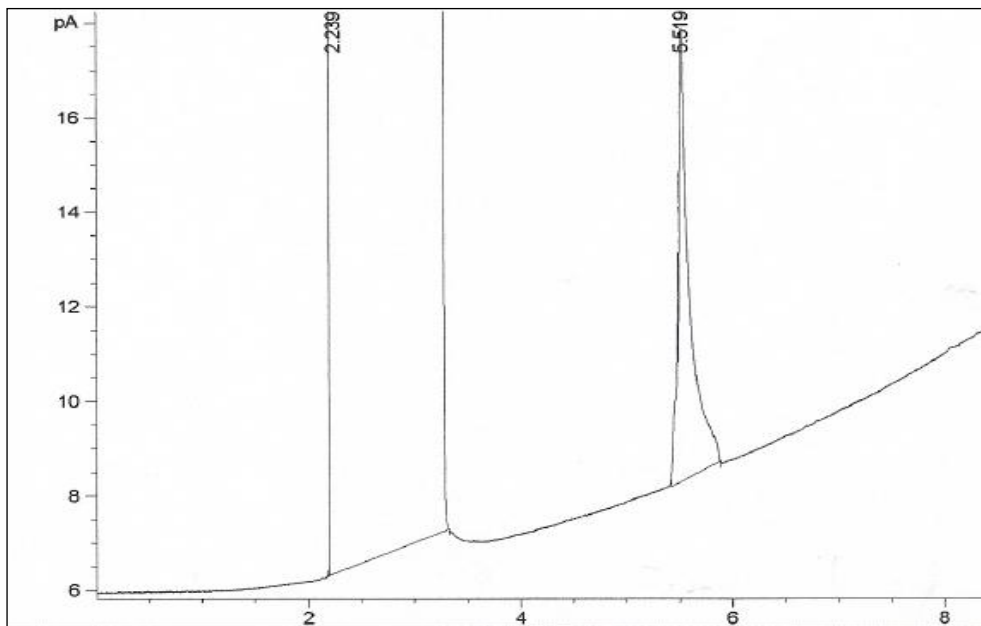


Figura 42. Patrón de α -terpineol en hexano, 50 mg L⁻¹. Rampa A)

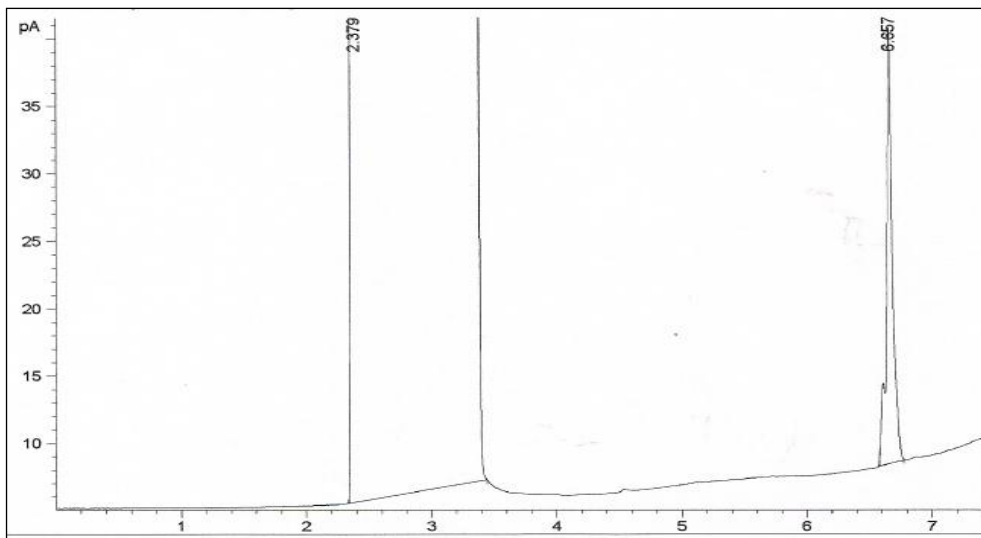


Figura 43. Patrón de α -terpineol en hexano, 100 mg L⁻¹. Rampa B)

De los resultados obtenidos, consideramos que las condiciones de la rampa B) ofrecen resultados más favorables en cuanto a la resolución del pico, en estas condiciones, se obtiene un límite de detección, LOD, de 0.25 mg L⁻¹ y un límite de cuantificación de 0.83 mg L⁻¹.

4.1.3. Análisis por HPLC-UV/Vis de patrones α -Terpineol en metanol.

Espectroscopía UV/Vis de α -terpineol

Con el fin de obtener la longitud de onda óptima para el análisis por HPLC, realizamos un barrido de los patrones en metanol, entre 200-300 nm, los resultados obtenidos muestran dos bandas, una con máximo de absorción a 210 nm y otra de menor absorbancia a 250 nm, Figura 44.

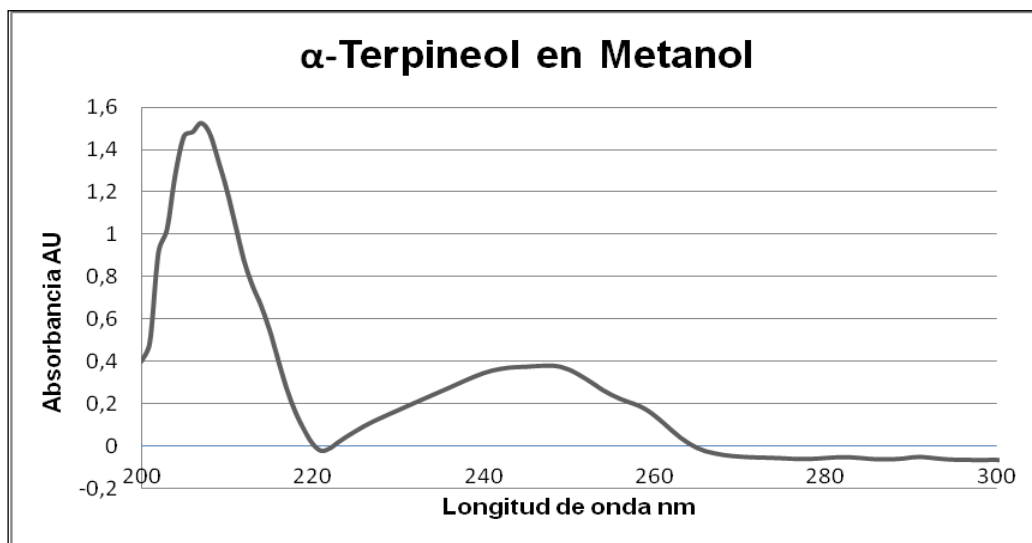


Figura 44. UV/vis α -Terpineol en metanol.

Estudio de las condiciones de la fase móvil

A continuación se realizan las medidas a la longitud de onda óptima de 210 nm. Se procede a realizar un estudio sobre los % de componentes (Agua, acetonitrilo, metanol) en la fase móvil, a fin de determinar un tiempo óptimo en la medida, los resultados se muestran en la Tabla 19 y en los correspondientes cromatogramas Figura 45 a 48.

Tabla 19. Tiempos de retención patrón de α -terpineol en Metanol.

| Condiciones | % Agua | % Acetonitrilo | % Metanol | t_R min |
|-------------|--------|----------------|-----------|-----------|
| A) | 20 | 50 | 30 | 3.174 |
| B) | 10 | 70 | 20 | 2.412 |
| C) | 30 | 70 | 0 | 3.322 |
| D) | 50 | 50 | 0 | 6.652 |

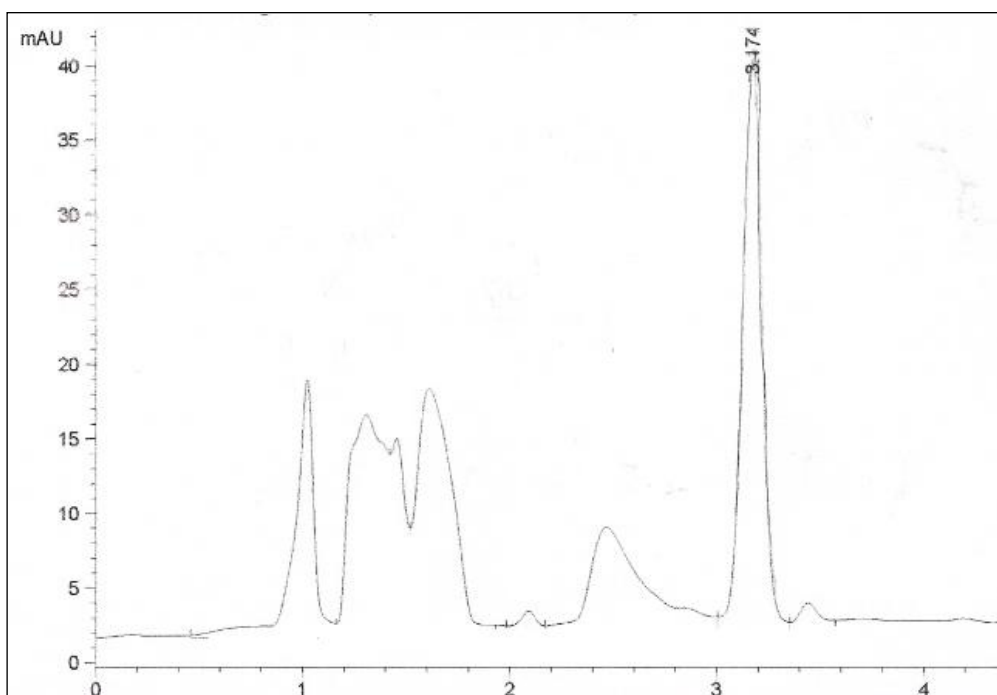


Figura 45. Patrón de α -Terpineol en 10 mg L⁻¹. Condiciones A).

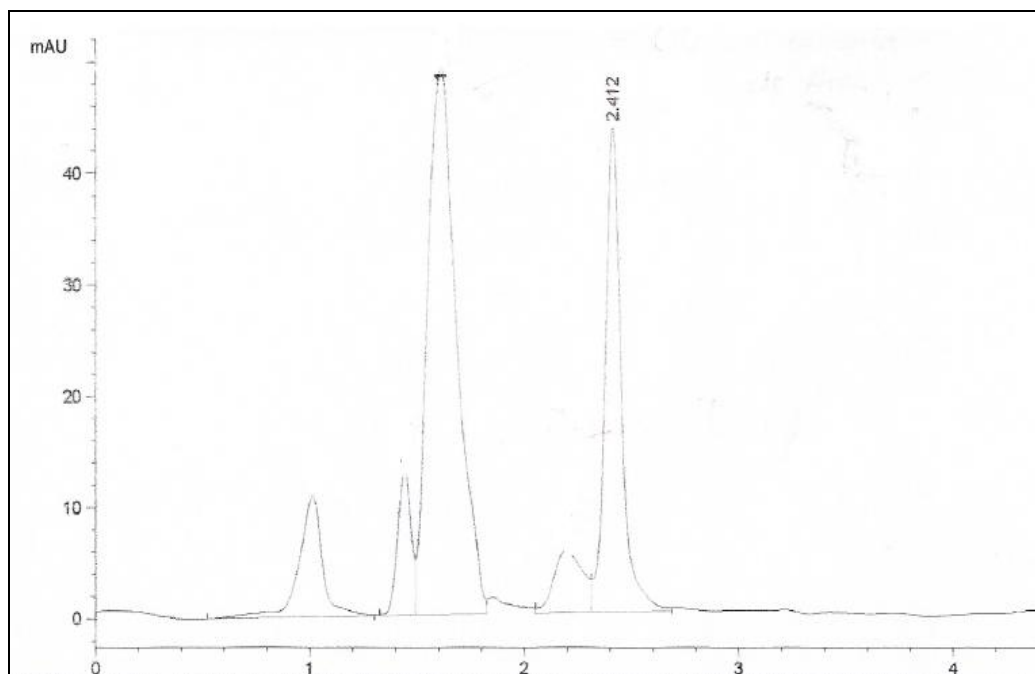


Figura 46. Patrón de α -terpineol en metanol 10 mg L⁻¹. Condiciones B)

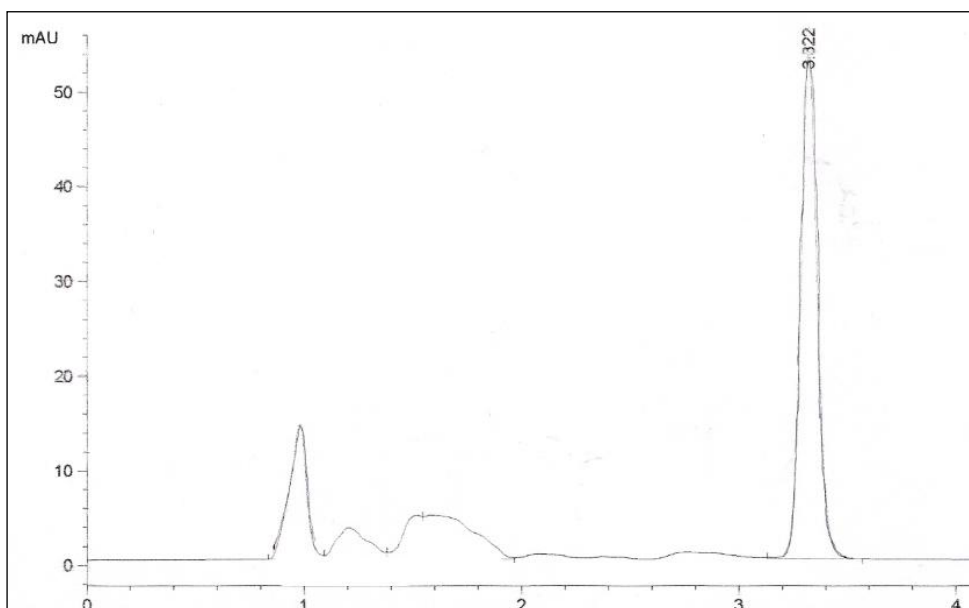


Figura 47. Patrón de α -Terpineol en Metanol 25 mg L⁻¹. Condiciones C)

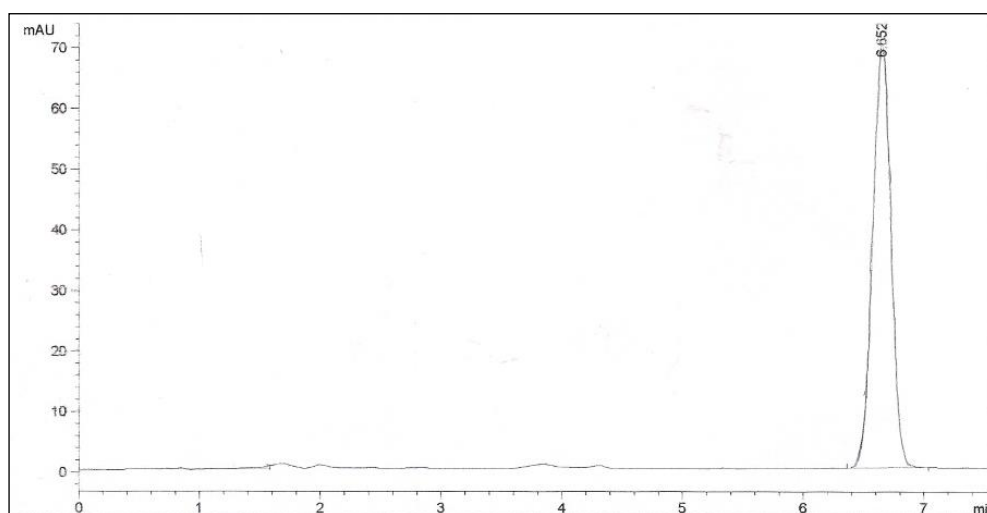


Figura 48. Patrón α -terpineol en metanol 10 ppm. Condiciones D)

De los resultados obtenidos podemos concluir que las mejores condiciones de análisis corresponden a las fases móviles C) y D), donde el pico del compuesto, bien definido, eluye a 3.322 min y 6.652 min respectivamente, y se encuentra separado de otros picos presentes en el cromatograma posible debidos a impurezas. Para nuestro análisis elegimos la fase móvil C), 30% agua y 70% acetonitrilo, por ser la que implica un menor tiempo.

Línea de calibrado

Se realiza un estudio sobre patrones de diferentes concentraciones en las condiciones elegidas como adecuadas en el anterior apartado. A continuación se muestra la línea de calibrado, en la Figura 49 y los datos utilizados en la Tabla 20.

Tabla 20. Concentraciones y áreas de los patrones de α -Terpineol en metanol.

| Concentración AA (mg L^{-1}) | Área (mUA) |
|---|------------|
| 1.0 | 9.8 |
| 5.0 | 61 |
| 10 | 129 |
| 25 | 282 |
| 50 | 628 |

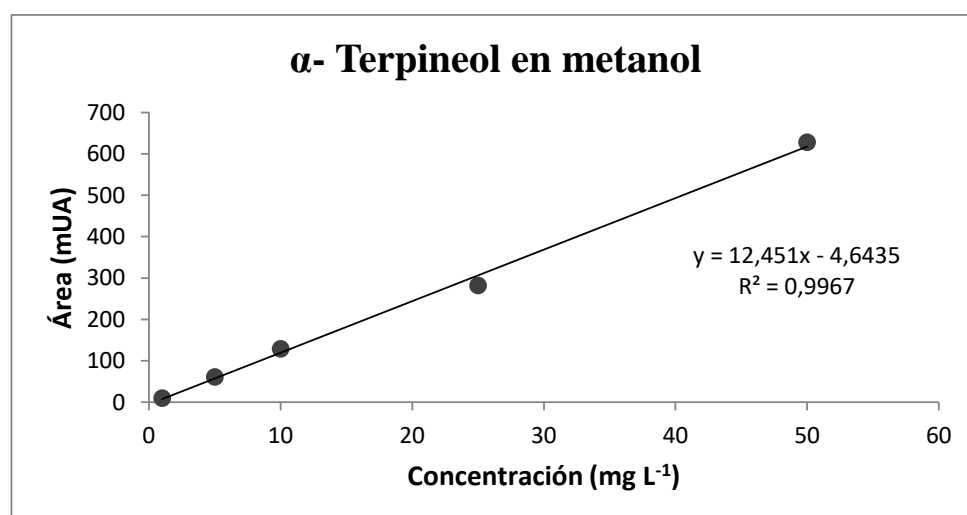


Figura 49. Línea de calibrado: patrones de α -terpineol en metanol.

En las condiciones indicadas, se obtiene para el α -terpineol un límite de detección, LOD de 0.37 mg L^{-1} y de cuantificación, LOQ de 1.2 mg L^{-1} .

4.2. Extracción del Aceite Esencial

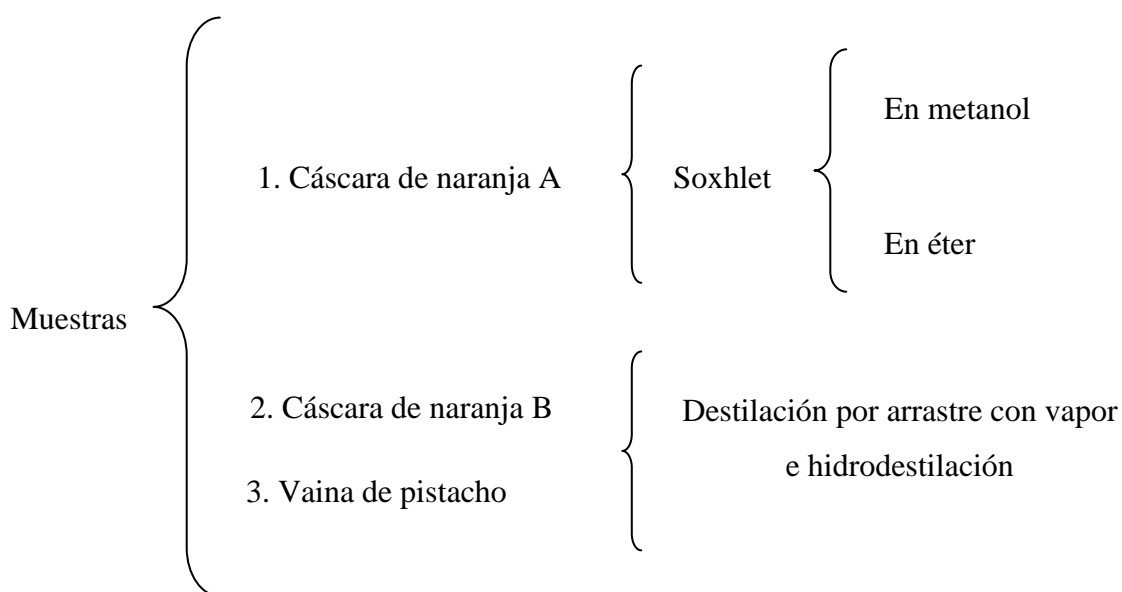
Muestras

Las muestras utilizadas en el ensayo fueron dos tipos diferentes de cáscaras de naranja (A y B) y vainas de pistacho, Figura 50. Todas ellas fueron conservadas envasadas al vacío en el congelador hasta que se procedió a su uso, para evitar así el deterioro de las mismas o la pérdida de componentes volátiles debido a la temperatura del ambiente. En el Esquema 1 se resumen la utilización de las técnicas empleadas para cada muestra.



Figura 50. Vaina de pistacho.

Esquema 1. Técnicas de extracción utilizadas para los diferentes tipos de muestra.



4.2.1. Extracción mediante Soxhlet.

Con la cáscara de naranja A, se realizaron dos extracciones independientes con dos disolventes de naturaleza diferente, en los cuales el α -terpineol es soluble, uno de ellos polar-prótico (metanol) y otro apolar-aprótico (éter) para observar la diferencias en los extractos extraídos con cada uno de ellos. Previamente a la extracción, la muestra se descongela a temperatura ambiente durante 24 h.

Se toma la cáscara de naranja y se corta en tamaño pequeño para facilitar el proceso de extracción. Las cantidades de naranja utilizadas en cada caso, se indican en la Tabla 21, se introduce la muestra en un cartucho de celulosa y se tapa este con algodón. El volumen de disolvente extractante utilizado es de unos 250 ml.

Tabla 21. Cantidades de cáscara de naranja A.

| Disolvente de la extracción | Cáscara de naranja A (gramos) |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| Metanol | 7.676 |
| Éter | 4.938 |

Se contabilizan 20 ciclos de extracción con una duración aproximado de 5 horas.

Por destilación simple se concentra el extracto obtenido en metanol hasta unos 30 ml y a continuación se lleva a un matraz de 50 ml y se enrasa con metanol. En la extracción con éter, se elimina este por destilación, el extracto se trata con hexano, se lleva a un matraz de 10 ml y se enrasa.

El extracto obtenido con éter tiene un color amarillento mientras que la extracción en metanol tiene un color anaranjado mucho más intenso. Esta diferencia de tonalidades se puede atribuir a los compuestos que se han extraído en cada caso, siendo en la extracción con metanol, compuestos más polares y en la de éter, apolares. Ambos extractos desprenden un fuerte olor a naranja.

4.2.2. Extracción mediante destilación por arrastre con vapor.

La extracción por arrastre con vapor se llevo a cabo con las muestras de cáscara de naranja B y la vaina de pistacho. El extracto obtenido será en este caso el aceite esencial.

a) Cáscara de naranja B

De acuerdo con el fundamento explicado del arrastre por vapor, el montaje para nuestro experimento consta de las partes mostradas en la Figura 51. Se utilizó un matraz redondo de 2 l para la zona de generación de vapor, que fue llenado con 1.5 L de agua destilada. El aporte de calor a los matraces se realizó a través de mantas calefactoras. En la zona de destilación, segundo matraz donde se encuentra la materia prima, se introdujo la muestra de cáscara de naranja previamente cortada y pesada, 95.7824 gramos. En la zona de condensación donde se encuentra el refrigerante se acoplo un sistema de recirculación con un baño termostatado y “dedo frío” para asegurar el condensado de los vapores. Se obtienen 1,1 ml de aceite esencial de naranja que se recogen en el embudo de presión compensada acoplado al refrigerante. La extracción por arrastre con vapor tuvo una duración de 3 h 30 min y otros 30 minutos más en los que se destiló el agua almacenada en el matraz central, considerándose como una hidrodestilación.

% AE de cáscara de naranja obtenido: 0.96 % (w/w).



Figura 51. Montaje de la extracción de arrastre por vapor.

El AE obtenido se llevo a dos disoluciones, una en hexano y otra en metanol.

b) Vaina de pistacho

Una vez puesta a punto el método de extracción utilizamos el mismo montaje con la vaina de pistacho e intercalaremos, de la misma manera, arrastre por vapor e hidrodestilación. Hacemos varias pruebas con diferentes cantidades de vaina de pistacho troceada obteniéndose volúmenes de AE mucho menores que los obtenidos en el caso de la naranja. Se obtiene un volumen del orden de 0.2 ml de AE de la vaina de pistacho para una muestra pesada de 64,8966 gramos. El AE se llevo a dos disoluciones, una en hexano y otra en metanol.

% AE de vaina de pistacho obtenido: < 0.1 %

4.3. Determinación de las muestras por cromatografía

Las muestras analizadas son los extractos obtenidos para cada una de las muestras, cáscara de naranja A, B y vaina de pistacho, siendo analizadas por HPLC-UV/Vis aquellas que fueron llevadas a una disolución de metanol y por GC-FID las respectivas en hexano.

4.3.1. Análisis por GC-FID de α -Terpineol en muestras.

En las determinaciones por este procedimiento, se utilizan las condiciones óptimas obtenidas en el análisis de los patrones de α -terpineol en hexano, condiciones B) Tabla 18. Con una temperatura para inyector y detector de 250 y 300 grados respectivamente.

Análisis de α -Terpineol en cáscara de naranja A

Se realiza la determinación del extracto de AE en hexano. Se obtiene un pico a 6,655 minutos que se corresponde con el α -Terpineol, Figura 52.

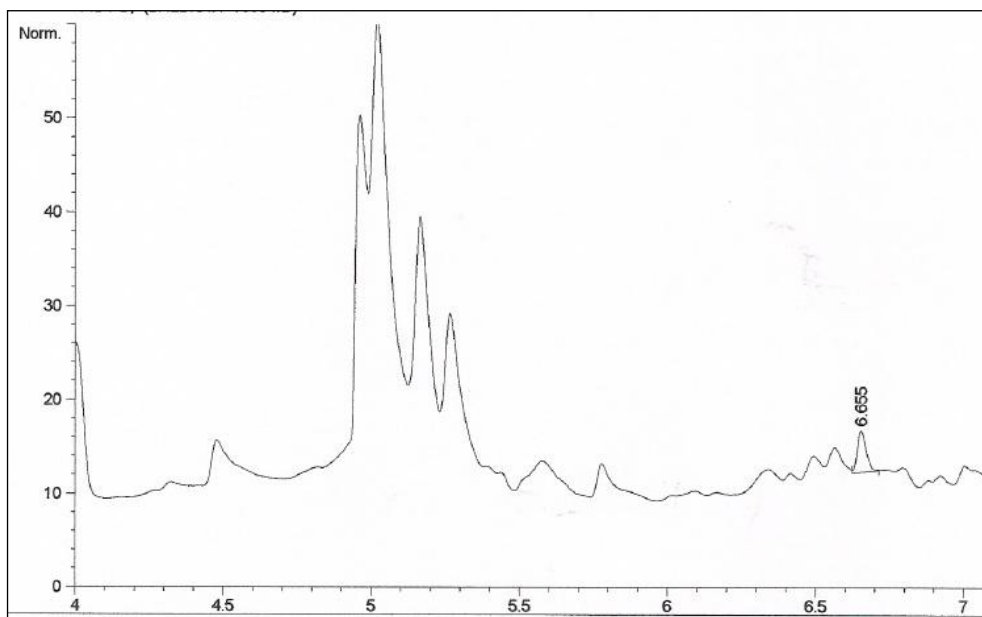


Figura 52. α -Terpineol de extracto de naranja A.

Análisis de α -Terpineol en cáscara de naranja B

La determinación del extracto de AE en hexano extraído mediante destilación por arrastre con vapor de agua, muestra un pico a un tiempo de 6.662 minutos, identificado como α -Terpineol, Figura 53.

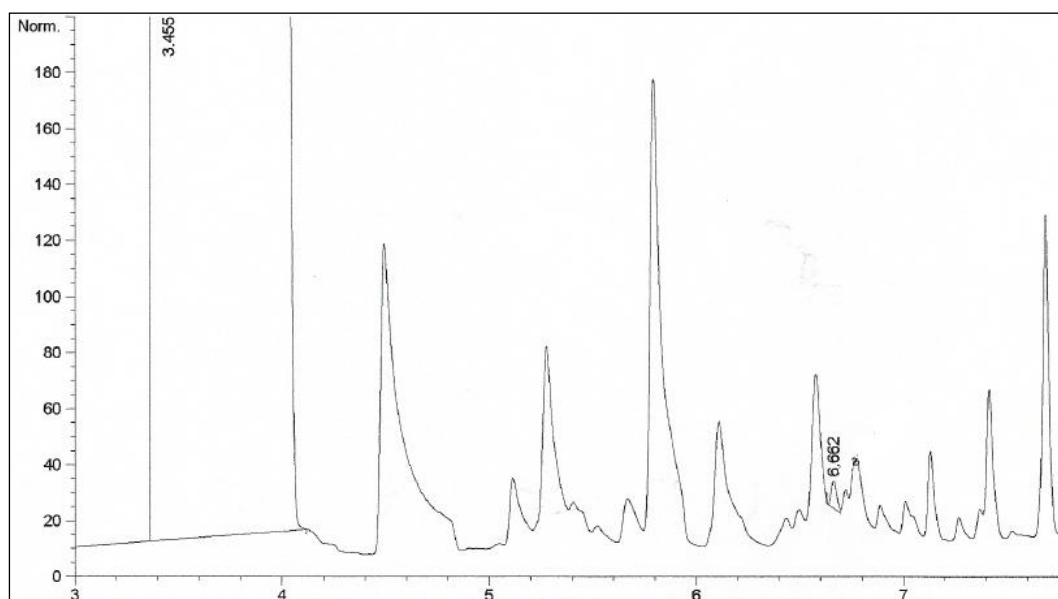


Figura 53. Extracto AE de cáscara de naranja B

Análisis de α -Terpineol en vaina de pistacho.

En este último caso, se muestra un pequeño pico pero apreciable a un tiempo de retención de 6.711 minutos identificado como α -Terpineol, Figura 54.

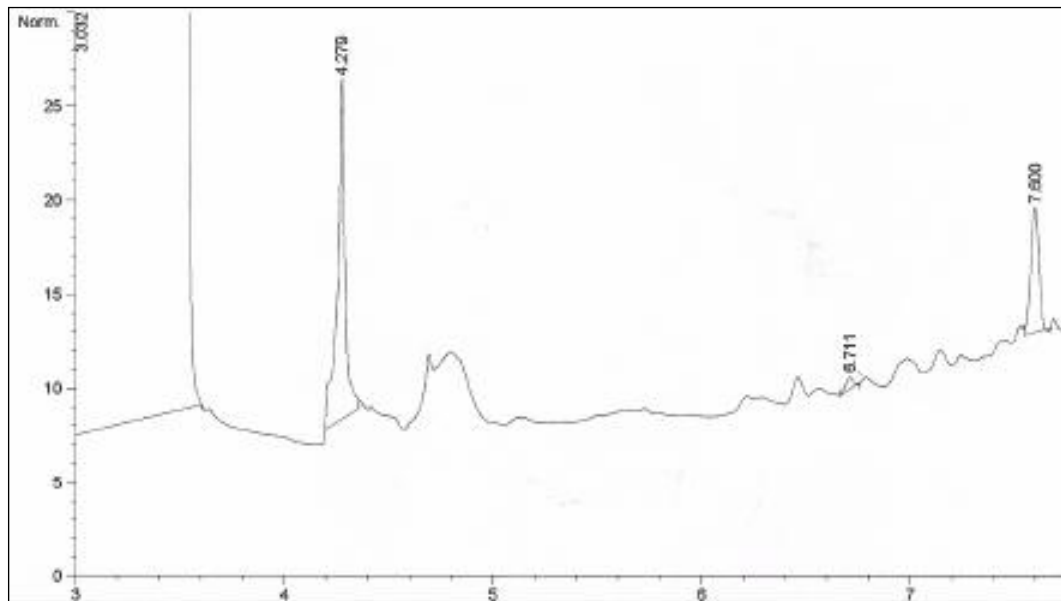


Figura 54. Extracto AE de vaina de pistacho.

No se procedió a la cuantificación de α -Terpineol mediante esta técnica, por la dificultad de aislar su respuesta, inferior al LOD, de otras procedentes de otros compuestos presentes en la muestra.

4.3.2. Análisis por HPLC-UV/Vis de α -Terpineol en muestras.

Se utilizan las condiciones, consideradas óptimas, en el estudio de patrones de α -terpineol en metanol, longitud de onda 210 nm para el detector UV/Vis y fase móvil: 70% Acetonitrilo, 30% agua.

Análisis del extracto de naranja A

En el extracto de cáscara de naranja A extraído en soxhlet en metanol, observamos un espectro complejo, con bastantes picos, pero en el que se puede apreciar perfectamente el correspondiente a 3,317 minutos, para confirmar su presencia añadimos cantidades crecientes

de un patrón, observando que el área de dicho pico aumenta progresivamente, Figura 55 y Figura 56 lo que confirma la presencia de α -terpineol en la cascara de naranja y la viabilidad del método utilizado.

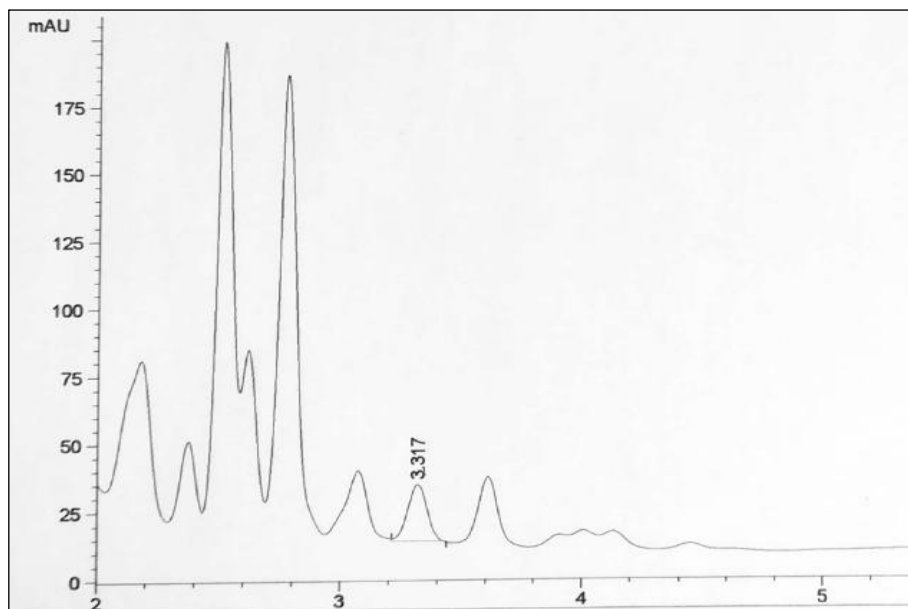


Figura 55. Extracto AE cascara de naranja A

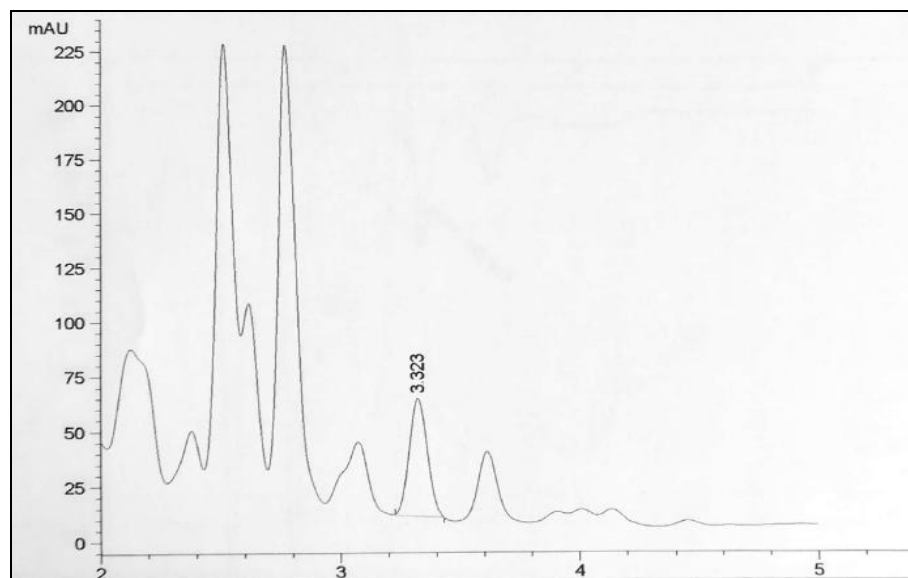


Figura 56. Extracto de AE cascara de naranja A + Patrón α -terpineol.

A partir de la línea calibrado para patrones de α -Terpineol en metanol, Figura 49 obtenemos para la muestra de cáscara de naranja, A una cantidad final de 65,27 mg/Kg de α -Terpineol.

Análisis de la muestra B de naranja

En este caso, AE de cáscara de Naranja B en metanol, extraída por arrastre con vapor de agua, se obtiene también cromatogramas con diferentes picos, pero en el que también se aprecia perfectamente el correspondiente al α -terpineol a 3,309 minutos, los resultados se reflejan en las Figura 58 y Figura 59.

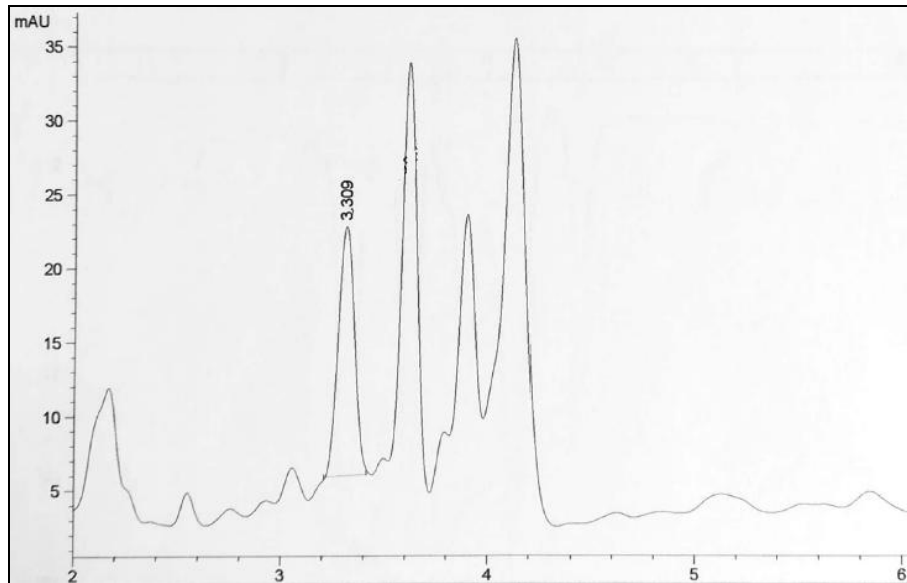


Figura 57. Cáscara de naranja B.

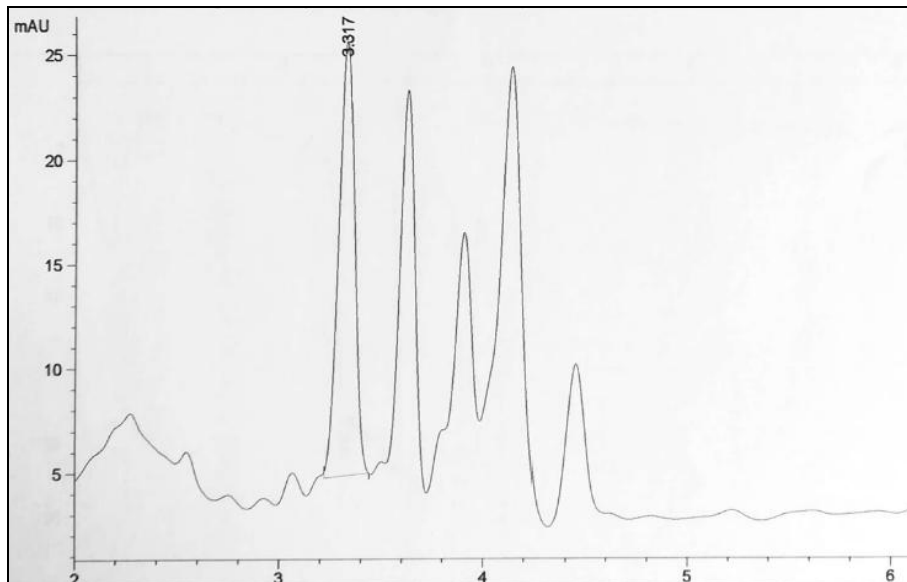


Figura 58. Muestra cáscara de naranja B + Patrón α -terpineol.

A partir de la línea de calibrado para patrones de α -Terpineol en metanol, se obtiene una concentración de este compuesto en la muestra de cáscara de naranja B de 22,28 mg/Kg.

Muestra de la vaina de pistacho

En el análisis de AE en la muestra la vaina de pistacho, no se observa ningún pico en el tiempo al que debería salir α -terpineol, para comprobar si la matriz pudiera interferir en la aparición del pico o en una variación en el tiempo de retención, realizamos adiciones de patrón de α -terpineol, apareciendo en este caso el pico correspondiente al compuesto a 3.3 minutos, por tanto concluimos que nuestra muestra de vaina de pistacho corresponde a una variedad que contiene este componente entre sus compuestos del aceite esencial en una proporción tan baja que no alcanza el límite de detección de nuestro procedimiento de análisis de 0.3 mg L^{-1} , aunque también puede haber influido el bajo rendimiento de su extracción.

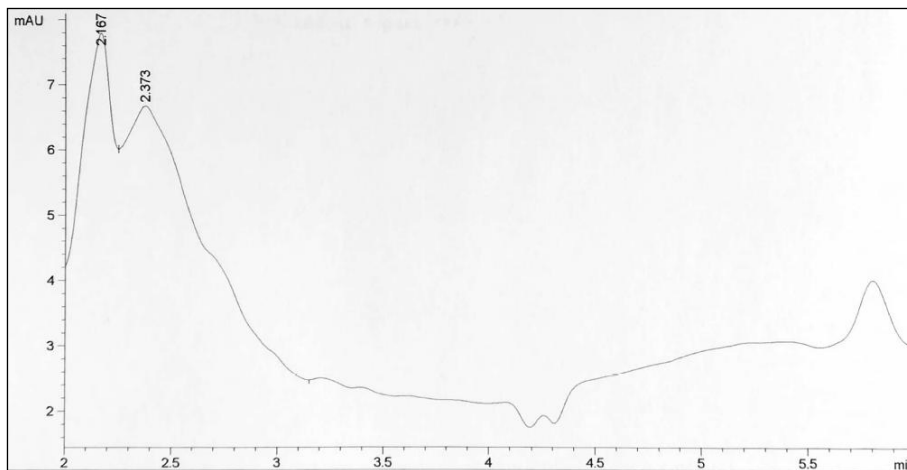


Figura 59. AE de pistacho en metanol.

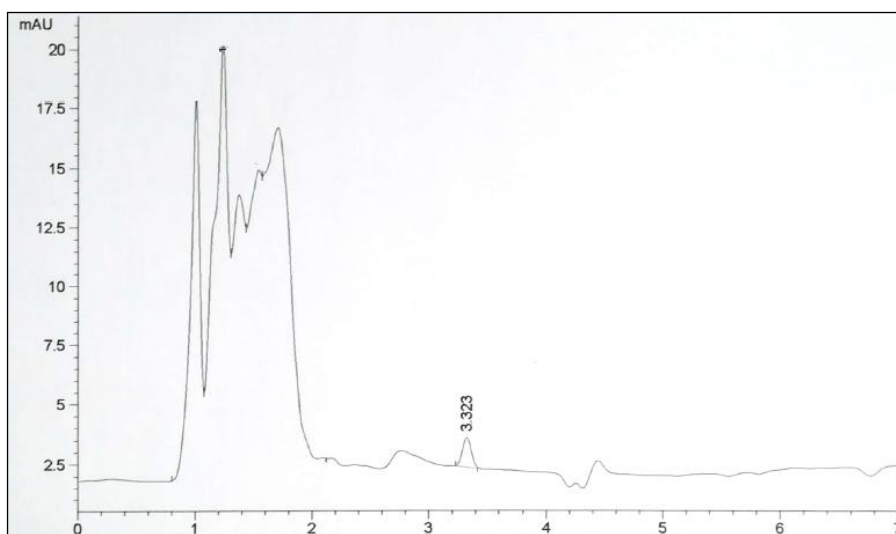


Figura 60. AE Pistacho mas patrón de terpineol

5. CONCLUSIONES

- Se ha logrado poner a punto un método para la determinación de α -Terpineol en HPLC-UV/Vis y GC-FID con un límite de detección inferior a 0.3 mg L^{-1} en la cromatografía de gases y 0.4 mg L^{-1} para la cromatografía de líquidos, no excediendo de tiempos de análisis de 8 y 5 minutos respectivamente.
- Se ha conseguido la extracción de AE de naranja mediante destilación por arrastre con vapor y se ha obtenido AE de cáscara de naranja B en un porcentaje de 0.96% (w/w). En cuanto a la muestra de vaina de pistacho se han obtenido cantidades inferiores.
- En el estudio de las muestras extraídas y analizadas por HPLC-UV/Vis se ha comprobado que las cáscaras de naranja utilizadas contienen α -Terpineol, en concentraciones de $64,4 \text{ mg Kg}^{-1}$ y $23,2 \text{ mg Kg}^{-1}$ respectivamente, y concentraciones no detectables para el AE de vaina de pistacho.
- En el estudio por GC-FID de los extractos de las muestras se han encontrado cantidades detectables α -terpineol para todas las muestras de, aunque el solapamiento de picos debido a la cantidad de compuestos presentes en las disoluciones extraídas, no ha permitido la cuantificación.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. G. Read, “ACRILAMIDA,” 2011.
- [2] M. C. Hurtado *et al.*, “Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas,” *Rev. del Com. científico la AECOSAN*, vol. 26, 2017.
- [3] “Grado en enfermería,” 2017.
- [4] A. Claus, R. Carle, and A. S. Ñ, “Acrylamide in cereal products : A review,” vol. 47, pp. 118–133, 2008.
- [5] P. L. Masson *et al.*, “Acrilamida en patatas fritas : Revisión actualizada,” 2002.
- [6] N. Sundaraganesan, N. Puviarasan, and S. Mohan, “Vibrational spectra , assignments and normal coordinate calculation of acrylamide,” vol. 54, pp. 233–241, 2001.
- [7] Q. Org, “Por Arrastre Con Vapor De Agua),” no. 1311, pp. 80–87.
- [8] M. El, “Actividad in Vitro Anti- Candida Y Anti- Aspergillus De Aceites,” no. 33, pp. 247–249, 2007.
- [9] K. Ochoa Pumaylle, L. R. Paredes Quiroz, D. L. Bejarano Luján, and R. J. Silva Paz, “Extracción, caracterización y evaluación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de Senecio graveolens Wedd (Wiskataya),” *Sci. Agropecu.*, vol. 3, pp. 291–302, 2012.
- [10] S. Kordali, R. Kotan, A. Mavi, A. Cakir, A. Ala, and A. Yildirim, “Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of Artemisia dracunculus” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 53, no. 24, pp. 9452–9458, 2005.
- [11] I. Chaieb, K. Zarrad, R. Sellam, and W. Tayeb, “Chemical composition and aphicidal potential of Citrus aurantium peel essential oils,” vol. 37, no. 1, pp. 63–75, 2018.
- [12] M. A. Ferhat, B. Y. Meklati, and F. Chemat, “Comparison of different isolation methods of essential oil from Citrus fruits : cold pressing , hydrodistillation and

- microwave ‘ dry ’ distillation,” pp. 494–504, 2007.
- [13] T. Chahed *et al.*, “Comparison of pistachio hull essential oils from different Tunisian localities Comparison of pistachio hull essential oils from different tunisian localities,” no. August 2014, 2007.
- [14] T. Chahed, W. Dhifi, K. Hosni, K. Msaada, M. E. Kchouk, and B. Marzouk, “Composition of Tunisian Pistachio Hull Essential Oil during Fruit Formation and Ripening,” vol. 20, no. April, pp. 2006–2009, 2008.
- [15] M. Sciences, “I n Vi tro Eval uati on of the A nti oxi dant , Cytoprocti ve , and A nti mi crobi al Properti es of Essenti al Oi l f rom Pi st aci a vera L . Vari ety Bronte H ul l,” 2017.
- [16] M. Z. Ozel, F. Gogus, J. F. Hamilton, and A. C. Lewis, “The Essential Oil of Pistacia vera L . at Various Temperatures of Direct Thermal Desorption Using Comprehensive Gas Chromatography Coupled with Time-of-Flight Mass Spectrometry,” no. 1, pp. 79–83, 2004.
- [17] M. Musterman, P. Placeholder, C. Khaleel, N. Tabanca, G. Buchbauer, and M. Musterman, “monoterpene : A review of its What Is So Different About Was ist so anders am Neuroenhancement ?,” vol. 1, no. 2, 2018.
- [18] S. Held, P. Schieberle, and V. Somoza, “Characterization of α -terpineol as an anti-inflammatory component of orange juice by in vitro studies using oral buccal cells,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 55, no. 20, pp. 8040–8046, 2007.
- [19] S. T. Chang and S. S. Cheng, “Antitermitic activity of leaf essential oils and components from Cinnamomum osmophleum,” *J. Agric. Food Chem.*, vol. 50, no. 6, pp. 1389–1392, 2002.
- [20] C. K. B. Sabino *et al.*, “Cardiovascular effects induced by α -terpineol in hypertensive rats,” *Flavour Fragr. J.*, vol. 28, no. 5, pp. 333–339, 2013.
- [21] S. Giovanna and G. Palma, “Comparación de dos métodos de extracción de aceite esencial,” 2003.

Páginas Web

(1) <https://www.iarc.fr/>

(2) <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide>

(3) <http://www.fao.org/food-safety-quality/scientific-advice/jefsa/es/>

Libros

¹. M. Ortuño Sánchez, *Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes*, Aiyana, 2006.

ABREVIATURAS

HPLC Cromatografía de líquidos de alta eficacia

GC Cromatografía de gases

FID Detector de ionización de llama

UV-Vis Ultravioleta visible

AA Acrilamida

AE Aceite esencial

NFA Administración nacional alimentos de Suecia

IARC Agencia internacional de investigación cáncer

EFSA Autoridad Europea de seguridad alimentaria

OMS Organización mundial de la salud

JEFSa Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios

Asn Asparagina

ACN Acetonitrilo

ANEXOS

PARTE I. ACRILAMIDA

CROMATOGRAFÍA DE GASES (GC-FID)

- Patrones de acrilamida en metanol.

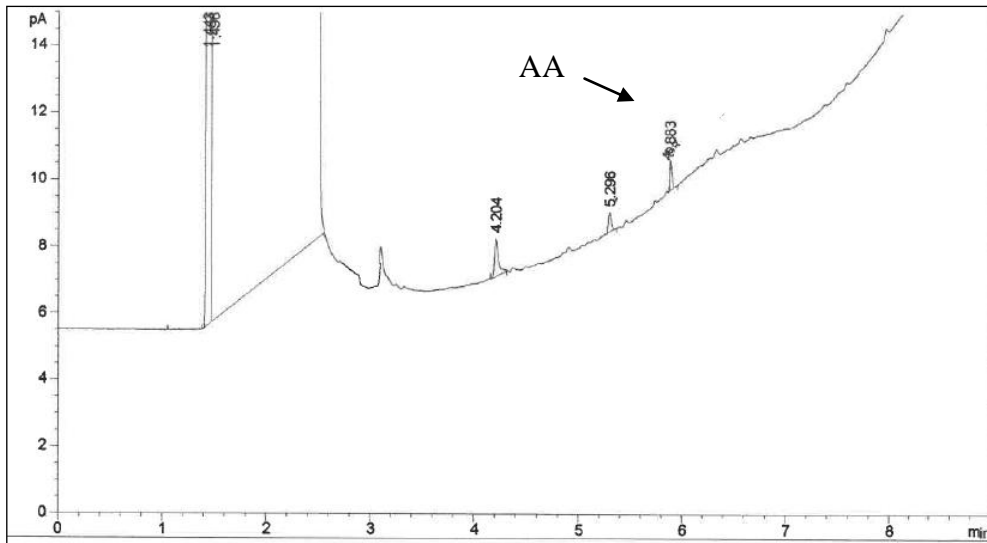


Figura 61. Patrón de AA en metanol 0.4 ppm, condiciones rampa d) tabla 2.

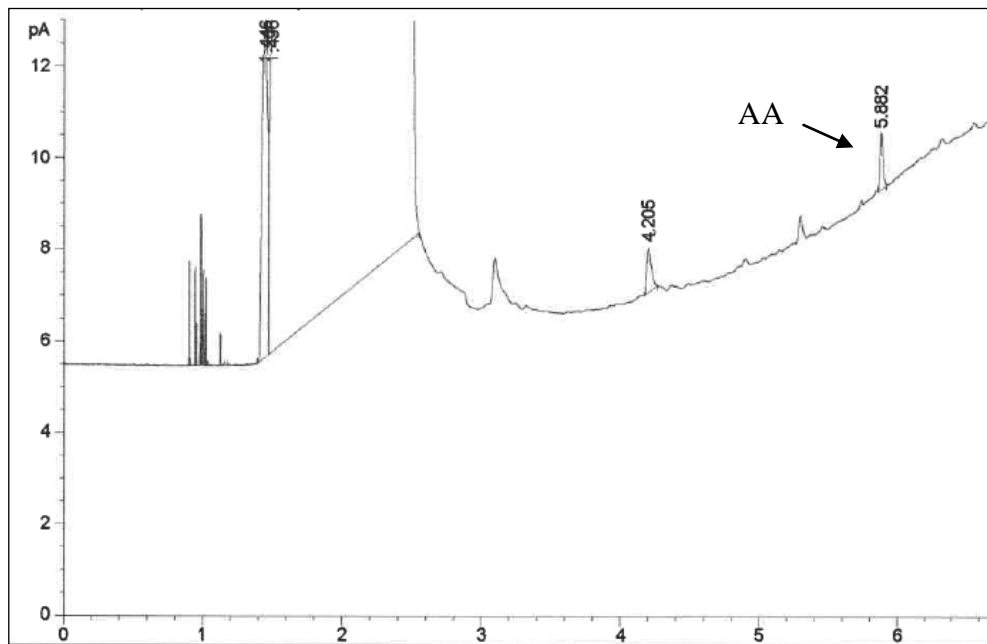


Figura 62. Patrón de AA en metanol, 0.8 ppm, condiciones rampa d) tabla 2.

- Patrones de acrilamida en acetonitrilo.

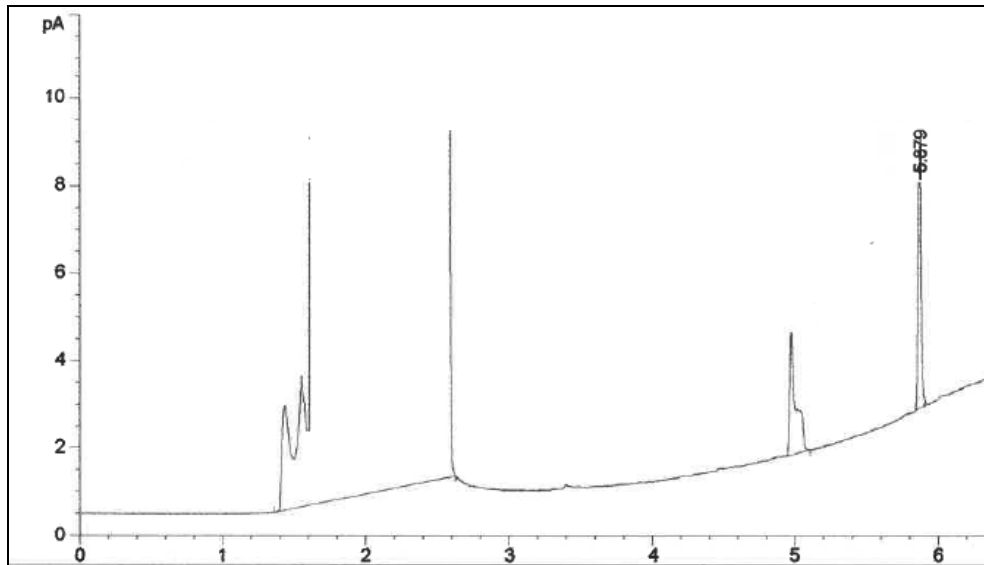


Figura 63. Patrón de Acrilamida en ACN, 5 mg L⁻¹, condiciones d) tabla 2.

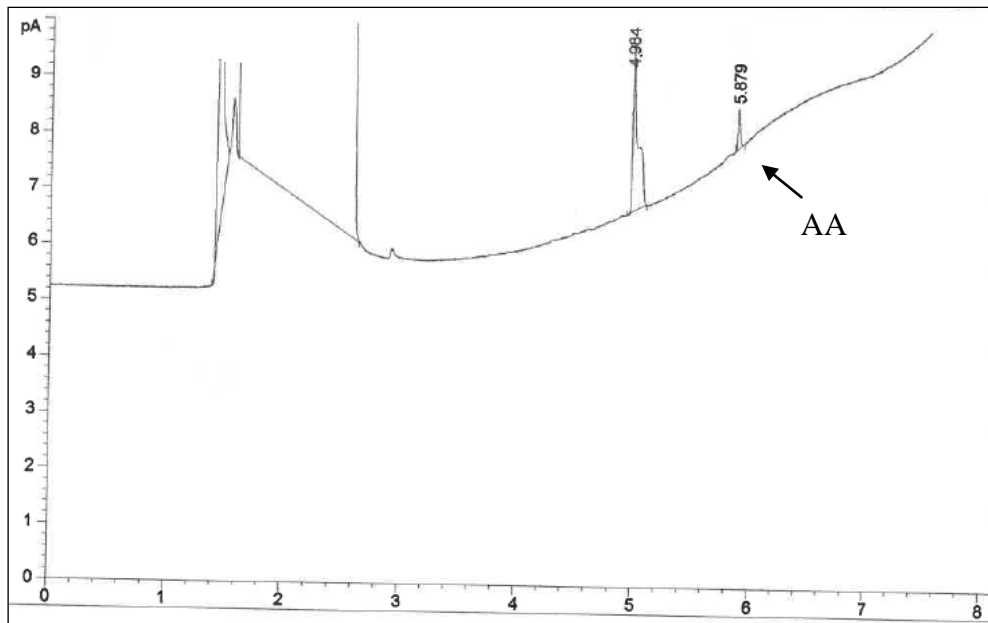


Figura 64. Patrón de AA en ACN 0,5 ppm, condiciones d) tabla 2.

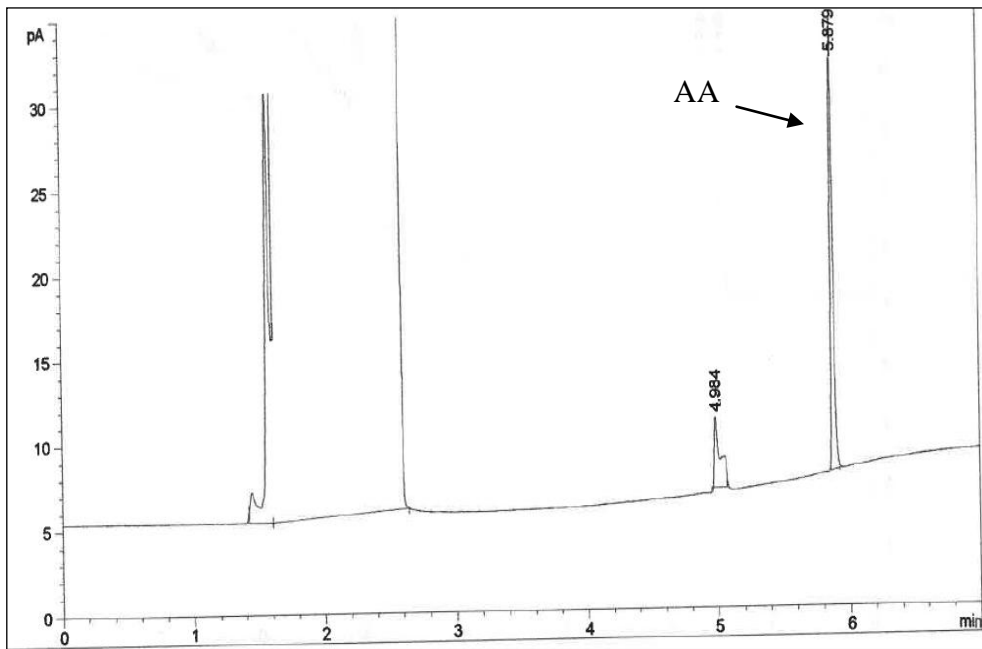


Figura 65. Patrón de AA en Acetonitrilo, 20 ppm. Condiciones c) tabla 2.

CROMATOGRAFÍA LIQUIDA DE ALTA EFICACIA (HPLC-UV/Vis)

- Patrones de acrilamida en agua, fase móvil 60% agua 30% acetonitrilo 10% metanol.

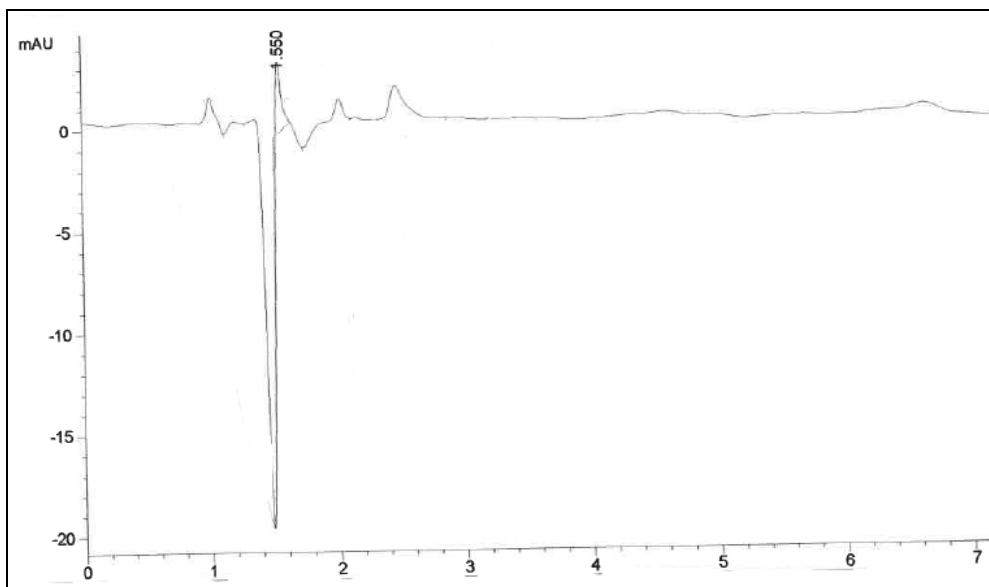


Figura 66. Patrón de AA en agua, 0,1 ppm.

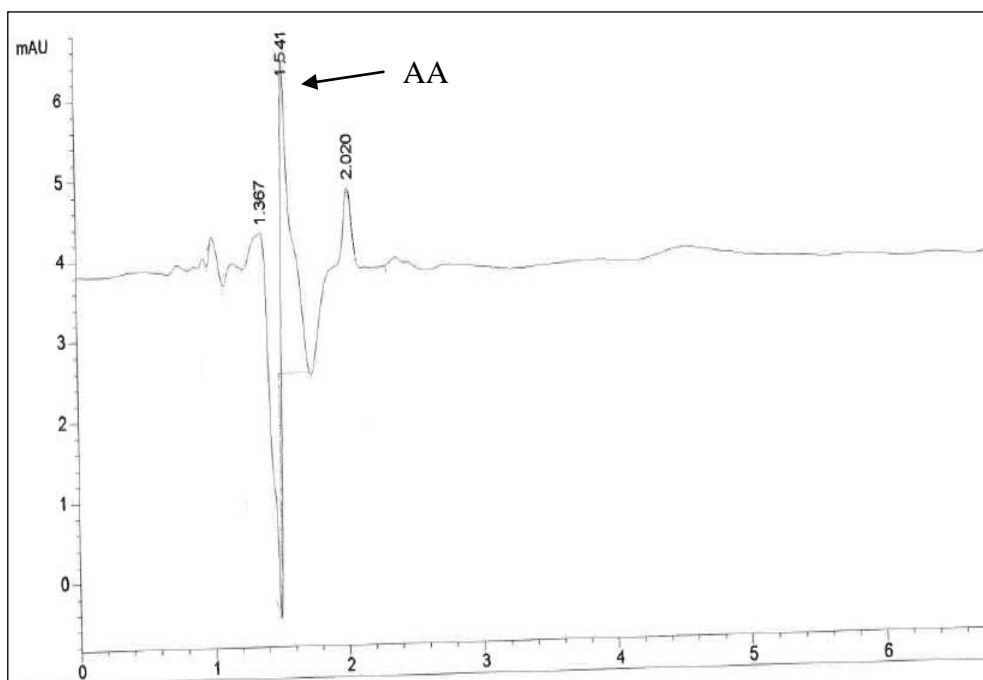


Figura 67. Patrón de AA en agua, 0,2 ppm.

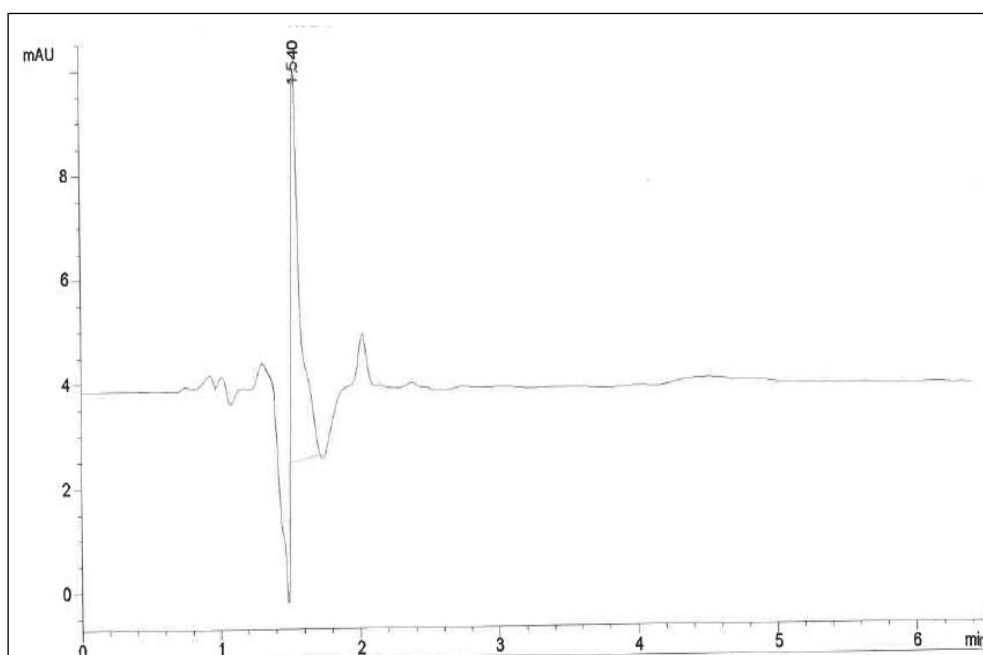


Figura 68. Patrón de AA en agua, 0,4 ppm.

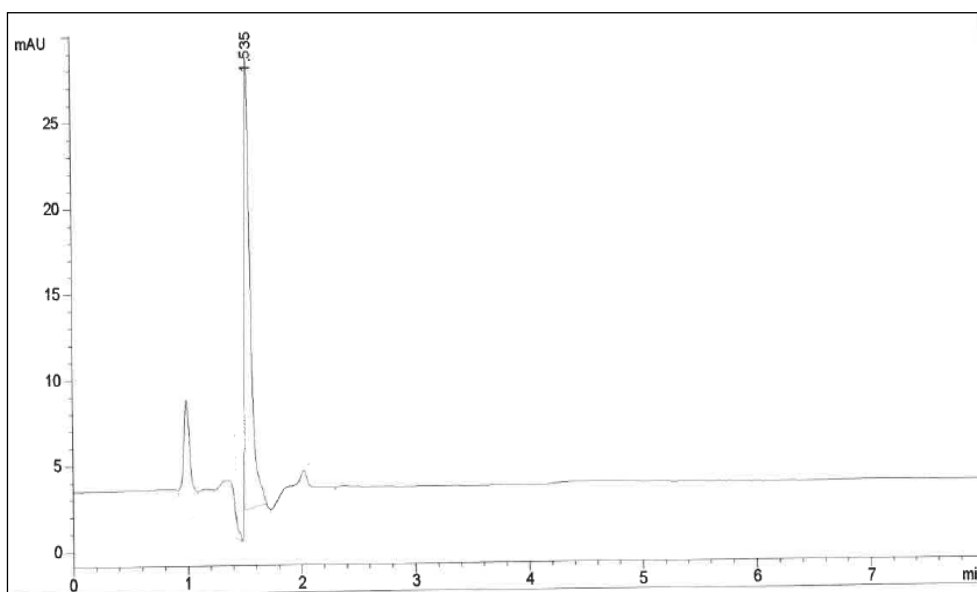


Figura 69. Patrón de AA en agua, 1 ppm.

- Patrones de acrilamida en agua, fase móvil 90% agua 10% acetonitrilo.

Tabla 22. Concentraciones y área de patrones de AA en agua. Fase móvil: 90:10 Agua: Acetonitrilo.

| Concentración (mg L ⁻¹) | Área (mAU) |
|-------------------------------------|------------|
| 50 | 4705,55 |
| 25 | 2363 |
| 10 | 945,3 |
| 5 | 475,5 |
| 4 | 376,09 |
| 1 | 89,29 |

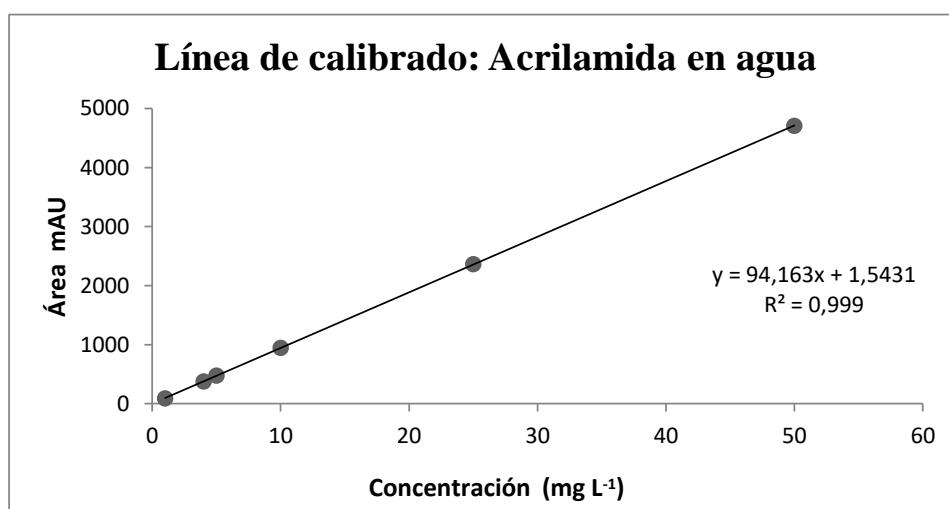


Figura 70. Línea de calibrado para patrones AA en agua. Fase móvil 90% Agua 10% acetonitrilo.

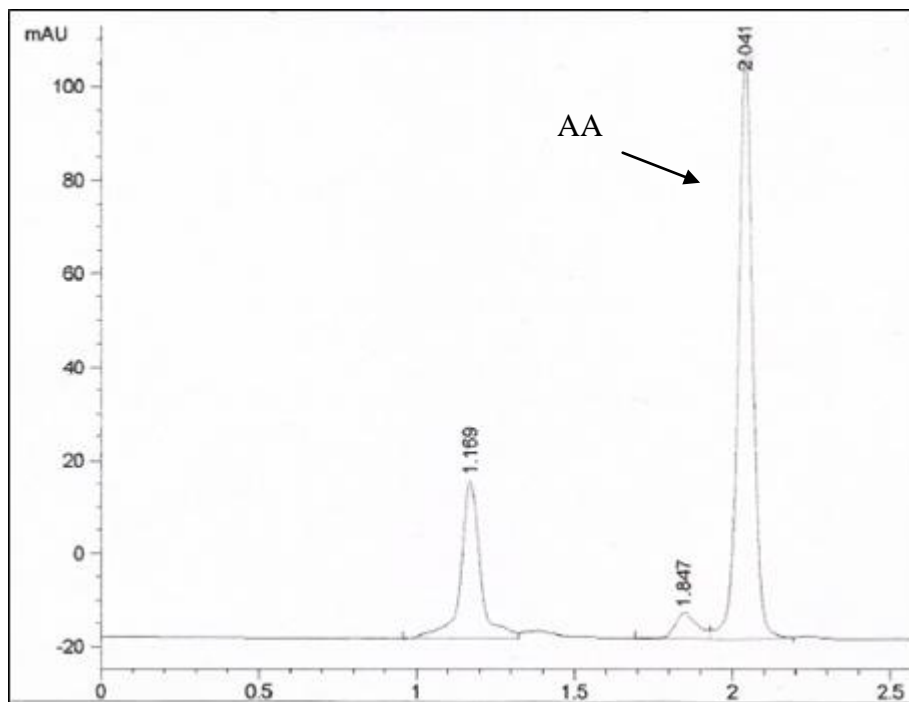


Figura 71. Patrón de AA en agua, 4 mg L⁻¹. Fase móvil 90:10 agua acetonitrilo.

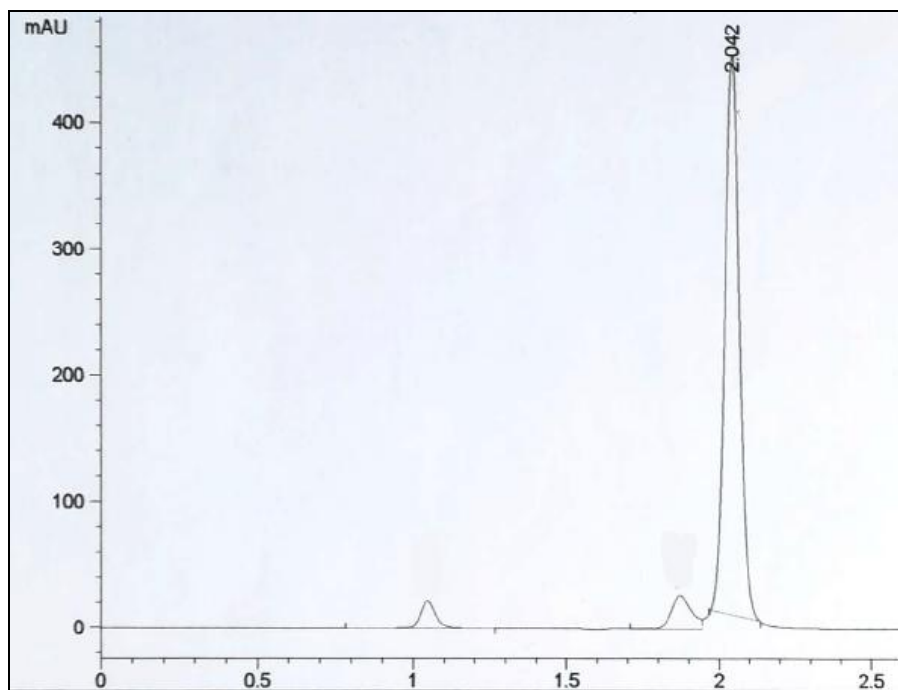


Figura 72. Patrón de AA en agua, 10 mg L⁻¹. Fase móvil 90:10 agua acetonitrilo

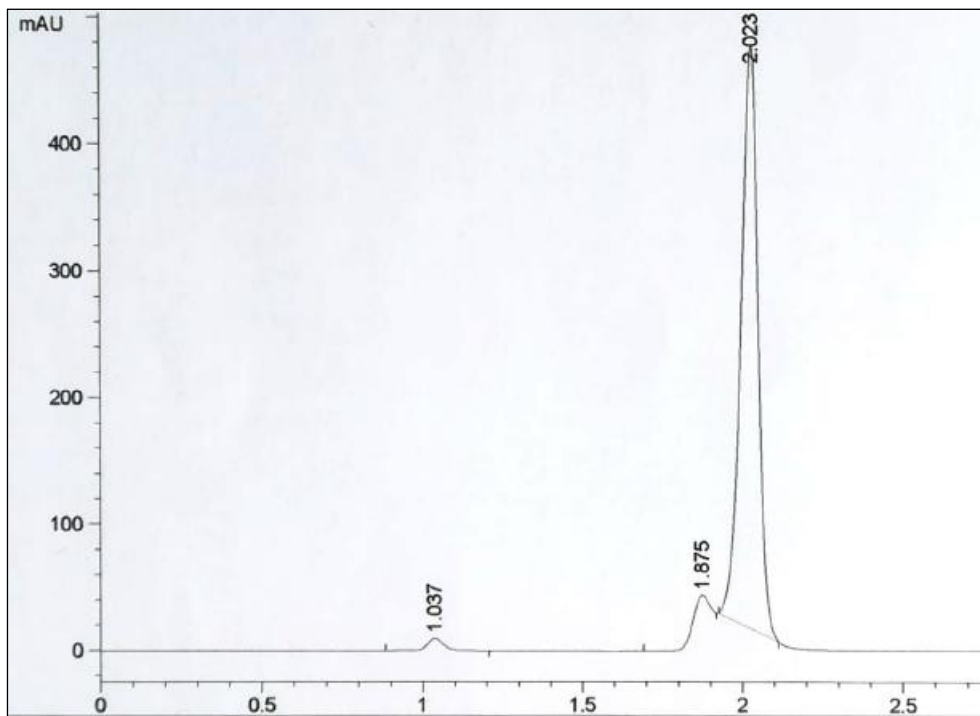


Figura 73. Patrón de AA en agua, 25 mg L-1. Fase móvil 90:10 agua acetonitrilo.

- Patrones de acrilamida en metanol.

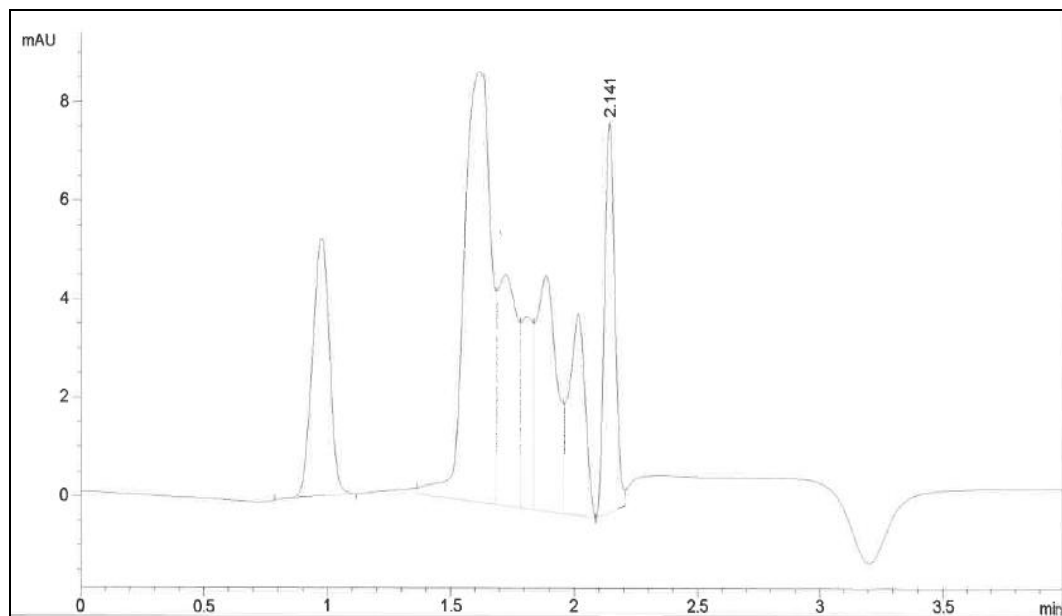


Figura 74. Patrón de AA en metanol, 0.4 ppm.

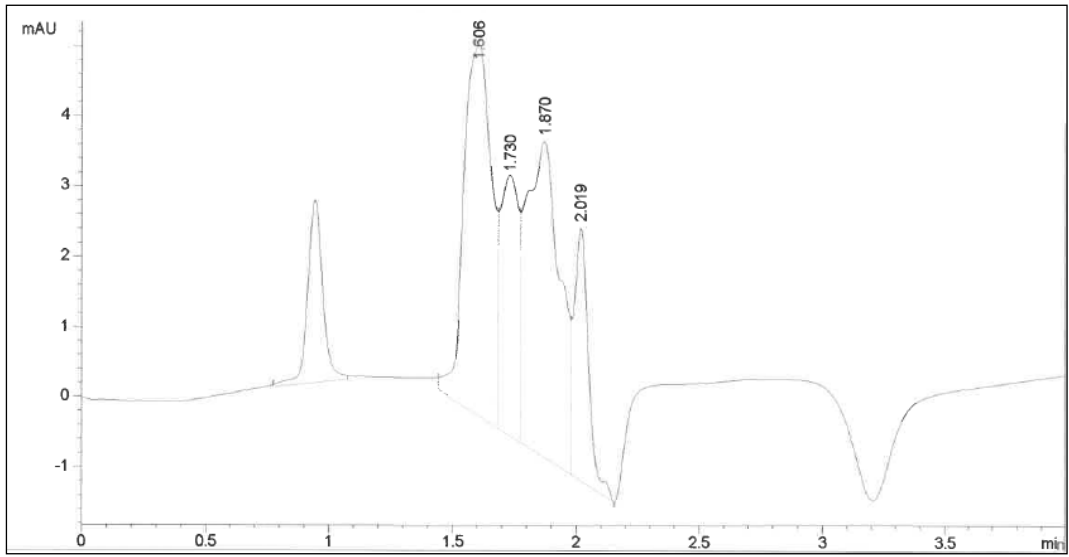


Figura 75. Patrón de AA en metanol 0.1 ppm.

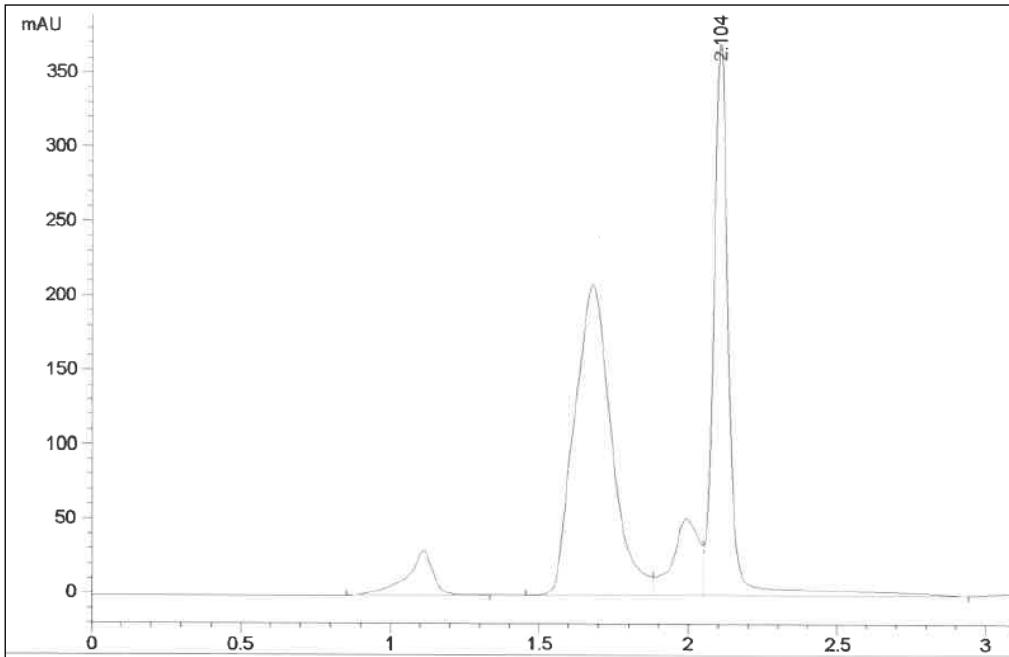


Figura 76. Patrón de AA en metanol 25 ppm.

- HPLC-UV/Vis de muestras de acrilamida.

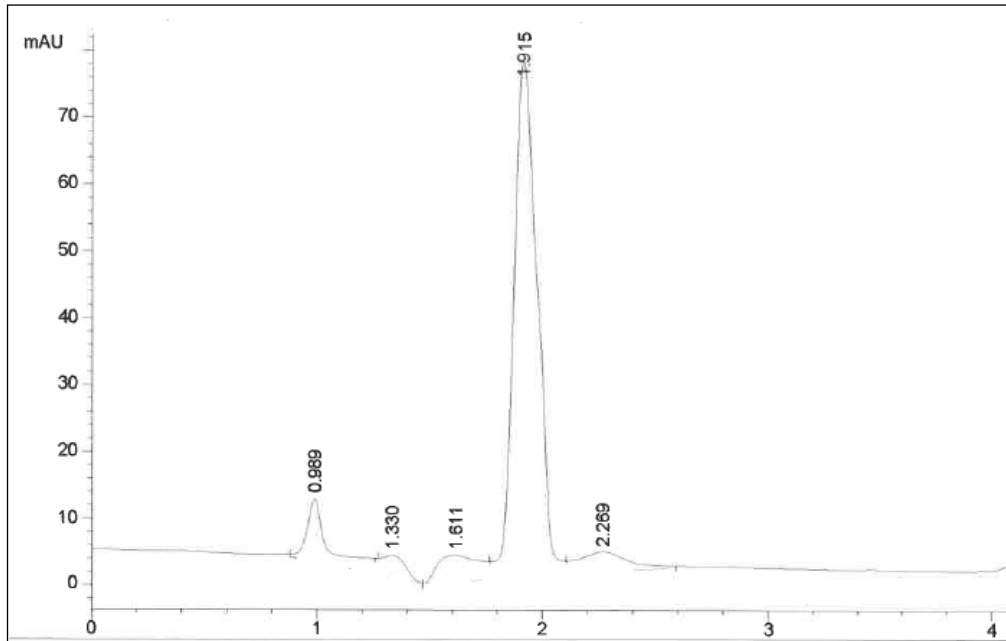


Figura 77. Extracción "Carrez" disolución Agua acetona 80:20.

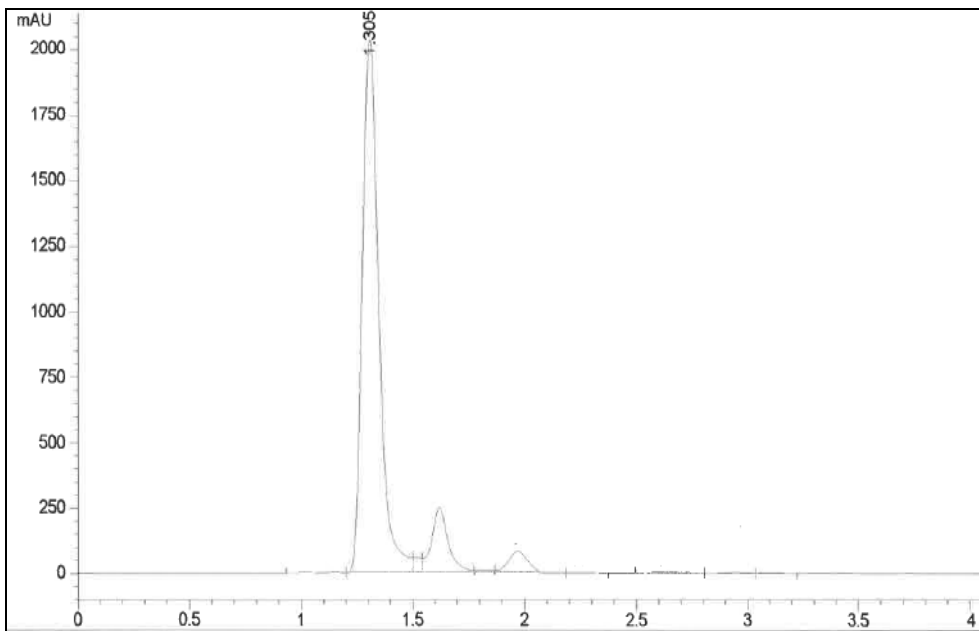


Figura 78. Extracción "Carrez", disolución Carrez I y Carrez II.

- ESPECTROSCOPIA RAMAN

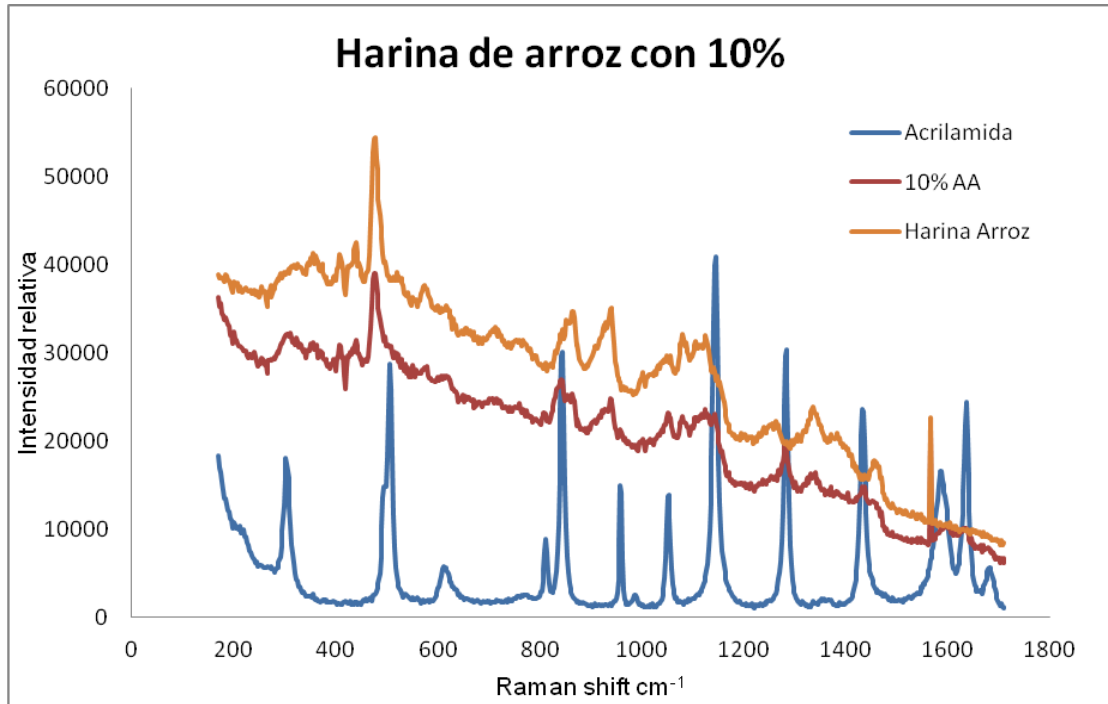


Figura 79. Espectro Raman muestra de harina de arroz con un 10% AA

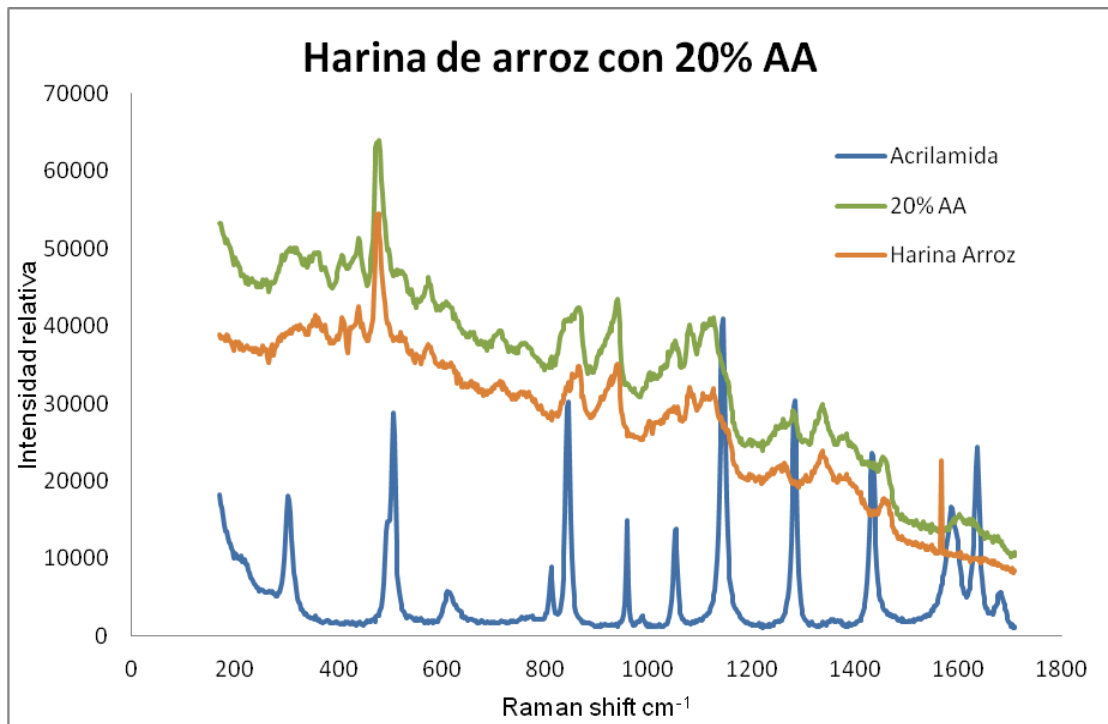


Figura 80. Espectro Raman muestra de harina de arroz con un 20% AA

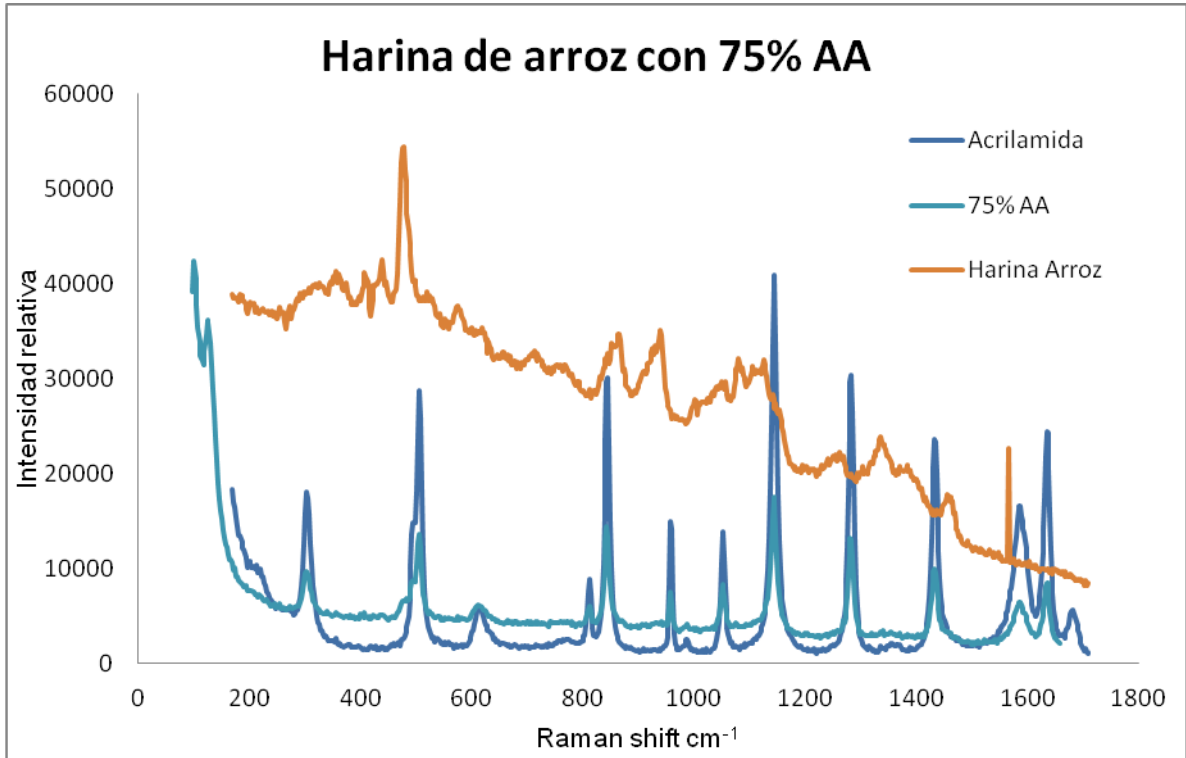


Figura 81. Espectro Raman muestra de harina de arroz con un 75% AA

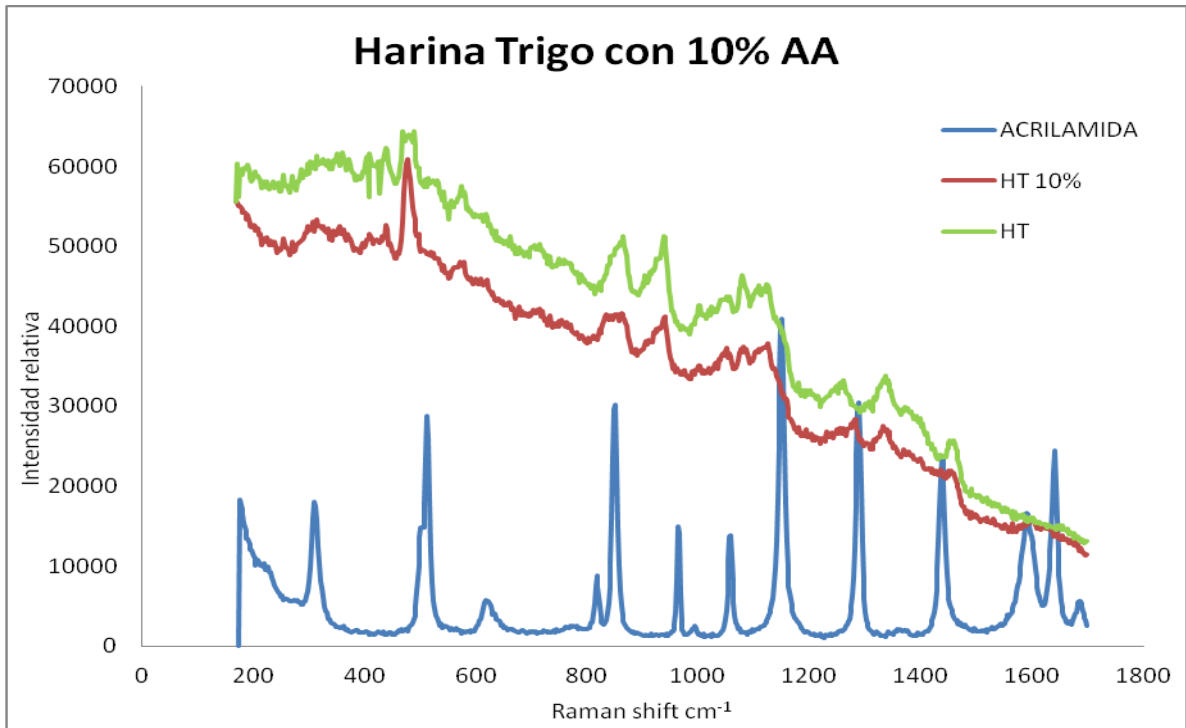


Figura 82. Espectro Raman muestra de harina de trigo con un 10% AA -1

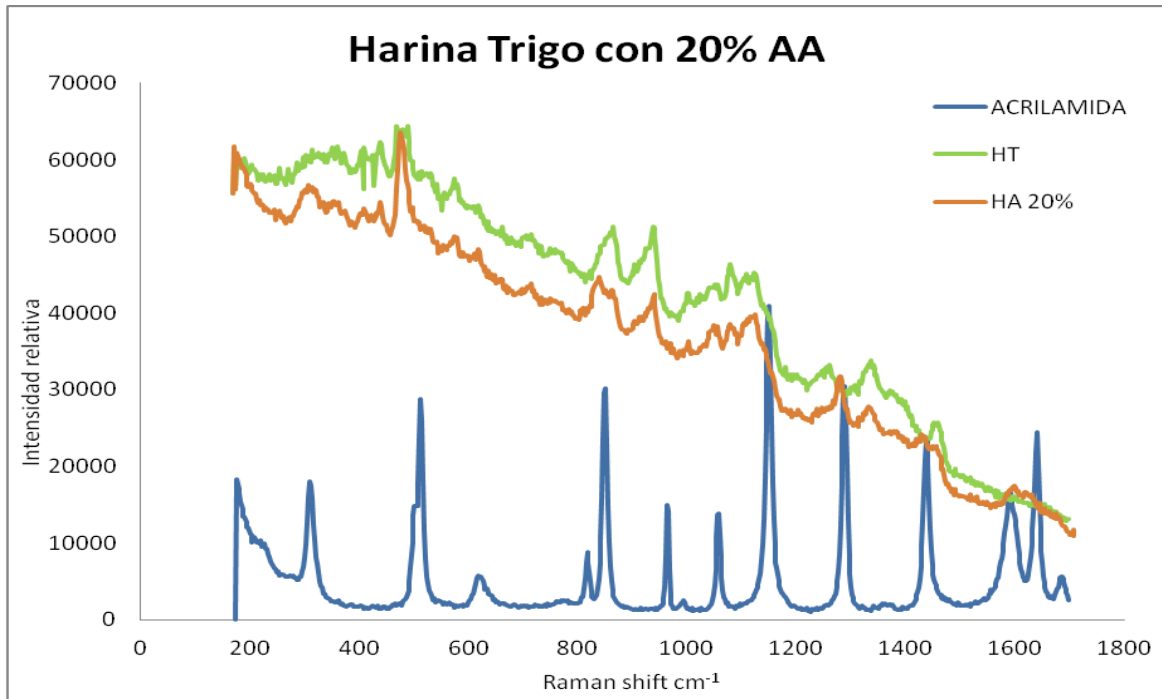


Figura 83. Espectro Raman muestra de harina de trigo con un 20% AA

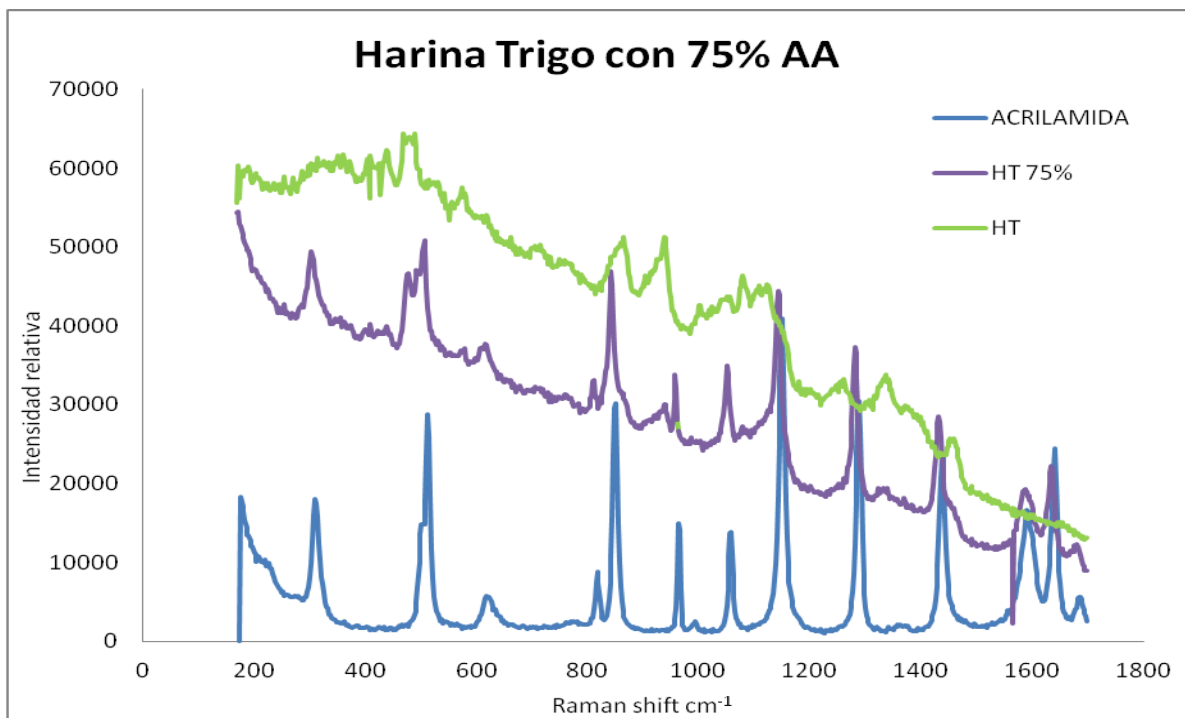


Figura 84. Espectro Raman muestra de harina de trigo con un 75% AA

PARTE II. ACEITES ESENCIALES

- Extracción por arrastre con vapor de agua.



Figura 85. AE de cáscara de naranja B, por destilación por arrastre con vapor.

- HPLC-UV/Vis Patrones de terpineol en metanol, fase móvil 30% agua 70% ACN.

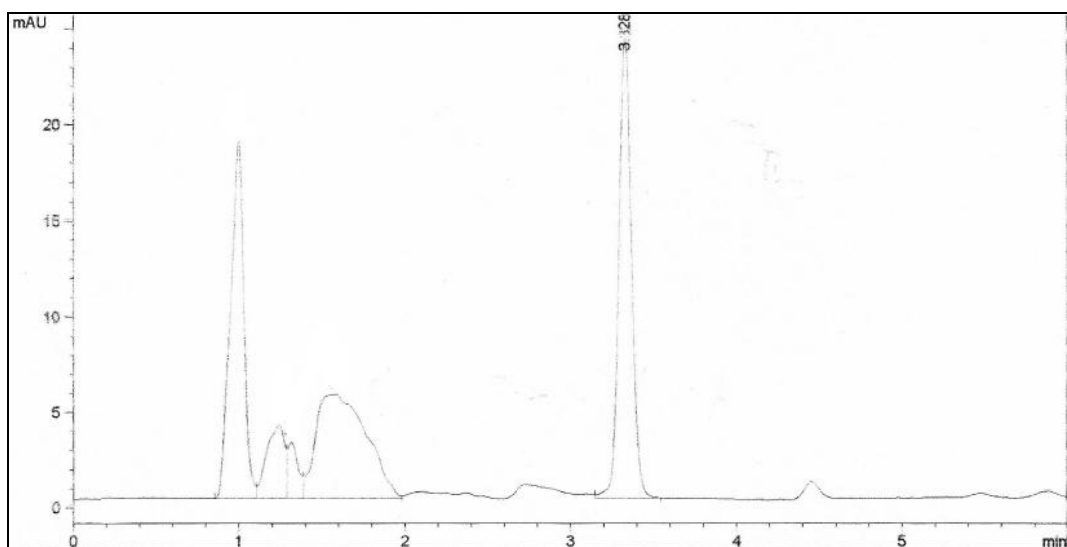


Figura 86. Patrón terpineol 10 ppm.

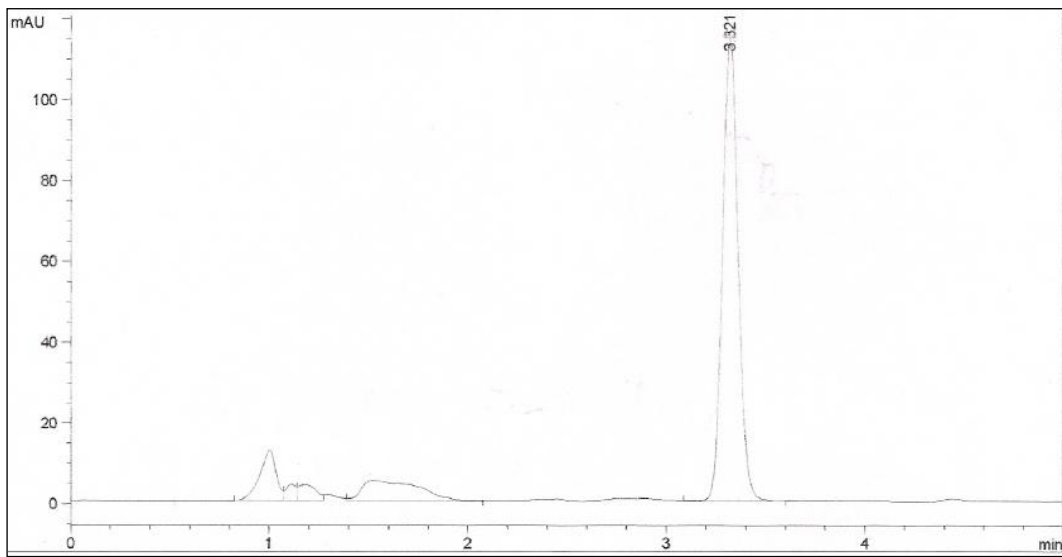


Figura 87. Patrón terpineol 50 ppm.

- CROMATOGRAFÍA DE GASES (MUESTRAS)

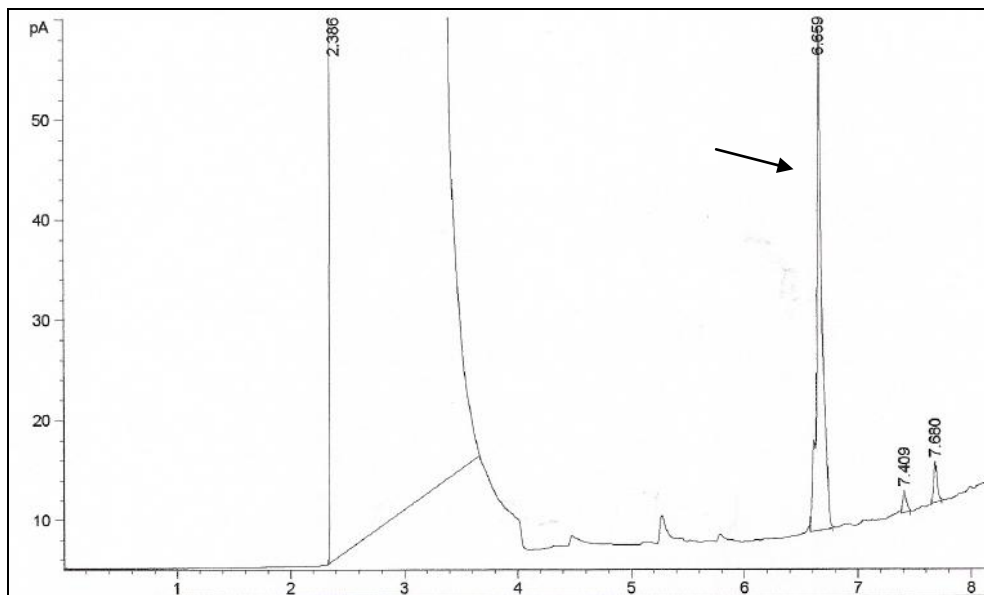


Figura 88. Extracto de AE de cáscara de Naranja A en hexano + patrón α -Terpineol 100 ppm.

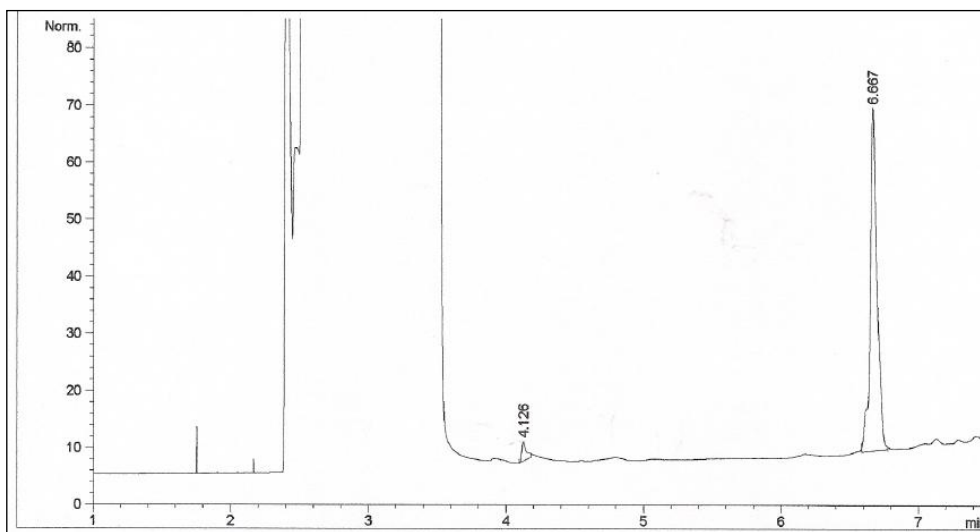


Figura 89. AE pistacho GC + patrón terpineol