



Universidad de Valladolid

Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Química

**Estudio para la determinación de amigdalina en alimentos
como compuesto que influye en el sabor de los mismos**

Autor: Paola Ibáñez García

Tutor/es:

Dr. Luis Deban Miguel y Dra. María Isabel Campos Labadie

(Departamento de Química Analítica)

Índice

1. Resumen/ Abstract	12
2. Introducción	14
2.1. Introducción.....	14
2.2. Justificación del trabajo.....	15
2.3. Características físico-químicas del compuesto.....	15
2.4. Objetivos del trabajo.....	16
3. Técnicas utilizadas	18
3.1. Espectroscopia por absorción molecular UV-VIS.....	18
3.2. Espectroscopia de fluorescencia.....	18
3.3. Espectroscopia Raman.....	18
3.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	19
4. Antecedentes bibliográficos	21
5. Reactivos y equipos empleados	24
6. Parte experimental y resultados	27
6.1. Espectroscopia UV/VIS.....	27
6.1.1. Estudio respecto a la concentración.....	27
6.1.2. Estudio con respecto al tiempo.....	28
6.2. Espectroscopia de fluorescencia.....	29
6.3. Espectroscopia Raman.....	31
6.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	34
6.4.1. Estudio de la fase móvil.....	34
6.4.2. Calibrado de la disolución de amigdalina preparada en metanol.....	39
6.4.3. Determinación de amigdalina en extracciones de almendras dulces.....	40
6.4.4. Método de adiciones patrón para las almendras dulces.....	42
6.4.5. Determinación de amigdalina en extracciones de almendras amargas.....	45
6.4.6. Determinación de amigdalina en almendras amargas con Soxhlet.....	46
6.4.7. Determinación de amigdalina en extracciones con manzanas.....	49
6.4.8. Determinación de amigdalina en extractos de pasiflora.....	52
7. Conclusiones	56

8. Anexo	58
8.1. Espectroscopia Raman.....	58
8.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).....	62
8.2.1. Estudio de la fase móvil.....	62
8.2.2. Calibrado de la disolución de amigdalina preparada en metanol.....	72
8.2.3. Determinación de amigdalina en extracciones de almendras dulces.....	75
8.2.4. Método de adiciones patrón para las almendras dulces.....	80
8.2.5. Determinación de amigdalina en extracciones de almendras amargas.....	82
8.2.6. Determinación de amigdalina en almendras amargas con Soxhlet.....	86
9. Bibliografía	88

Índice de figuras

Figura 2.1	Estructura química de la amigdalina.....	14
Figura 6.1	Elección de la longitud de onda de la amigdalina.....	27
Figura 6.2	Espectro de la amigdalina (21,6 ppm).....	27
Figura 6.3	Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración.....	28
Figura 6.4	Comparación de patrones.....	29
Figura 6.5	Espectro de excitación (amigdalina en agua 21,6 ppm).....	29
Figura 6.6	Espectro de emisión (amigdalina en agua 21,6 ppm).....	30
Figura 6.7	Espectro de excitación (amigdalina en metanol 10,8 ppm).....	30
Figura 6.8	Espectro de emisión (amigdalina en metanol 10,8 ppm).....	31
Figura 6.9	Espectro del patrón de amigdalina.....	31
Figura 6.10	Espectro de almendras dulces (azul) y amargas (rojo).....	32
Figura 6.11	Espectro del patrón y las almendras.....	32
Figura 6.12	Espectro de almendras dulces con amigdalina.....	33
Figura 6.13	Espectro de almendras amargas con amigdalina.....	33
Figura 6.14	Cromatograma patrón de amigdalina 21,6 ppm.....	34
Figura 6.15	Cromatograma patrón de 8,6 ppm.....	34
Figura 6.16	Representación gráfica del calibrado con fase móvil 70:30.....	35
Figura 6.17	Cromatograma patrón de amigdalina 10,8 ppm.....	36
Figura 6.18	Cromatograma patrón de amigdalina 21,6 ppm.....	37
Figura 6.19	Representación gráfica del calibrado con fase móvil 69.5:20:10:0.5.....	38
Figura 6.20	Representación gráfica de la comparativa entre ambos calibrados.....	38
Figura 6.21	Cromatograma de disolución de amigdalina en metanol (136,0 ppm).....	39
Figura 6.22	Representación gráfica del calibrado en metanol.....	40
Figura 6.23	Cromatograma de la extracción de almendras dulces (0 mg).....	41
Figura 6.24	Cromatograma de la extracción con MAP (1 ml de 136,0 ppm).....	43
Figura 6.25	Representación gráfica MAP almendras dulces, patrón 136,0 ppm.....	44
Figura 6.26	Representación gráfica de la extrapolación del MAP.....	44
Figura 6.27	Cromatograma de la extracción de almendras amargas (0 mg).....	45
Figura 6.28	Aspecto del extracto de las almendras amargas.....	47
Figura 6.29	Montaje del equipo Soxhlet.....	47
Figura 6.30	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con Soxhlet.....	48
Figura 6.31	Comparativa de los extractos de la manzana (corazón, piel y trozos).....	49
Figura 6.32	Cromatograma extracción de amigdalina en pepitas de manzana.....	50
Figura 6.33	Cromatograma extracción en el corazón de la manzana.....	50
Figura 6.34	Cromatograma extracción de la piel de manzana.....	51
Figura 6.35	Cromatograma extracción de los trozos de manzana.....	51
Figura 6.36	Extracto de pasiflora en metanol y en agua.....	52
Figura 6.37	Cromatograma extracción de amigdalina en pasiflora (metanol).....	53
Figura 6.38	Cromatograma extracción de amigdalina en pasiflora (agua).....	53

Figura 8.1	Espectro de almendras dulces (0 mg).....	58
Figura 8.2	Espectro de almendras dulces con 10 mg de amigdalina.....	58
Figura 8.3	Espectro de almendras dulces con 50 mg de amigdalina.....	59
Figura 8.4	Espectro de almendras dulces con 100 mg de amigdalina.....	59
Figura 8.5	Espectro de almendras amargas (0 mg).....	60
Figura 8.6	Espectro de almendras amargas con 10 mg amigdalina.....	60
Figura 8.7	Espectro de almendras amargas con 50 mg de amigdalina.....	61
Figura 8.8	Espectro de almendras amargas con 100 mg de amigdalina.....	61
Figura 8.9	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 10,8 ppm (70:30).....	62
Figura 8.10	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 6,5 ppm (70:30).....	62
Figura 8.11	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 4,3 ppm (70:30).....	63
Figura 8.12	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 2,2 ppm (70:30).....	63
Figura 8.13	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 1,1 ppm (70:30).....	64
Figura 8.14	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 0,1 ppm (70:30).....	64
Figura 8.15	Cromatograma patrón de amigdalina en agua 0,01 ppm (70:30).....	65
Figura 8.16	Cromatograma con condiciones de fase móvil 80% agua y 20% acetoneitrilo (8,6 ppm).....	65
Figura 8.17	Cromatograma con condiciones de fase móvil 50% agua y 50% acetoneitrilo.....	66
Figura 8.18	Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 20% acetoneitrilo y 10% metanol (10,8 ppm).....	66
Figura 8.19	Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 15% acetoneitrilo y 15% metanol (10,8 ppm).....	67
Figura 8.20	Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 10% acetoneitrilo, 10% metanol y 10% ácido acético (10,8 ppm).....	67
Figura 8.21	Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 20% acetoneitrilo, 5% metanol y 5% ácido acético (10,8 ppm).....	68
Figura 8.22	Cromatograma con condiciones de fase móvil 60% agua, 10% acetoneitrilo, 5% metanol y 25% ácido acético (21,6 ppm).....	68
Figura 8.23	Cromatograma patrón amigdalina en agua 8,6 ppm (69.5:20:10:0.5).....	69
Figura 8.24	Cromatograma patrón amigdalina en agua 6,5 ppm (69.5:20:10:0.5).....	69
Figura 8.25	Cromatograma patrón amigdalina en agua 4,3 ppm (69.5:20:10:0.5).....	70
Figura 8.26	Cromatograma patrón amigdalina en agua 2,2 ppm (69.5;20:10:0.5).....	70
Figura 8.27	Cromatograma patrón amigdalina en agua 1,1 ppm (69.5:20:10:0.5).....	71
Figura 8.28	Cromatograma patrón amigdalina en agua 0,1 ppm (69.5:20:10:0.5).....	71
Figura 8.29	Cromatograma patrón amigdalina en metanol 1088,0 ppm (69.5:20:10:0.5).....	72
Figura 8.30	Cromatograma amigdalina en metanol 272,0 ppm (69.5:20:10:0.5).....	72
Figura 8.31	Cromatograma amigdalina en metanol 87,0 ppm (69.5:20:10:0.5).....	73
Figura 8.32	Cromatograma amigdalina en metanol 27,2 ppm (69.5:20:10:0.5).....	73
Figura 8.33	Cromatograma amigdalina en metanol 8,7 ppm (69.5.20:10:0.5).....	74

Figura 8.34	Cromatograma amigdalina en metanol 4,3 ppm (69.5:20:10:0.5).....	74
Figura 8.35	Cromatograma amigdalina en metanol 1,1 ppm (69.5:20:10:0.5).....	75
Figura 8.36	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 10 mg de amigdalina.....	75
Figura 8.37	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 20 mg de amigdalina.....	76
Figura 8.38	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 40 mg de amigdalina.....	76
Figura 8.39	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 80 mg de amigdalina.....	77
Figura 8.40	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 100 mg de amigdalina.....	77
Figura 8.41	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 10 mg (dilución 1:10).....	78
Figura 8.42	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 20 mg (dilución 1:10).....	78
Figura 8.43	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 40 mg (dilución 1:10).....	79
Figura 8.44	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 80 mg (dilución 1:10).....	79
Figura 8.45	Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 100 mg (dilución 1:10).....	80
Figura 8.46	Cromatograma de la extracción MAP con 2 ml de 136,0 ppm.....	80
Figura 8.47	Cromatograma de la extracción MAP con 3 ml de 136,0 ppm.....	81
Figura 8.48	Cromatograma de la extracción MAP con 4 ml de 136,0 ppm.....	81
Figura 8.49	Cromatograma de la extracción MAP con 5 ml de 136,0 ppm.....	82
Figura 8.50	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 40 mg de amigdalina.....	82
Figura 8.51	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 80 mg de amigdalina.....	83
Figura 8.52	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 100 mg de amigdalina.....	83
Figura 8.53	Cromatograma de la extracción de almendras amargas (dilución 1:10)...	84
Figura 8.54	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 40 mg (dilución 1:10).....	84
Figura 8.55	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 80 mg (dilución 1:10).....	85
Figura 8.56	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 100 mg (dilución 1:10).....	85
Figura 8.57	Cromatograma de la extracción de almendras amargas con Soxhlet (dilución 1:10).....	86

Índice de tablas

Tabla 6.1	Valores obtenidos para el calibrado.....	28
Tabla 6.2	Datos del calibrado 70:30.....	35
Tabla 6.3	Datos del calibrado 69.5:20:10:0.5.....	37
Tabla 6.4	Línea de calibrado de disoluciones patrón en metanol.....	40
Tabla 6.5	Resultados de los cromatogramas de las almendras dulces.....	41
Tabla 6.6	Concentración de amigdalina en cada extracción (dulces).....	42
Tabla 6.7	Resultados de la cantidad de amigdalina en almendras dulces.....	42
Tabla 6.8	Valores obtenidos de las extracciones con MAP.....	43
Tabla 6.9.	Resultados de los cromatogramas de las almendras amargas.....	45
Tabla 6.10	Concentración de amigdalina en cada extracción (amargas).....	46
Tabla 6.11	Resultados de la cantidad de amigdalina en almendras amargas.....	46
Tabla 6.12	Resultado del cromatograma de la extracción con Soxhlet.....	48
Tabla 6.13	Concentración y cantidad de amigdalina obtenida por Soxhlet.....	48
Tabla 6.14	Resultados de las extracciones de amigdalina en manzanas.....	51
Tabla 6.15	Resultado de la extracción de amigdalina de la pasiflora (metanol).....	54

1. Resumen

La amigdalina es un glucósido cianogénico, una toxina vegetal almacenada en las células vegetales. Cuando se rompen los tejidos, los glucósidos entran en contacto con unas enzimas, liberando HCN. Es importante detectar su presencia ya que afectan al sabor de los alimentos y se encuentran en una amplia variedad de alimentos como almendras, manzanas, melocotones y otros. Para su detección y cuantificación, se realiza un estudio con diferentes técnicas que son espectroscopia de absorción UV-Visible, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia Raman y cromatografía de líquidos HPLC. Del estudio realizado se concluye que la técnica más adecuada para la determinación de la amigdalina es HPLC, con un detector de UV-Visible a 208 nm, velocidad de flujo 1 ml/min y la fase móvil consiste en 69.5% agua, 20% acetonitrilo, 10% metanol y 0.5% ácido acético. Una vez que se tienen las condiciones adecuadas, se obtiene el pico característico sobre 2.1 min y se puede utilizar el método para conocer la cantidad de amigdalina de los extractos de almendras y manzanas preparados.

Abstract

Amygdalin is a cyanogenic glycoside, a plant toxin stored in plant cells. When tissues are disrupted, the cyanogenic glycosides come into contact with endogenous enzymes resulting in the release of hydrogen cyanide. It is important to detect its presence, because they change the taste of food. They are found in a wide variety of kernels and seeds such as apples, peaches, almonds and others. For its detection and quantification, a study is going to be carried out with different techniques: UV-Vis absorption spectroscopy, fluorescence spectroscopy, Raman spectroscopy and HPLC. From the study carried out, it is concluded that the most suitable technique for the determination of amygdalin is HPLC, using a UV-Vis detector set at 208 nm, with 1 ml/min flow rate and the mobile phase formed by 69.5% water, 20% acetonitrile, 10% methanol and 0.5% acetic acid. When right conditions are achieved, the characteristic peak is obtained over 2.1 min and the method can be used to know the amount of amygdalin in the prepared extracts.

2. Introducción

2.1. Introducción

La amigdalina (D-mandelonitrile-β-D-gentiobioside) es un glucósido cianogénico cuya fórmula molecular es C₂₀H₂₇NO₁₁.

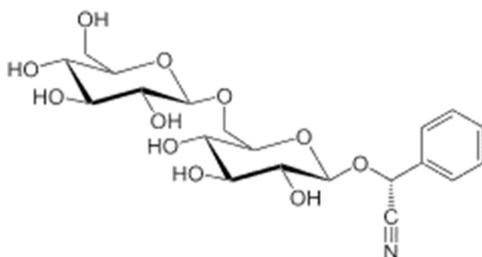


Figura 2.1. Estructura química de la amigdalina. Fuente: Sigma Aldrich

La amigdalina es uno de los glucósidos cianogénicos más comunes por la amplia variedad de alimentos donde se encuentra. Fue aislada en 1830 por Robiquet y Boutron a partir de almendras amargas.

En el año 1837 Liebig y Wöhler observaron en ambos tipos de almendras, que la amigdalina se puede hidrolizar con una enzima β-glucosidasa (emulsina) en medio acuoso. Esta observación la realizaron preparando una suspensión acuosa de almendras amargas trituradas, percibiendo el olor característico de HCN; en el proceso aparece también benzaldehído [1].

A partir de un artículo publicado en la revista Science de 1968 por Linus Pauling [2], el interés por la amigdalina se intensifica cuando la medicina ortomolecular lo relaciona con el tratamiento contra el cáncer. La medicina ortomolecular actualmente está considerada como una medicina alternativa que contribuye a la mejora de la salud, mediante el uso de suplementos nutricionales. Durante un tiempo se le dio la denominación de vitamina B17 [3] aunque realmente no es una vitamina.

Actualmente la eficacia de la amigdalina y su derivado, una forma purificada conocida como laetril, sigue originando controversias [4]. En los estudios que realizan, Park “et al.” [5] informaron del efecto anticancerígeno de la amigdalina sobre células tumorales de tejidos de intestino grueso (colón) en humanos. Chang “et al.” [6] también lo consideran una opción para el tratamiento del cáncer de próstata.

Sin embargo, otros investigadores consideran que el uso de la amigdalina para estos fines no posee evidencias científicas y que los riesgos podrían ser mayores que los posibles beneficios. El uso y venta de amigdalina como medicamento, está prohibido en EE. UU y Europa desde 1980.

2.2. Justificación del trabajo

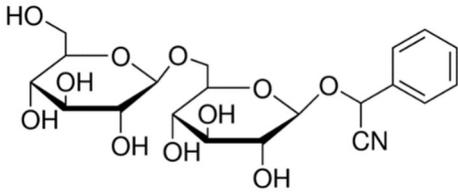
Algunas plantas producen de forma natural glucósidos cianogénicos [7], unas toxinas vegetales entre las que se encuentra la amigdalina. Se encuentran en más de 2500 especies y se almacenan en las vacuolas de las células vegetales. Cuando estos tejidos se rompen, los glucósidos entran en contacto con una serie de enzimas endógenas y se libera HCN.

La importancia de detectar su presencia radica en que estos glucósidos cianogénicos, con influencia en el sabor, se encuentran en muchos alimentos como: almendras, manzanas, peras, melocotones, cereales y otros.

Durante los procesos industriales de tratamiento de estos alimentos, por ejemplo, en la preparación de zumo de manzana, esta se utiliza entera y en su interior se encuentran las semillas (pepitas) que contienen amigdalina. Aunque a nivel industrial se usan técnicas de procesamiento para intentar reducir el contenido de cianuro en los alimentos, es difícil evitarlo ya que en el proceso se ponen en contacto los glucósidos cianogénicos con las enzimas internas, lo que origina la liberación de ácido cianhídrico.

Por ello en la industria alimentaria, se intenta conocer las cantidades de amigdalina que puede haber en los alimentos. Desarrollando métodos que lo permitan y teniendo en cuenta las posibles dificultades, como la complejidad de las matrices de los alimentos.

2.3. Características físico-químicas del compuesto

Nombre	Amigdalina
Fórmula molecular	$C_{20}H_{27}NO_{11}$
Masa molar	457.43 g/mol
Estructura química	
Solubilidad en agua	83 g/L
Solubilidad en alcohol	Soluble en etanol y en metanol

2.4. Objetivos del trabajo

En este Trabajo Fin de Grado se pretende realizar un estudio sobre la amigdalina, con el fin de determinarla en alimentos naturales.

El estudio implicará las siguientes etapas:

- a) Estudio para la determinación por diferentes técnicas analíticas: Espectroscopia de absorción UV-Visible; Espectroscopia de fluorescencia; Espectroscopia Raman y Cromatografía de líquidos (HPLC)
- b) Toma de muestra y tratamiento
- c) Extracción y análisis por HPLC
- d) Estudio de los resultados y conclusiones

3. Técnicas utilizadas

3.1. Espectroscopia por absorción molecular UV-VIS

Esta espectroscopia determina la absorción molecular de la radiación en las regiones ultravioleta y visible de un analito. Se basa en la medición (transmitancia o absorbancia) de la radiación que deja pasar una disolución contenida en una celda transparente a dicha radiación.

Las aplicaciones están relacionadas con la determinación cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos. En este caso, se utiliza fundamentalmente para conocer la longitud de onda, óptima, de absorción de la amígdalina. Para su posterior determinación por HPLC usando un detector de UV-Visible.

3.2. Espectroscopia de fluorescencia

La espectroscopia de fluorescencia es un fenómeno fotoluminiscente que ocurre cuando una molécula es excitada por medio de una radiación electromagnética. Posteriormente se relaja volviendo al estado fundamental y emitiendo el exceso de energía.

La fluorescencia del compuesto puede depender de una serie de aspectos como son la estructura molecular o el entorno químico, afectando también a la intensidad de emisión que se detecta.

En este caso, se utilizaría para estudiar la posibilidad de determinar amígdalina en extractos de las muestras objetivo del análisis en diferentes medios. Utilizando para ello, los espectros de absorción y de emisión de la amígdalina.

3.3. Espectroscopia Raman

La espectroscopia Raman es una técnica que permite obtener información sobre las características estructurales y químicas de compuestos orgánicos e inorgánicos. Se basa en la radiación dispersada por un compuesto, cuando sobre él incide una radiación monocromática.

Es un procedimiento alternativo para obtener información sobre la vibración, ya que utiliza un mecanismo distinto al de las espectroscopias de absorción, al estudiar la luz dispersada por un compuesto en lugar de la luz absorbida o emitida.

Cuando la radiación dispersada ocurre a frecuencias diferentes a la de la radiación incidente, se habla de radiación Raman. Una ventaja de esta técnica es que, prácticamente, no necesita preparación de la muestra.

En este caso, se utiliza para observar la posibilidad de obtener resultados, al menos, cualitativos, mediante la comparación del espectro de un patrón de amígdalina con los espectros obtenidos de las muestras estudiadas.

3.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

HPLC es una técnica que se utiliza para separar los componentes de una mezcla. El tipo de cromatografía más utilizado es la cromatografía de reparto, consiste en una fase estacionaria (relleno de la columna) y una fase móvil (líquido que interacciona con la muestra).

La muestra es inyectada y los componentes de la muestra se separan en función de su interacción con la columna y la fase móvil, lo que determina el tiempo de retención de cada componente, para evitar solapamientos o que los tiempos de separación sean muy largos, hay que tener en cuenta la polaridad del soluto, de la fase estacionaria y de la fase móvil.

En este caso se realiza un estudio con patrones de amigdalina en distintos medios y concentraciones, con el objetivo de conocer los tiempos de retención en función de las diferentes fases móviles utilizadas. Lo obtenido se aplica posteriormente a la determinación de amigdalina en extractos de almendras y manzanas.

4. Antecedentes bibliográficos

La cuantificación de glucósidos cianogénicos se puede llevar a cabo por métodos indirectos o por directos [7]. Los métodos indirectos implican la determinación del HCN liberado después de la hidrólisis, este método analítico incluye una hidrólisis enzimática y después una determinación colorimétrica del cianuro total [8 y 9]. Los métodos directos más utilizados incluyen la cromatografía de gases/espectrometría de masas [10] y HPLC con detector de UVA-Vis [11].

Métodos de alta sensibilidad basados en la cromatografía de gases para determinar amigdalina en disoluciones acuosas, con un tratamiento enzimático previo donde se usa la β -glucosidasa han sido propuestos por diferentes autores [12 y 13].

Se realiza la hidrólisis enzimática y el benzaldehído liberado se derivatiza con PFBOA [O- (2, 3, 4, 5, 6-pentafluorobencil) hidroxilamina], obteniéndose la oxima O-pentafluorobencil, que luego se determina por cromatografía de gases utilizando detectores de ionización de llama (FID) o de captura electrónica (ECD).

Se pudo comprobar que el PFBOA era un buen agente derivatizante, más sensible con el detector ECD, para compuestos carbonílicos de bajo peso molecular en disoluciones acuosas. La reacción de los compuestos de carbonilo con el agente ocurre en medios ácidos (pH 2 a 5) a temperatura ambiente.

Los derivados obtenidos son estables en medios orgánicos y muy volátiles, lo que hace que la cromatografía de gases pueda llevarse a cabo a temperaturas relativamente bajas.

Otros autores [11], determinan el contenido de amigdalina mediante HPLC en diferentes alimentos como almendras, frutas (semillas), verduras y productos procesados. En la extracción de la amigdalina de almendras, se realizan estudios utilizando agua y etanol a diferentes temperaturas y tiempos de extracción.

La eficacia de la extracción con agua depende de diferentes parámetros, entre ellos el debido a la precipitación de proteínas durante la extracción, lo que produce un enturbiamiento del extracto. Este proceso se minimiza cuando se utiliza metanol, ya que se mejora el rendimiento de la extracción.

Las condiciones utilizadas para HPLC son fase inversa y detector de UV-Vis, la fase móvil lleva metanol y agua (25:75) con elución isocrática. La velocidad de flujo es de 1ml/min y el volumen de inyección son 5 μ l. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos fueron, respectivamente, 0.1 μ g/ml y 0.3 μ g/ml.

Los resultados obtenidos indican que la cantidad de amigdalina puede ser diferente, incluso dentro de una misma especie como es el caso de la ciruela.

En un estudio realizado para determinar amígdalina por HPLC de pepitas desecadas de manzana, zumo comercial y zumo procesado de diferentes maneras, con cambios de temperatura para ver cómo afecta la conservación, se realizaron, previamente, extracciones de amígdalina tanto en el zumo como en las pepitas desecadas.

La determinación cromatográfica se realiza por HPLC utilizando una columna C18, fase móvil de metanol y agua (25:75) y velocidad de flujo 1 ml/min. El volumen de inyección 5 μ l y la detección se lleva a cabo a 214 nm. Los resultados obtenidos dependen de la variedad de manzana que se utilice porque el contenido en amígdalina de las pepitas es diferente [7].

Aunque el método más habitual para la determinación de amígdalina y compuestos cianogénicos es por HPLC, al ser un método complejo, relativamente caro y llevar implícito un proceso previo de preparación de las muestras, lo que implica su destrucción, hace que su implementación en la industria alimentaria no sea favorable.

Por ello, se buscan otras técnicas más rápidas, que impliquen menos manipulación y no sean destructivas, como puede ser la espectroscopia NIR. Lógicamente, para poner a punto el procedimiento y hacer el correspondiente estudio comparativo con los resultados obtenidos, se ha utilizado la cromatografía por HPLC como técnica de validación, en este caso, se utiliza un detector de UV, una columna C18 y la fase móvil contiene agua y acetonitrilo (80:20), longitud de onda 218 nm, volumen de inyección de 20 μ l y velocidad de flujo 1.0 ml/min.

El espectro de NIR se realizaba sobre la almendra intacta, con piel, y a temperatura ambiente en la zona de 888-1795 nm, los datos obtenidos se utilizan para el análisis estadístico.

Una vez que el método NIR se ha puesto a punto, se convierte en un proceso de análisis rutinario, aunque únicamente aplicable al alimento para el que se ha realizado, convirtiéndose en un procedimiento útil en esa industria alimentaria. La desventaja viene cuando se quiere analizar otro alimento o cambian las condiciones, ya que implica poner de nuevo a punto el proceso con el consiguiente tratamiento matemático (quimiométrico) de los nuevos resultados obtenidos [14].

La espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) es un método vibracional rápido, fácil, no destructivo y relativamente no muy caro. Una vez puesto a punto el procedimiento, las muestras no necesitan ningún tratamiento previo antes de registrar el espectro. Otra ventaja que presenta es que se puede utilizar con alimentos, ya sean frescos, secos, líquidos o sólidos. Pero al igual que en la espectroscopia NIR, para poner a punto el método hay que recurrir a la validación del mismo mediante análisis previos por HPLC.

La cuantificación de amígdalina en almendras utilizando FTIR consiste en la obtención de una huella característica de cualquier zona de la almendra, pudiendo así obtener información sobre la amargura, la variedad o la velocidad de deterioro. La zona donde se observó el espectro de las almendras fue entre 4000 y 600 cm^{-1} [15].

5. Reactivos y equipos empleados

Muestras

La muestra principal del estudio es la amigdalina obtenida de Sigma-Aldrich como Amygdalin BioXtra >97.0 % (HPLC) ref.10050. Se preparan disoluciones de amigdalina de alrededor de 1000 ppm, en agua desionizada y en metanol.

En agua, se pesaron 0.1078 ± 0.0001 g del patrón, se disolvieron y se llevaron a un matraz aforado, enrasando a 100 ml. La concentración así obtenida es de 1078 ppm, por lo que cuando se tomen alícuotas de esta disolución para preparar las disoluciones de las líneas de calibrado, se tendrá en cuenta este valor.

En el caso del metanol, se pesaron 0.02720 ± 0.00001 g de amigdalina, se disolvieron y se llevaron a un matraz aforado, enrasando a 25 ml. Quedando la concentración como 1088 ppm para los cálculos posteriores.

Además del patrón de amigdalina en el estudio se utilizaron alimentos, como manzanas de la variedad Golden, almendras dulces de la marca Hacendado y almendras amargas. También se ha utilizado Passiflora de la marca Herboristería del Norte S.A.

Reactivos

- Metanol para HPLC >99.9 % de Sigma-Aldrich con ref.34860
- Agua desionizada
- Acetonitrilo: gradient 240 nm/far UV-HPLC grade. Scharlau ref. ACO3292500
- Ácido acético para HPLC >99.8 % ACS, ISO, Ph.Eur. de Sigma-Aldrich con ref.33209

Equipos y material utilizado

- Material de vidrio de uso general en laboratorio
- Balanza Sartorius Entris 2241-1S (precisión de 0.1 mg)
- Balanza Precisa 40SM-20 A (precisión de 0.01 mg)
- UV-Vis: Agilent 8453 UV-Visible System
- Raman: Portable Raman Spectrometer BWS415 i-Raman de B&W TEK inc. Posee un haz de luz láser de 784.92 nm como haz de excitación
- Equipo Soxhlet
- HPLC: Agilent Technologies 1200 Series, componentes
 - Desgasificador G1322A
 - Bomba cuaternaria G1311A
 - Termostato G1316A

- Detector UV-Vis G1314B
- Inyector manual G1328B
- Columna cromatográfica Kromaphase de 150x4.6 mm, tamaño de partícula 5 μm y fase estacionaria C18
- Fluorescencia: Espectrofluorímetro Shimadzu modelo RF 5000

6. Parte experimental y resultados

6.1. Espectroscopia UV/VIS

Para determinar la longitud de onda de máxima absorción de la amigdalina, se realiza un barrido comprendido entre 200 y 800 nm. Se utilizan patrones de amigdalina en agua y metanol de diferentes concentraciones.

Se obtuvieron los espectros de las figuras 6.1 y 6.2, se selecciona 208 nm como longitud óptima de absorción.

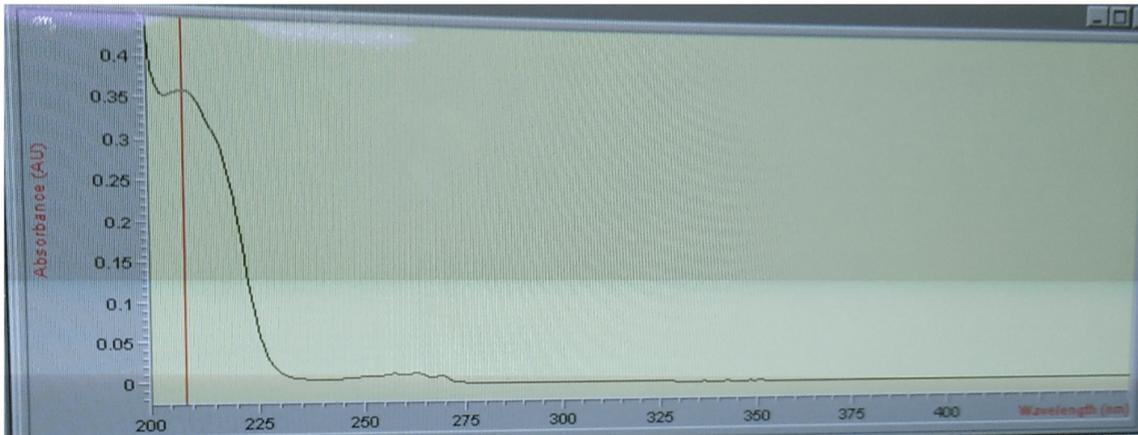


Figura 6.1. Elección de la longitud de onda de la amigdalina

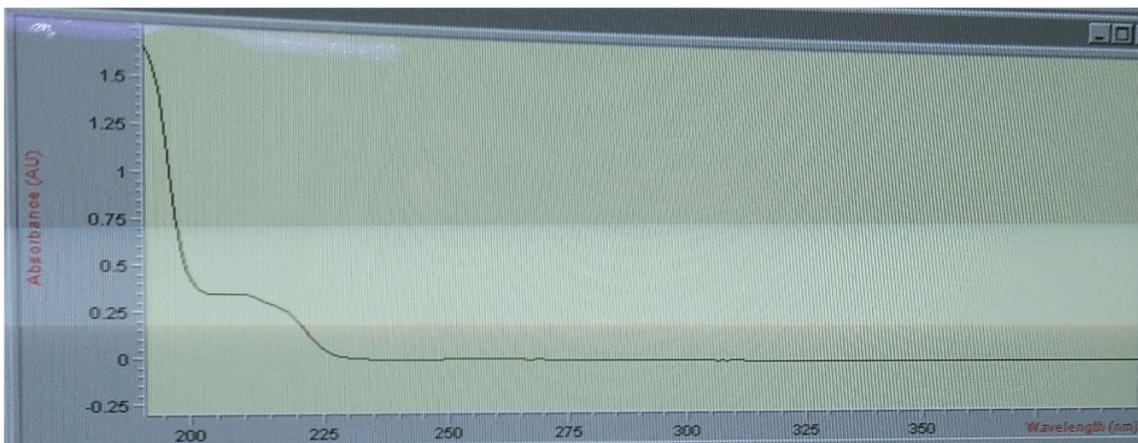


Figura 6.2. Espectro de la amigdalina (21,6 ppm)

6.1.1. Estudio respecto a la concentración

A continuación, se realiza una línea de calibrado en agua a la longitud de onda elegida, 208 nm, con diferentes patrones (preparados a partir de una disolución de 107,8 ppm). Los resultados se reflejan en la siguiente tabla 6.1 y figura 6.3.

Concentración (ppm)	Absorbancia
1,1	0,0473
2,2	0,0538
4,3	0,0935
6,5	0,133
8,6	0,164
10,8	0,204
21,6	0,398

Tabla 6.1. Valores obtenidos para el calibrado

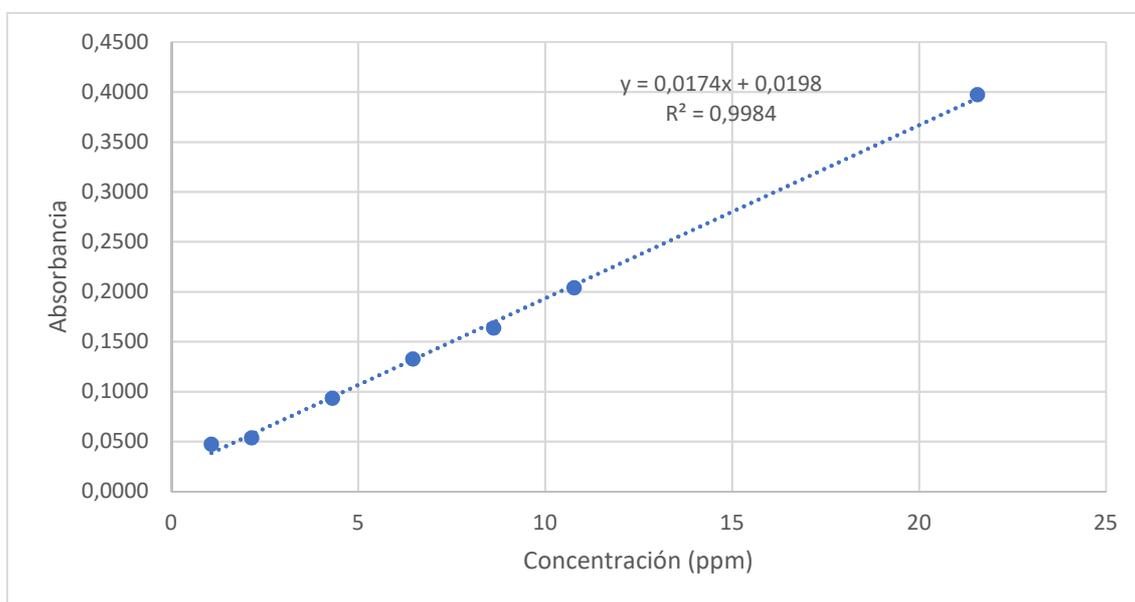


Figura 6.3. Representación gráfica de la absorbancia frente a la concentración

Según la ley de Lambert-Beer, $A=abc$, donde a es la absortividad específica, un valor que depende de la sustancia, de la longitud de onda elegida y de las condiciones experimentales. Comparando con la ecuación de la recta obtenida, la absortividad es igual a la pendiente, $0,0174 \text{ L/mg}\cdot\text{cm}$.

Si se realiza el cambio a la absortividad molar, ϵ , teniendo en cuenta la masa molar de la amígdalina y las unidades, el valor es $7959,282 \text{ L/mol}\cdot\text{cm}$.

6.1.2. Estudio con respecto al tiempo

Se ha realizado un estudio de la estabilidad de la amígdalina frente al tiempo, para lo cual se comparan espectros de patrones almacenados a temperatura ambiente, durante cinco días, con patrones recién preparados. Se ha realizado con patrones de $8,6 \text{ ppm}$ y $21,6 \text{ ppm}$.

Como se puede observar en los espectros de la figura 6.4, durante ese periodo de tiempo no existe una variación apreciable de la absorbancia con respecto al tiempo.

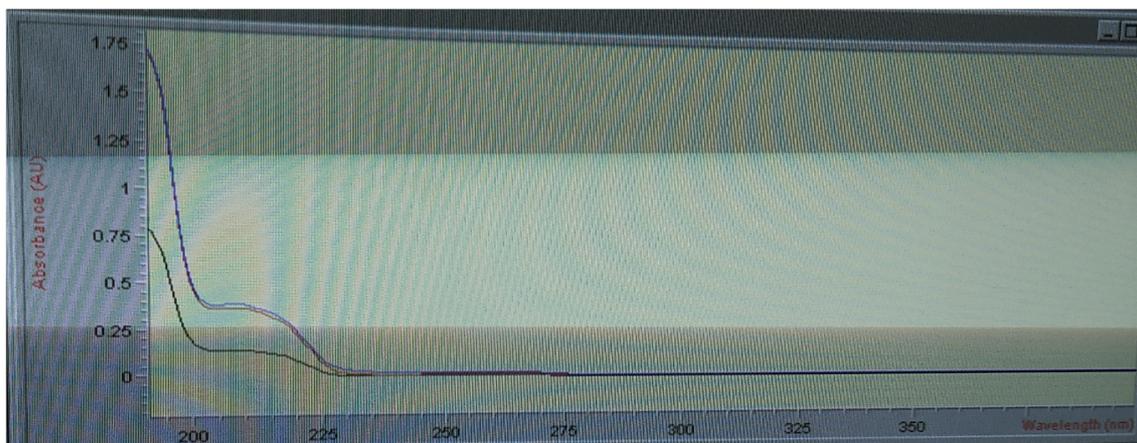


Figura 6.4. Comparación de patrones

6.2. Espectroscopia de fluorescencia

Para comprobar la posibilidad de llevar a cabo la determinación de amigdalina por fluorescencia, se realizan medidas con patrones de amigdalina de 10,8 ppm y 21,6 ppm, preparados en agua y en metanol.

Al principio se utiliza como longitud de onda de excitación, la obtenida por absorción molecular, 208 nm, para poder realizar el espectro de emisión y se obtiene una banda en el espectro a 475 nm. A continuación, fijando esta longitud de onda de emisión, se procede a buscar otras posibles longitudes de absorción, de menor energía, obteniéndose una banda de absorción, perfectamente definida, a 236.4 nm.

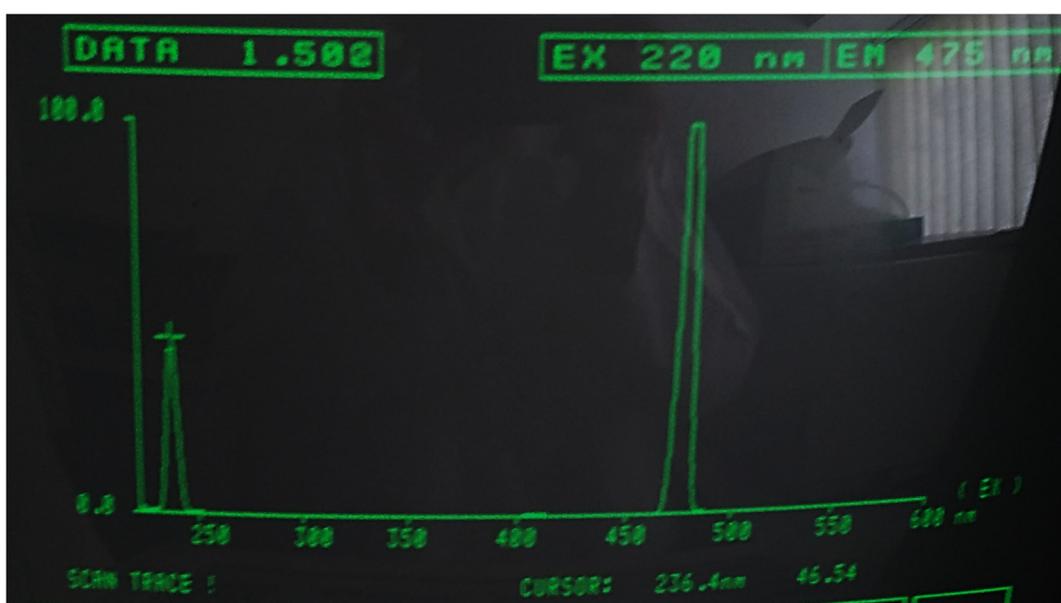


Figura 6.5. Espectro de excitación (amigdalina en agua 21,6 ppm)

Como comprobación final, se realiza un barrido de emisión con longitud de onda de excitación fijada a 236.4 nm y se obtiene a parte del pico de resonancia, un pico a 475.8 nm. Por lo que se obtiene con ambas longitudes de onda, el espectro de emisión y de excitación correspondiente.

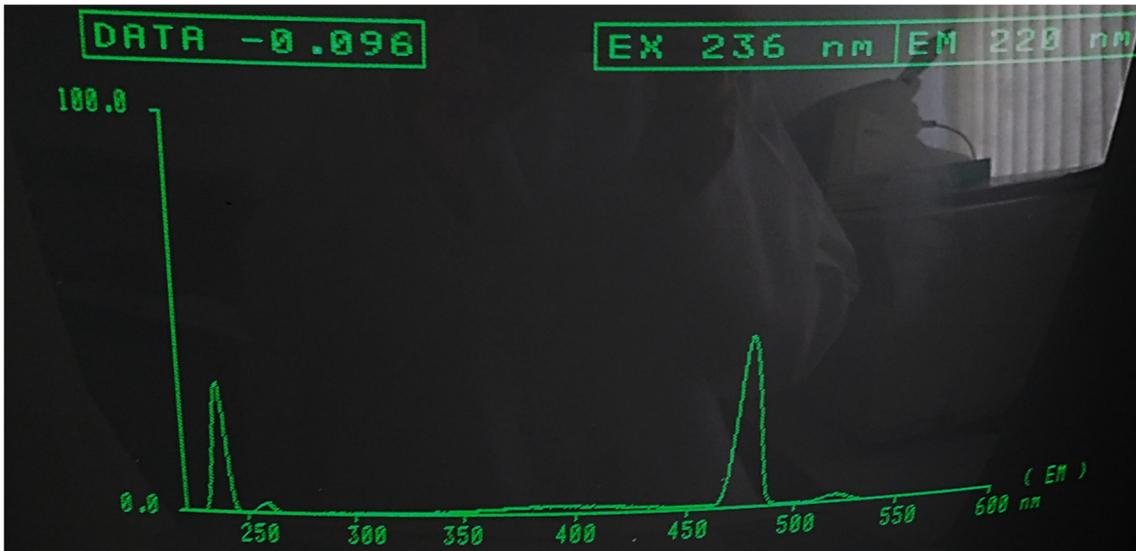


Figura 6.6. Espectro de emisión (amigdalina en agua 21,6 ppm)

En el caso del metanol, se procede de forma similar y se obtienen longitudes de onda de excitación y de emisión a 237 y 478 nm, respectivamente. Se ha considerado 237 nm como longitud óptima de absorción frente a 208 nm, debido a que a tan baja longitud de onda se favorecen los procesos de desactivación por conversión interna, así como los de disociación y predisociación, lo que produciría una disminución de la radiación emitida.

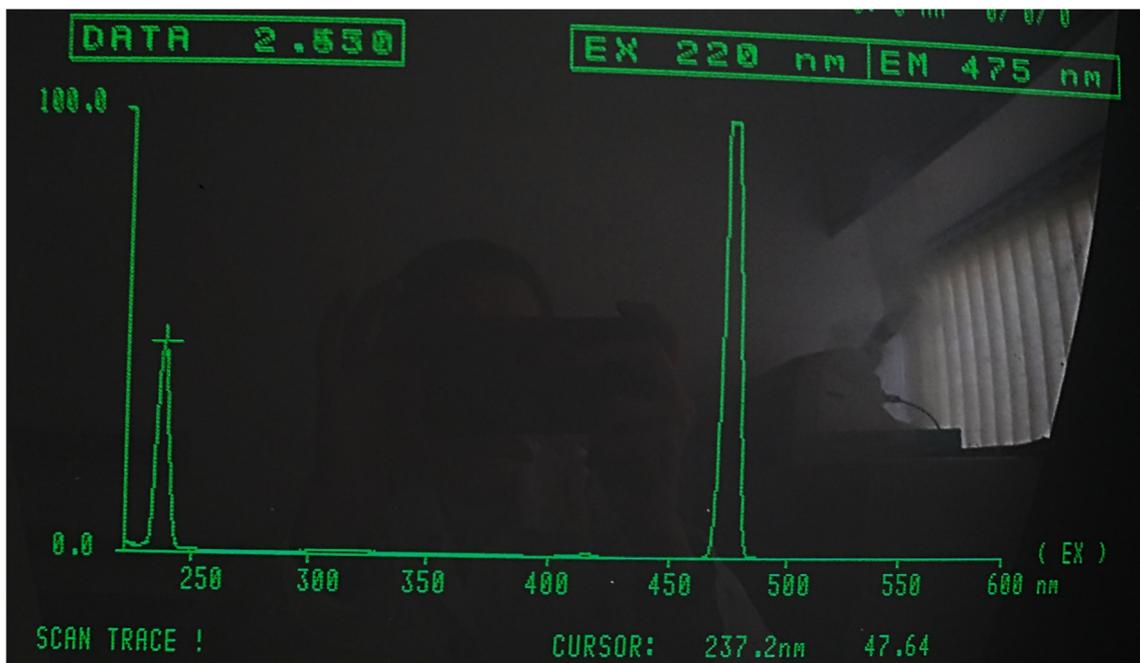


Figura 6.7. Espectro de excitación (amigdalina en metanol 10,8 ppm)

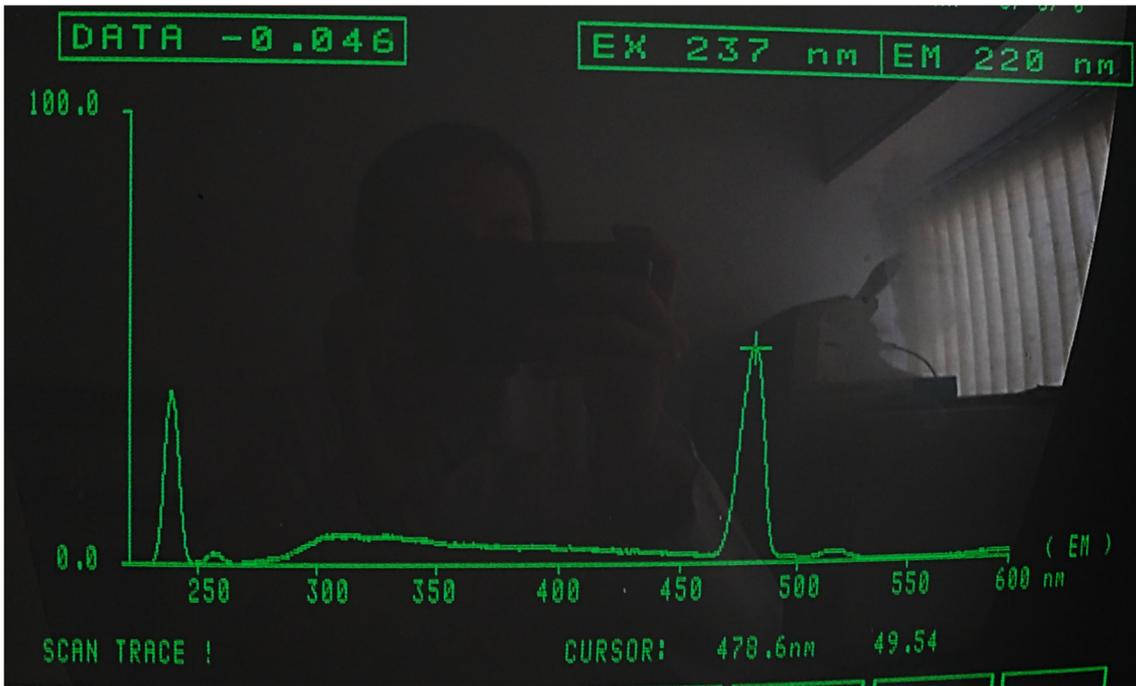


Figura 6.8. Espectro de emisión (amigdalina en metanol 10,8 ppm)

6.3. Espectroscopia Raman

Antes de poder comprobar si se puede utilizar Raman para detectar la presencia de amigdalina en alimentos, en este caso almendras, se realiza un espectro con el patrón, sólido, de amigdalina triturado, donde se observa un pico agudo e intenso sobre 1000 cm^{-1} en la figura 6.9.

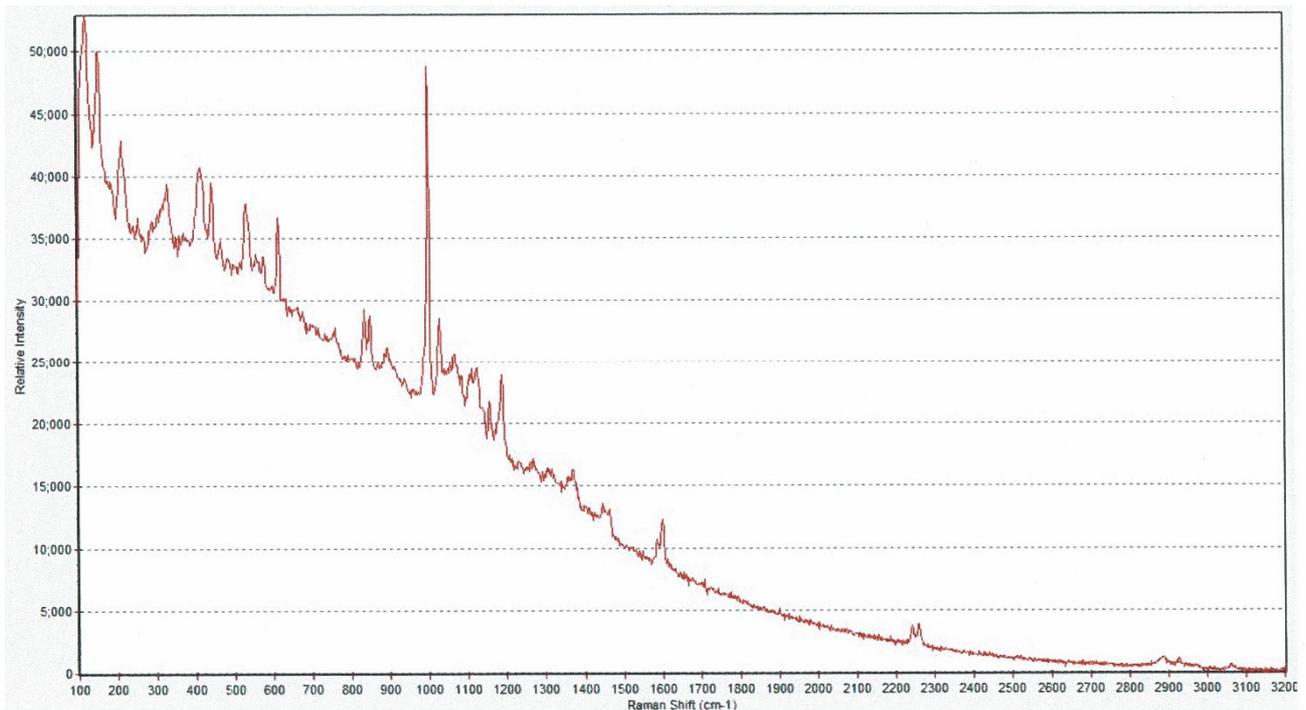


Figura 6.9. Espectro del patrón de amigdalina

Para poder comparar el espectro del patrón con las almendras dulces y amargas, se realiza un espectro para cada una. Al juntar estos espectros, se puede observar que solo las almendras amargas (rojo), figura 6.10, presentan el pico característico de la amigdalina a 1000 cm^{-1} .

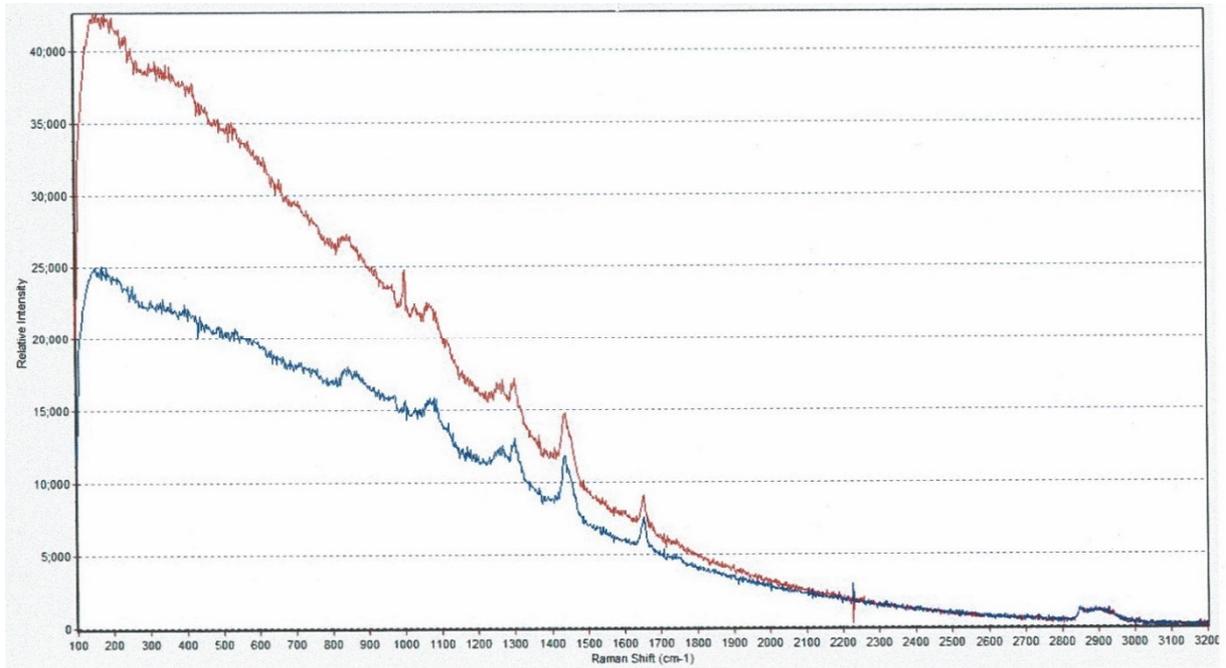


Figura 6.10. Espectro de almendras dulces (azul) y amargas (rojo)

Se realiza una superposición de los espectros obtenidos del patrón y de los tipos de almendra, se comprueba que las almendras amargas presentan el mismo pico que el patrón de la amigdalina, pico que no se observa en el espectro de las almendras dulces.

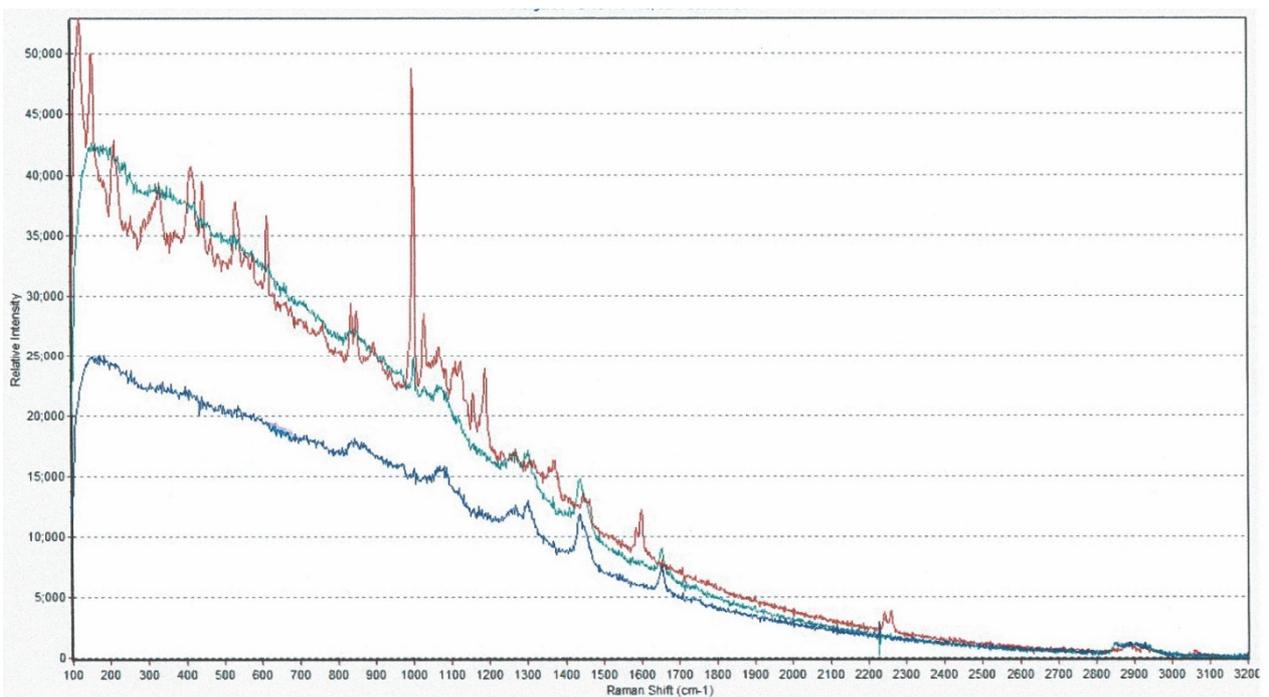


Figura 6.11. Espectro del patrón y las almendras

Se realizaron espectros para cada tipo de almendra, pesando en cada caso, aproximadamente 0.5 g, y dopando cada muestra con diferentes cantidades del patrón de amigdalina, que fueron 10, 50 y 100 mg. En las almendras dulces se puede observar que el pico de la amigdalina a 1000 cm^{-1} comienza a diferenciarse del ruido de fondo en la adición de 50 mg, quedando definido el LOD a partir de la adición de 100 mg.

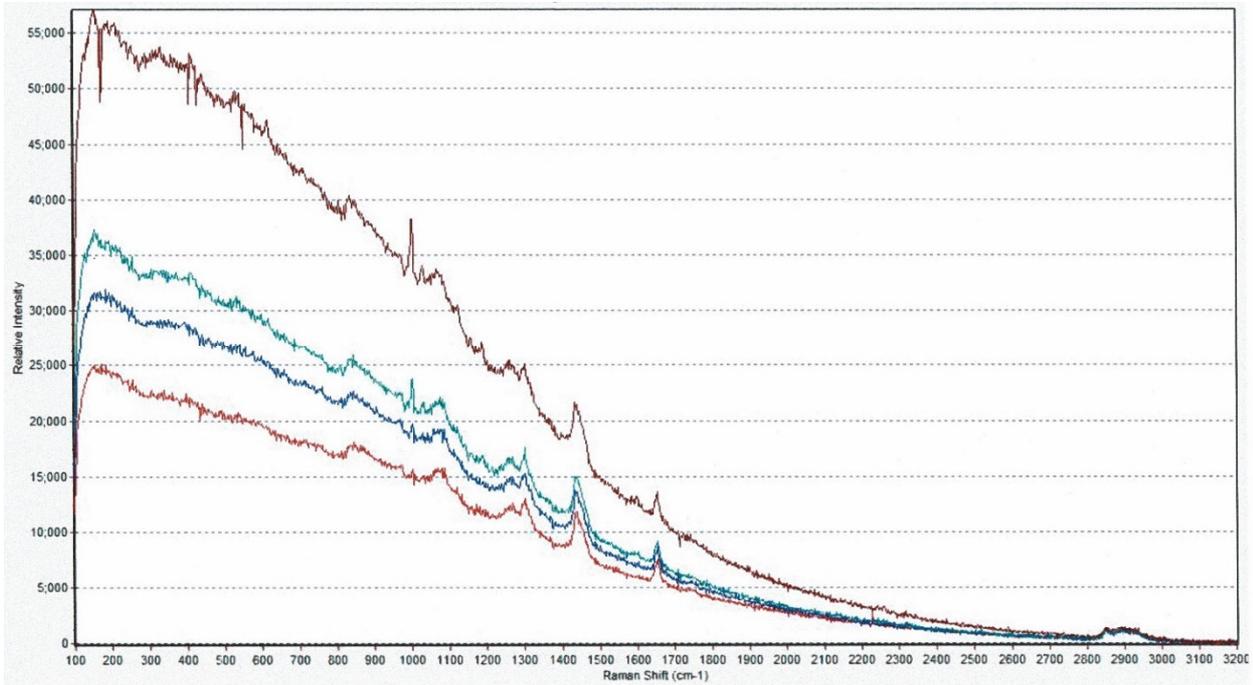


Figura 6.12. Espectro de almendras dulces con amigdalina

En el caso de las amargas, este pico se observa desde el principio en las distintas muestras utilizadas de almendras amargas.

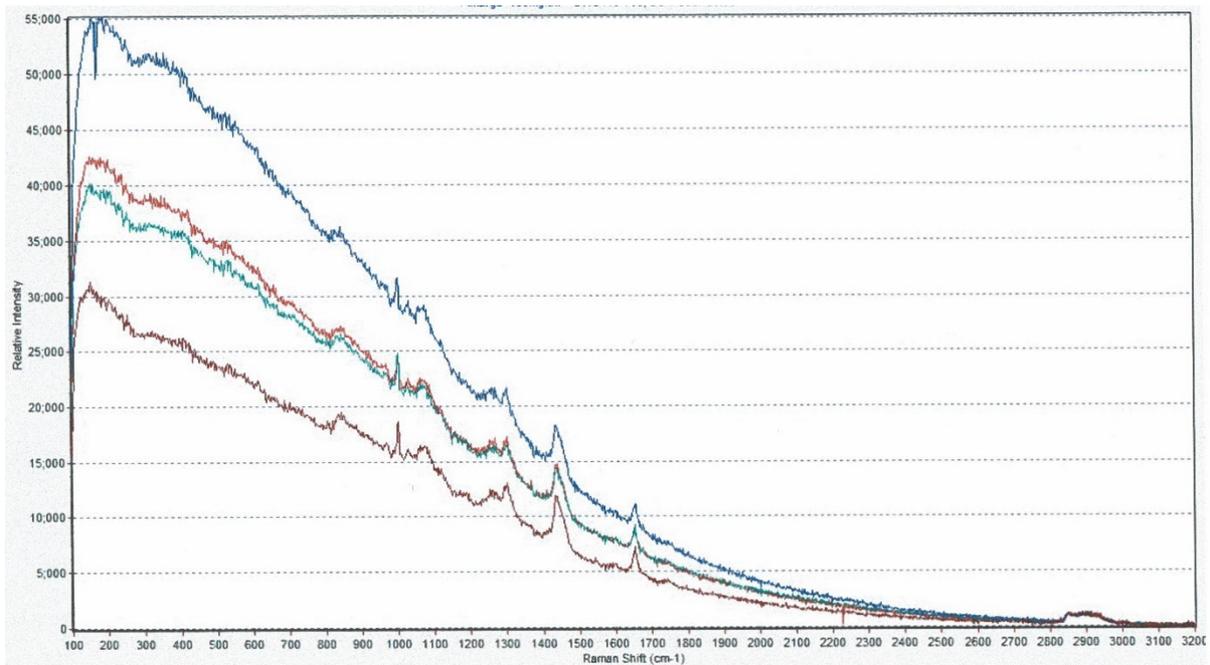


Figura 6.13. Espectro de almendras amargas con amigdalina

6.4. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

6.4.1. Estudio de la fase móvil

Para la determinación de la amígdalina por este método, se realizan previamente pruebas para la elección de la fase móvil en base a la bibliografía consultada, para obtener una buena resolución y tiempo breve de medida, se utiliza una mezcla de agua y acetonitrilo en proporción 70:30.

Las otras condiciones fueron 208 nm como la longitud de onda de detección, velocidad de flujo de 1 ml/min y el volumen de inyección 5 µl. Se realizan las medidas con disoluciones patrón de diferentes concentraciones de amígdalina en agua, 21.6 ppm y 10.8 ppm en las figuras 6.14 y 6.15 respectivamente.

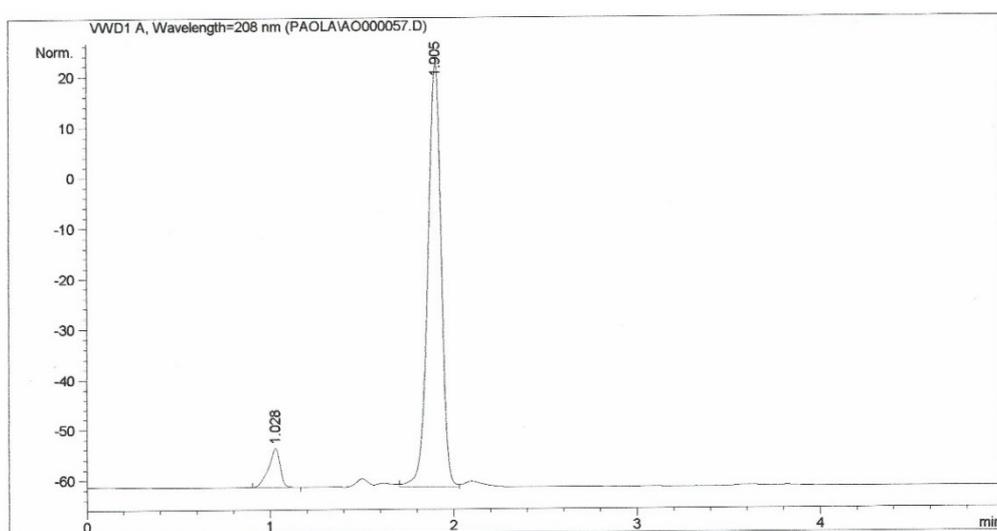


Figura 6.14. Cromatograma patrón de amígdalina 21,6 ppm

El pico de la amígdalina es el correspondiente a un tiempo de retención de 1.9 min, ya que es el que modifica su intensidad y área cuando se varía la concentración.

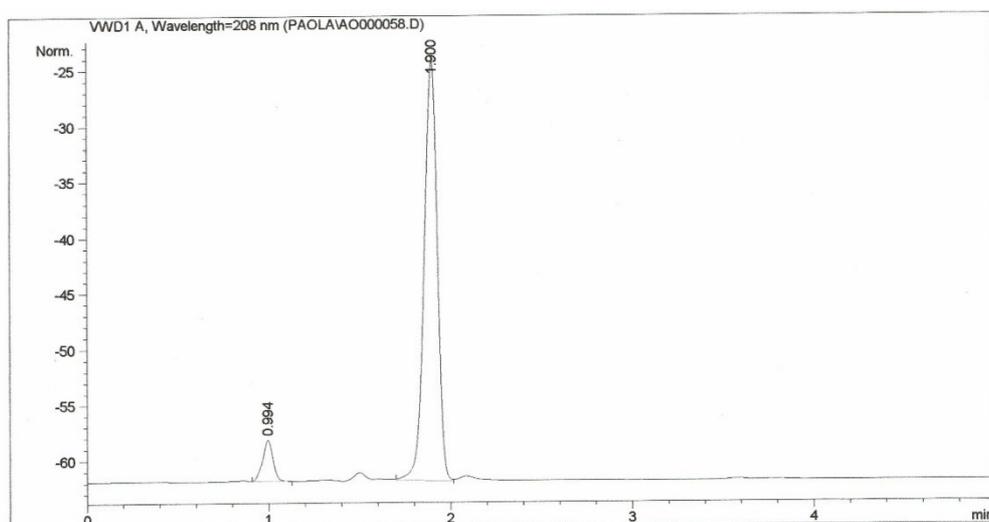


Figura 6.15. Cromatograma patrón de 8,6 ppm

Una vez comprobada la bondad del procedimiento, se realiza una línea de calibrado con disoluciones patrón de amigdalina en agua, los resultados se reflejan en la tabla 6.2 y la figura 6.16. El resto de cromatogramas utilizados aparecen en el anexo, figuras 8.9 a 8.13.

Concentración (ppm)	Área	t _r (min)
1,1	31,2	1,890
2,2	52,4	1,897
4,3	98,1	1,897
6,5	135,3	1,899
8,6	190,3	1,900
10,8	219,2	1,901
21,6	428,2	1,905

Tabla 6.2. Datos del calibrado 70:30

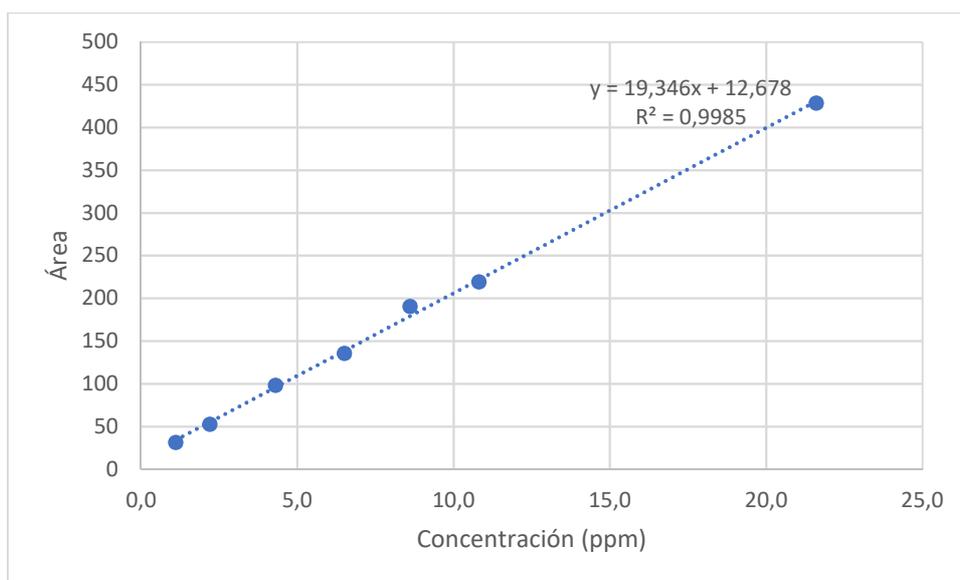


Figura 6.16. Representación gráfica del calibrado con fase móvil 70:30

Medidas realizadas en otras proporciones de la fase móvil (en las figuras 8.16 y 8.17 del anexo), implicaban que al disminuir la cantidad de acetonitrilo, el pico de la amigdalina aparecía a un tiempo de retención mayor y si se aumentaba la cantidad, el pico aparecía demasiado pronto, solapándose con el primero (posible impureza del patrón) con el consiguiente error en la medida.

Al tener en cuenta que en los procesos de extracción de la amigdalina se recomienda la utilización de metanol, se incluye dicho componente en la fase móvil, así como modificar

ligeramente el pH mediante la adición de ácido acético 0.05 M, con el fin de evitar posibles reacciones de hidrólisis.

Después de diferentes pruebas para obtener otra fase móvil (figuras 8.18 a 8.22 del anexo), en la que se incluyeron diferentes proporciones de metanol y ácido acético manteniendo el acetonitrilo, se pudo observar que la presencia de metanol aumenta los tiempos de retención, y que con el ácido acético 0.05 M la anchura de pico era mayor, lo que originaba un desdoblamiento del pico dificultando la integración.

Al final como solución de compromiso, se eligió como otra posible fase móvil 69.5% agua, 20% acetonitrilo, 10% metanol y 0.5% ácido acético. Aumentaba ligeramente el tiempo de retención de la amigdalina y no daba lugar a desdoblamientos de pico, los resultados se pueden observar en las figuras 6.17 y 6.18.

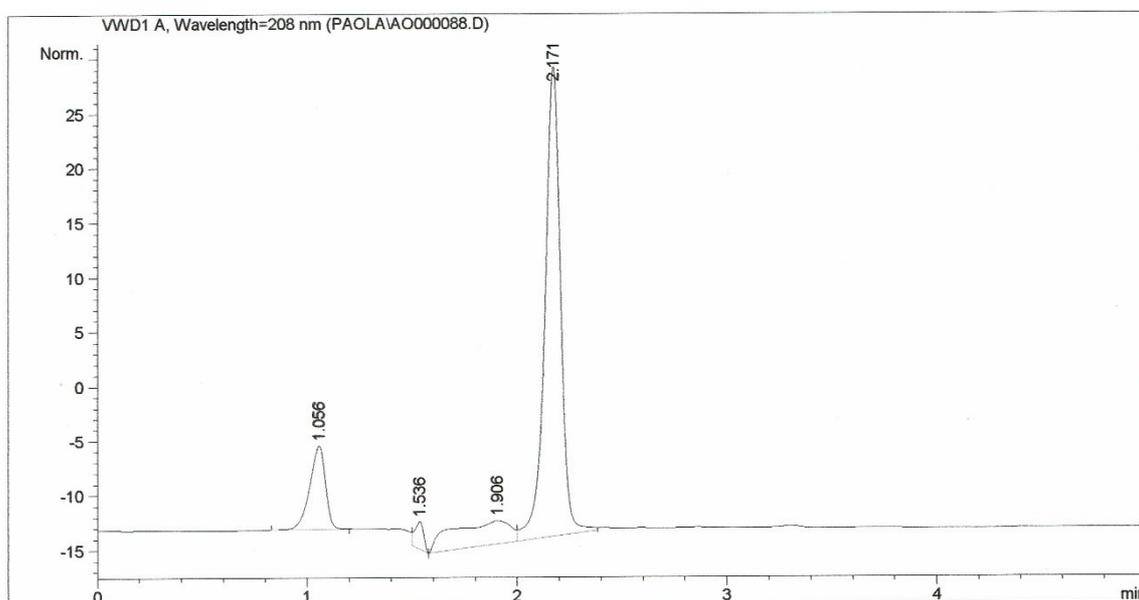


Figura 6.17. Cromatograma patrón de amigdalina 10,8 ppm

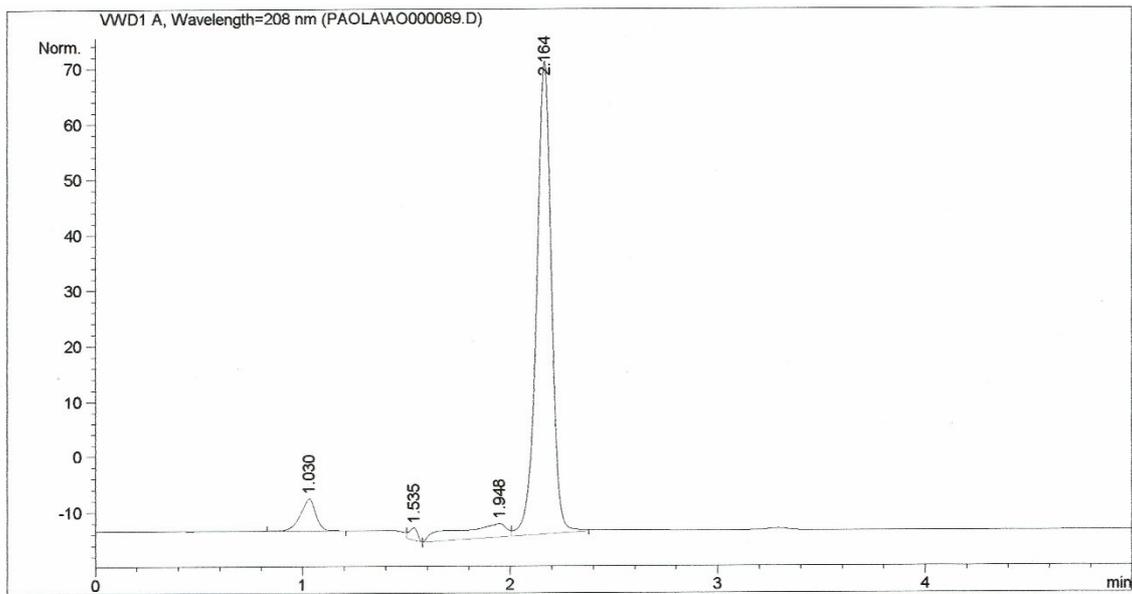


Figura 6.18. Cromatograma patrón de amigdalina 21,6 ppm

Para comprobar que dicha fase móvil era adecuada, se repiten con ella las medidas de los patrones utilizados en la tabla 6.2. El resto de cromatogramas se encuentran en el anexo, figuras 8.23 a 8.27. Con los resultados obtenidos, que aparecen en la tabla 6.3, se realiza la correspondiente línea de calibrado, figura 6.19.

Concentración (ppm)	Área	t _r (min)
1,1	45,8	2,178
2,2	72,9	2,174
4,3	113,5	2,170
6,5	144,0	2,164
8,6	190,5	2,161
10,8	226,0	2,171
21,6	429,4	2,164

Tabla 6.3. Datos del calibrado 69.5:20:10:0.5

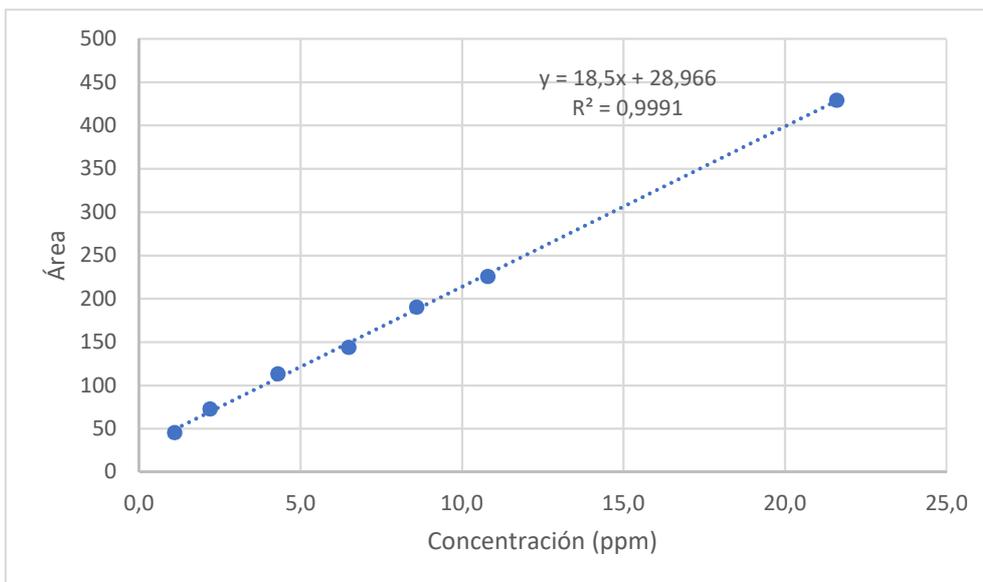


Figura 6.19. Representación gráfica del calibrado con fase móvil 69.5:20:10:0.5

Como se observa en la figura 6.20, al comparar las líneas de calibrado se obtienen resultados similares con ambas fases, ya que sus pendientes son prácticamente iguales. La línea de color azul representa al calibrado de la fase móvil en proporción 70:30, y la de color naranja a la otra fase móvil estudiada. Por ello, se elige la fase móvil de 69.5% agua, 20% acetonitrilo, 10% metanol y 0.5% ácido acético en las muestras procedentes de las extracciones de alimentos con metanol o con agua.

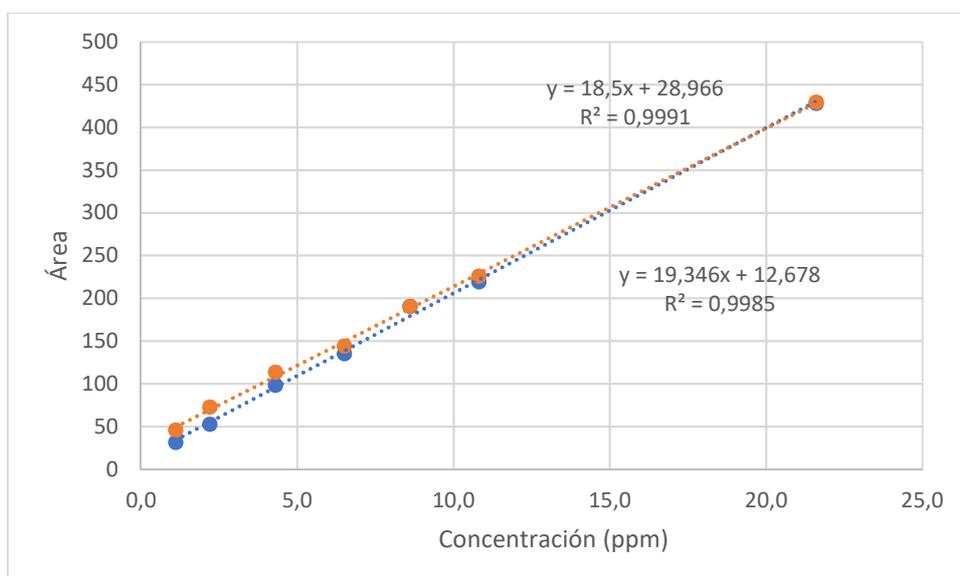


Figura 6.20. Representación gráfica de la comparativa entre ambos calibrados

Los límites de detección (concentración más pequeña que se puede detectar en un cierto nivel de confianza) y de cuantificación (menor concentración de analito en una muestra que puede ser determinada con un nivel aceptable de incertidumbre) obtenidos [11], con la fase móvil indicada, son: LOD 0.75 ppm y LOQ 2.28 ppm.

6.4.2. Calibrado de la disolución de amígdalina preparada en metanol

A continuación, se procede a aplicar el estudio anterior a patrones de amígdalina en medio metanol. En los cromatogramas el pico de la amígdalina, en este medio, aparece sobre 2.1 min, como se puede observar en la figura 6.21.

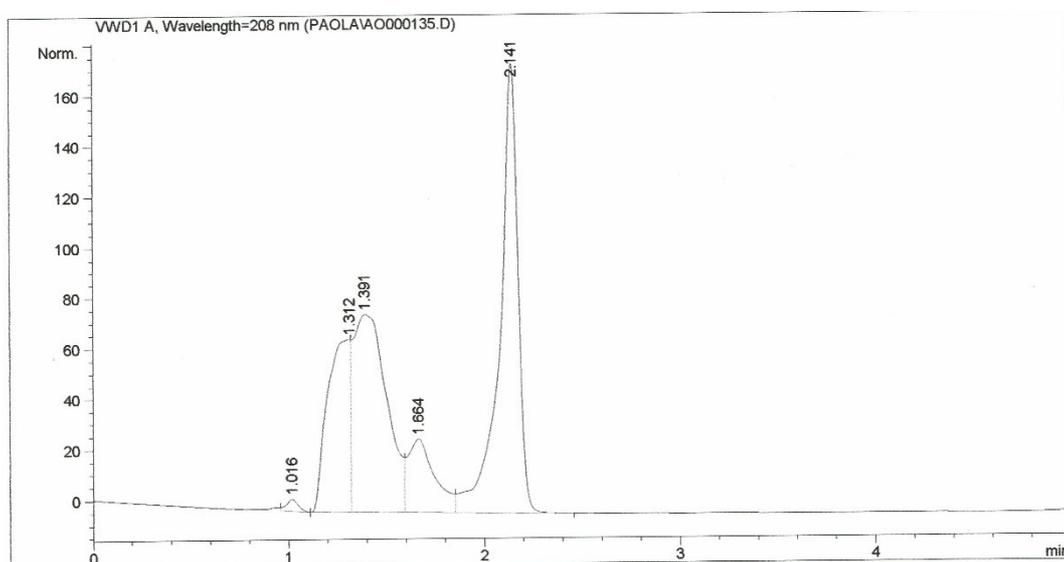


Figura 6.21. Cromatograma de disolución de amígdalina en metanol (136,0 ppm)

Utilizando las disoluciones patrón en metanol, en las condiciones y fase móvil indicadas anteriormente, se realiza la correspondiente línea de calibrado dentro de un amplio intervalo. Los límites de detección y de cuantificación obtenidos en este medio, son LOD 0.45 ppm y LOQ 1.38 ppm. El resto de cromatogramas aparecen en las figuras 8.29 a 8.35 del anexo.

Los resultados del calibrado aparecen en la tabla 6.4 y en la figura 6.22.

Concentración (ppm)	t _r (min)	Área
1,1	2,147	5,2
4,3	2,135	42,3
8,7	2,126	63,6
27,2	2,133	214,5
87,0	2,118	728,5
136,0	2,141	1157,1
272,0	2,047	2092,8
544,0	2,112	3964,3
1088,0	2,127	8795,3

Tabla 6.4. Línea de calibrado disoluciones patrón en metanol

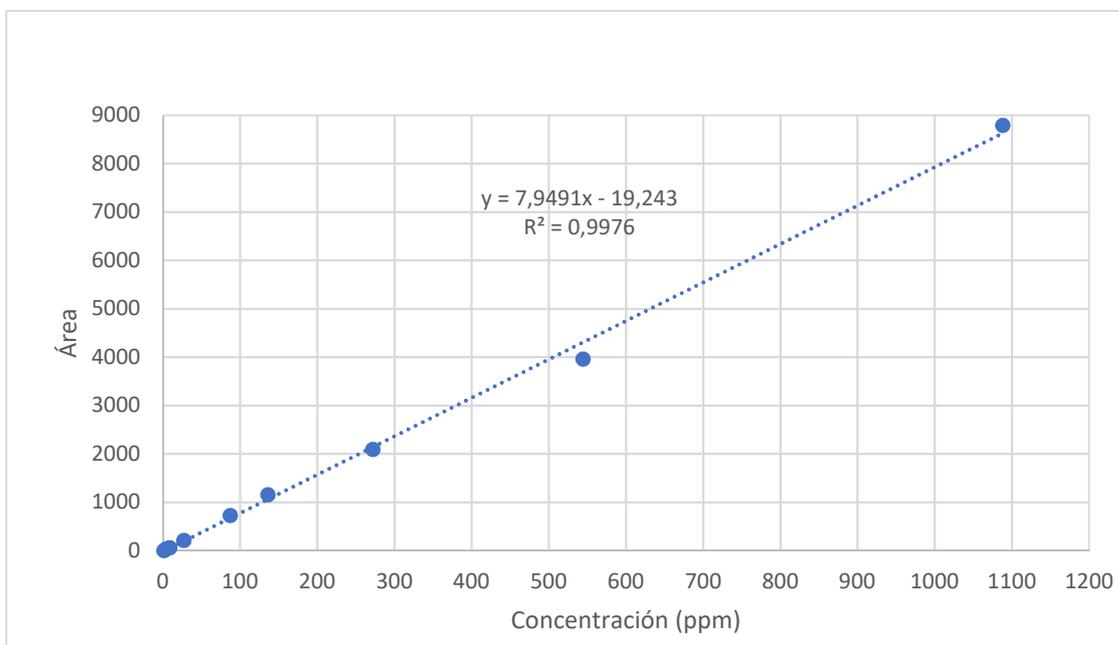


Figura 6.22. Representación gráfica del calibrado en metanol

6.4.3. Determinación de amígdalina en extracciones de almendras dulces

Para comprobar la capacidad de extracción del disolvente en diferentes muestras de almendras, se realizan adiciones del patrón de amígdalina sólido (0, 10, 20, 40, 80 y 100 mg). Las almendras, aproximadamente 1.3 g, se trituran en un mortero de ágata habiendo eliminado previamente la película de color canela que las envuelve.

A continuación, se mezclan hasta homogeneización total y se llevan a tubos de centrifuga, donde a cada tubo se le adicionan 20 ml de metanol como disolvente extractante. Después de un

tiempo de extracción de 24 h en agitación constante, se filtra y el líquido de filtrado se enrasa a 25 ml con metanol. Antes de ser inyectado en el cromatógrafo, se vuelve a filtrar con un filtro para jeringa.

En la figura 6.23 se muestra el resultado obtenido para el extracto de almendras dulces sin dopar, en el cromatograma se puede observar que el pico a 2.054 min presenta un hombro que dificulta su integración, el pico a 1.273 min es debido a otros componentes de la almendra que también se extraen con metanol, pero no dificultan la medida.

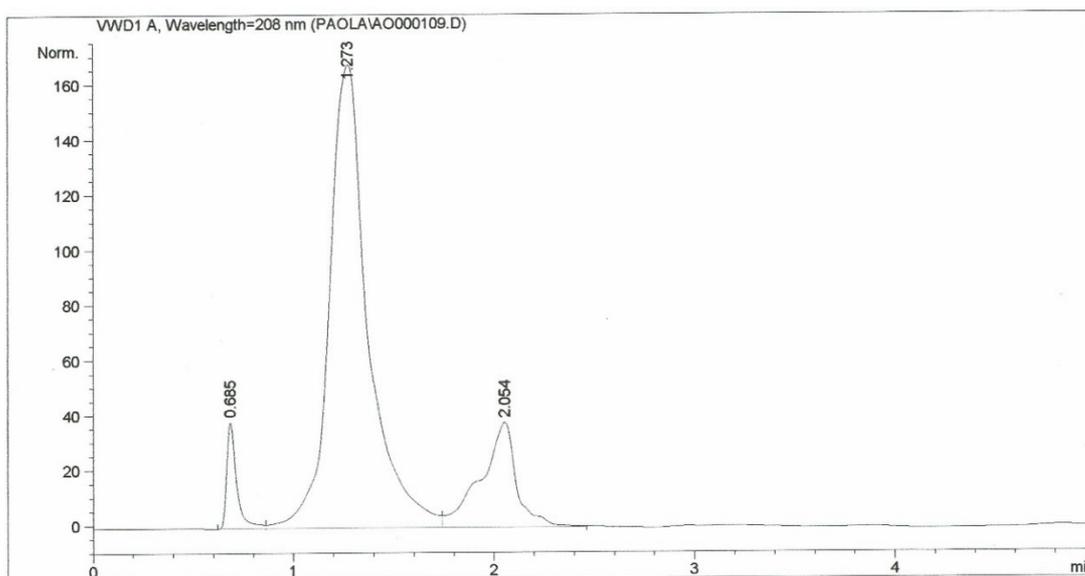


Figura 6.23. Cromatograma de la extracción de almendras dulces (0 mg)

El resto de cromatogramas obtenidos y sus diluciones se encuentran en el anexo, figuras 8.36 a 8.45. En la tabla 6.5 se reflejan los resultados obtenidos teniendo en cuenta las adiciones realizadas.

mg añadidos amigdalina	t _r (min)	Área	Área (dilución muestras) 1:10
0	2,054	464,2	---
10	2,145	5667,8	410,6
20	2,147	9220,1	731,3
40	2,143	15761,0	1378,01
80	2,148	25425,6	2819,5
100	2,162	27676,7	3864,4

Tabla 6.5. Resultados de los cromatogramas de las almendras dulces

Una vez que se conoce el área del pico en cada extracción, utilizando la línea de calibrado se puede calcular la concentración de amigdalina que hay. Se puede entonces comparar con la cantidad de amigdalina adicionada para conocer la recuperación. También se puede obtener el valor de la cantidad de amigdalina relacionado con lo pesado de las almendras.

En los resultados, indicados en las tablas 6.6 y 6.7, se puede apreciar que las extracciones permiten una recuperación total del analito, aunque en todas ellas existe un incremento con respecto al 100%, lo que se puede ser debido a errores de integración por la existencia del hombro del pico anteriormente mencionado.

Pesado almendra (g)	Peso adición amigdalina (g)	Volumen final (ml)	Concentración (ppm)
1,3024	0,00000	25,0	60,8
1,3159	0,01239	25,0	540,7
1,3092	0,02090	25,0	944,2
1,3108	0,04025	25,0	1757,7
1,3062	0,08362	25,0	3571,2
1,3022	0,10270	25,0	4885,6

Tabla 6.6. Concentración de amigdalina en cada extracción (dulces)

Peso adiciones (g)	mg amigdalina encontrados	% recuperado	g/kg
0,00000	1,52	---	1,2
0,01239	13,52	109,11	10,3
0,02090	23,60	112,94	18,0
0,04025	43,94	109,18	33,5
0,08362	89,28	106,77	68,3
0,10270	122,14	118,93	93,8

Tabla 6.7. Resultados de la cantidad de amigdalina en almendras dulces

6.4.4. Método de adiciones patrón para las almendras dulces

Con el objetivo de conocer si la matriz de la muestra puede contribuir a la señal falseando el proceso de recuperación, se realizan adiciones de cantidades conocidas de un patrón de amigdalina de 136 ppm.

Las extracciones sobre muestras de almendras, aproximadamente 1.2 g, se realizan por agitación constante durante 24 h, en tubos de centrífuga con 20 ml de metanol. El líquido se filtra y se enrasa con metanol a 25 ml, a continuación, se adiciona la cantidad correspondiente del patrón a cada extracto y se inyecta, usando un filtro de jeringa, en el cromatógrafo.

Los resultados se reflejan en el cromatograma de la figura 6.24 y en el anexo, en las figuras 8.46 a 8.49.

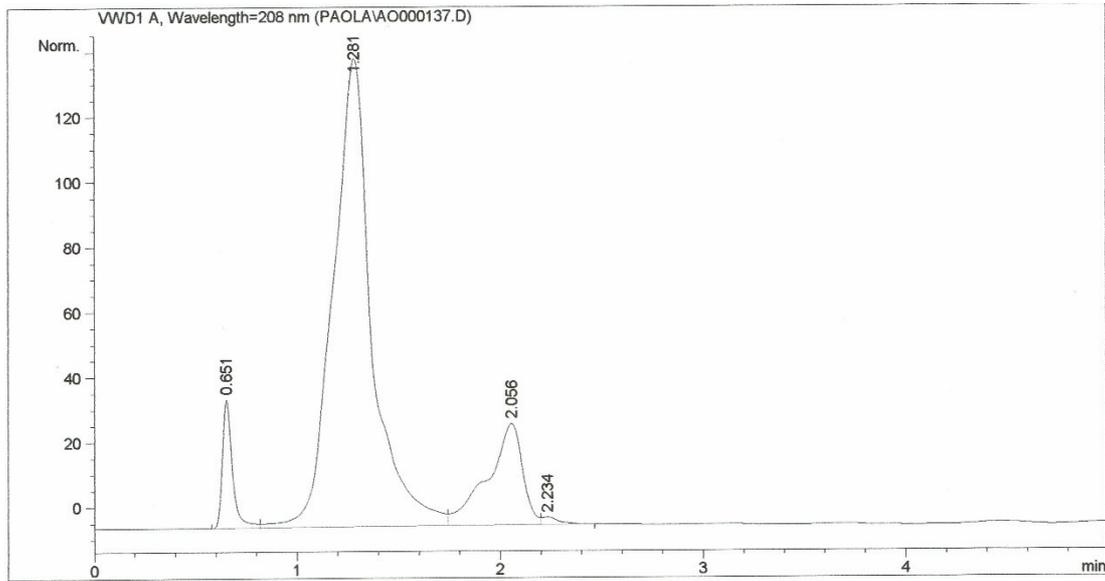


Figura 6.24. Cromatograma de la extracción con MAP (1 ml de 136,0 ppm)

Representando el volumen añadido frente a la respuesta obtenida, tabla 6.8 y figura 6.25, se obtiene una recta a partir de la cual por extrapolación de la misma a respuesta cero, se obtiene el correspondiente volumen equivalente V_{eq} , negativo, y a partir del mismo se determina la concentración inicial en la muestra C_0 , siendo el volumen inicial V_0 y C_p la concentración del patrón utilizado.

$$C_0 = \frac{-V_{eq} * C_p}{V_0}$$

ml añadidos	Área	t_r (min)
0	358,7	2,053
1	375,9	2,056
2	393,0	2,055
3	413,5	2,061
4	422,7	2,062
5	437,8	2,076

Tabla 6.8. Valores obtenidos de las extracciones con MAP

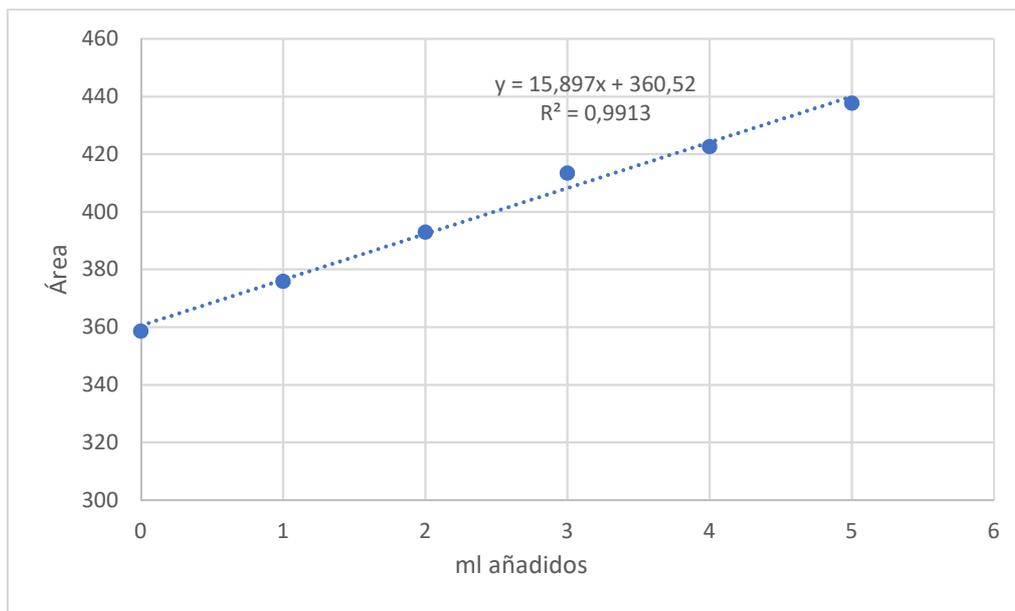


Figura 6.25. Representación gráfica del MAP de almendras dulces y patrón 136,0 ppm

A partir de la ecuación de la recta, se obtiene que el volumen equivalente es -22.67 ml y al calcular la concentración el valor es 113.39 ppm. En la figura 6.26 se representa la extrapolación realizada para el cálculo del volumen equivalente.

El resultado si se compara con el obtenido anteriormente, 60.8 ppm, mediante la correspondiente línea de calibrado siguiendo el procedimiento reflejado en el apartado 6.4.3 y con el extracto sin diluir de las almendras dulces, es prácticamente el doble, lo que lleva a pensar en un efecto inhibitor de la matriz, corregido mediante la aplicación del método de adiciones patrón.

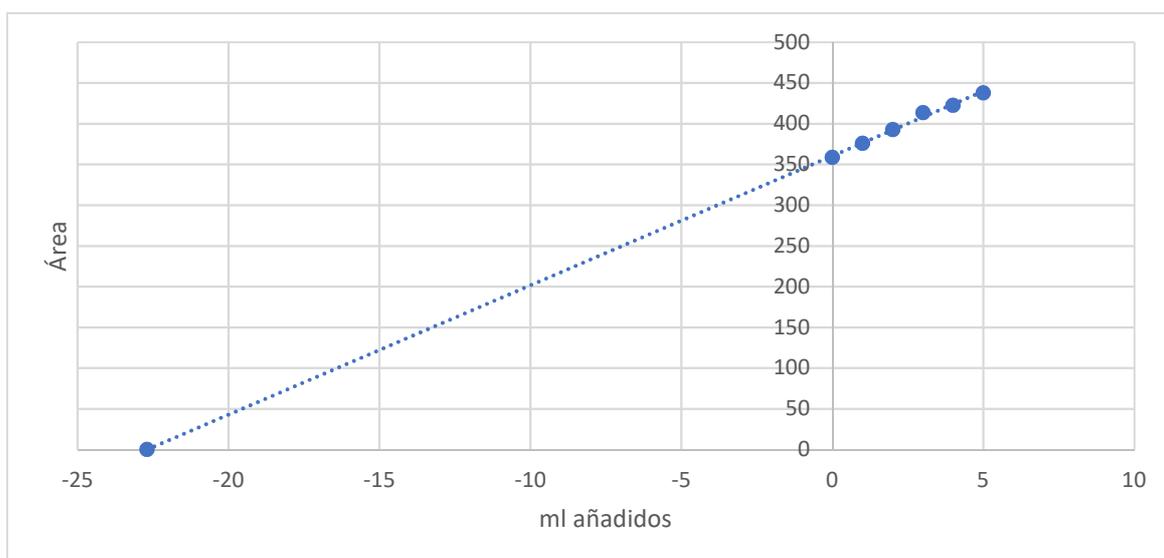


Figura 6.26. Representación gráfica de la extrapolación del MAP

6.4.5. Determinación de amígdalina en extracciones de almendras amargas

En el caso de las almendras amargas, se realiza el mismo procedimiento utilizado para la extracción de almendras dulces. A efectos de las medidas, se realizaron las correspondientes diluciones 1:10 para poder utilizar los resultados dentro de los valores de la línea de calibrado realizada anteriormente.

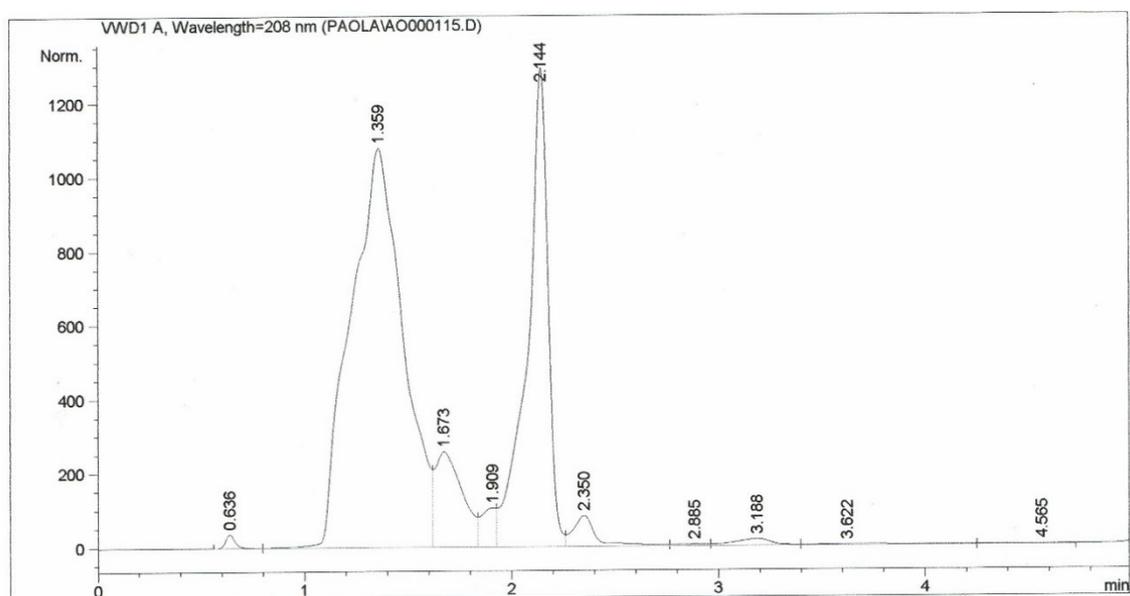


Figura 6.27. Cromatograma de la extracción de almendras amargas (0 mg)

El resto de cromatogramas utilizados y sus diluciones se encuentran en el anexo, figuras 8.50 a 8.56. Con los datos obtenidos, se realizan los mismos cálculos que los explicados anteriormente para las almendras dulces. Los resultados aparecen en las tablas 6.9 a 6.11.

mg añadidos amígdalina	t _r (min)	Área	Área (dilución muestras) 1:10
0	2,144	8981,7	939,6
40	2,089	17996,1	1738,6
80	2,148	23949,0	2873,7
100	2,151	26208,0	2663,5

Tabla 6.9. Resultados de los cromatogramas de las almendras amargas

Pesado almendra (g)	Peso adición amigdalina (g)	Volumen final (ml)	Concentración (ppm)
1,1237	0,00000	25,0	1206,2
1,3090	0,04283	25,0	2211,3
1,3194	0,08125	25,0	3639,3
1,3405	0,10271	25,0	3374,9

Tabla 6.10. Concentración de amigdalina en cada extracción (amargas)

Peso adiciones (g)	mg amigdalina encontrados	% recuperado	g/kg
0,00000	30,16	---	26,8
0,04283	55,28	129,08	42,2
0,08125	90,98	111,98	69,0
0,10271	84,37	82,15	62,9

Tabla 6.11. Resultados de la cantidad de amigdalina en almendras amargas

6.4.6. Determinación de amigdalina en almendras amargas con Soxhlet

Se realiza un estudio para comprobar si la extracción mediante este procedimiento de extracciones sucesivas continuadas, es una mejor opción en cuanto al tiempo empleado comparando con las extracciones realizadas por el procedimiento anteriormente indicado.

La cantidad de almendras amargas que se utiliza en cada extracción, es aproximadamente 6 g y como extractante se utilizan unos 200 ml de metanol. Se realizan quince ciclos con una duración de alrededor de 10 minutos cada uno. Una vez que el proceso de extracción ha terminado, se destila parte del metanol para concentrar el extracto, se filtra y se enrasa a 100 ml.

El extracto así obtenido presenta un color amarillo-anaranjado, se filtra para evitar posibles impurezas en suspensión. Al inyectarlo en el cromatógrafo se utiliza previamente un filtro de jeringa.

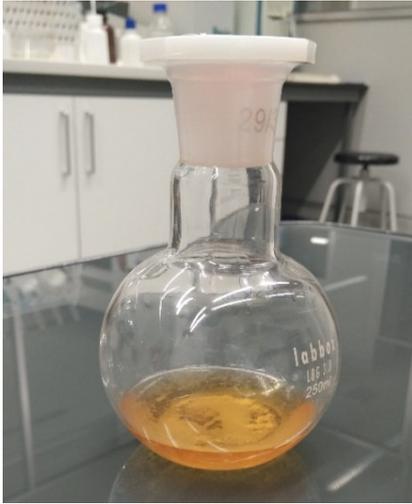


Figura 6.28. Aspecto del extracto de las almendras amargas antes y después de filtrar

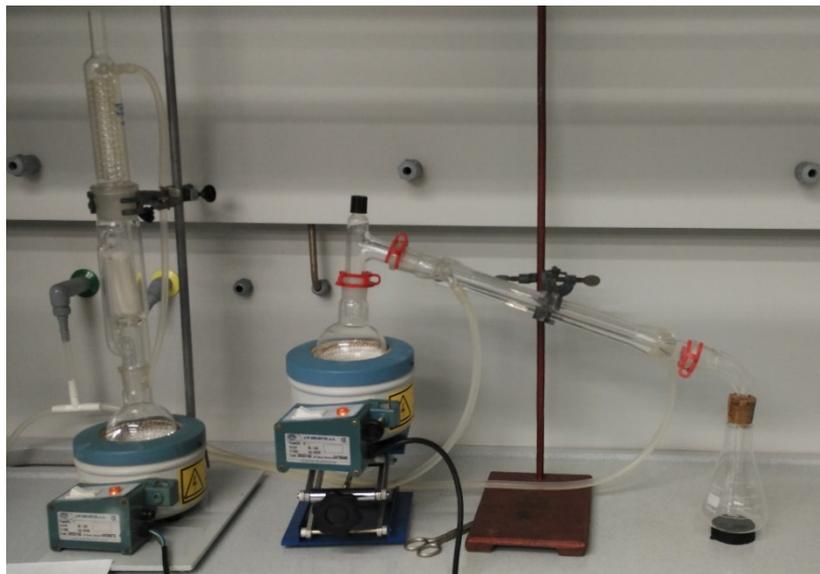


Figura 6.29. Montaje del equipo Soxhlet

En la figura 6.30, se puede observar el cromatograma obtenido de la extracción de almendras amargas (el diluido en la figura 8.57 del anexo) y en las tablas 6.12 y 6.13, los resultados para el proceso realizado.

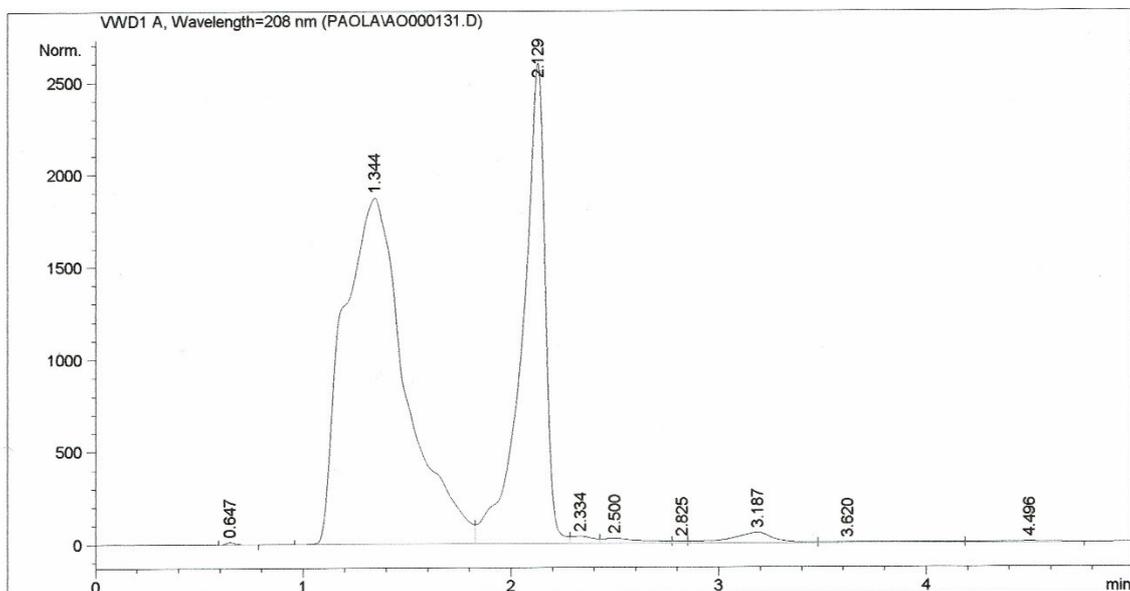


Figura 6.30. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con Soxhlet

t_r (min)	Área	Área (dilución muestra) 1:10
2,129	19987,3	1369,9

Tabla 6.12. Resultado del cromatograma de la extracción con Soxhlet

Pesado almendra (g)	Volumen final (ml)	Concentración (ppm)	mg amígdalina encontrados	g/kg
5,8103	100,0	1747,5	174,75	30,1

Tabla 6.13. Concentración y cantidad de amígdalina obtenida por Soxhlet

Al comparar los resultados de la cantidad de amígdalina obtenida por lo pesado de almendras amargas en ambos métodos utilizados, extracción por agitación constante y utilizando el Soxhlet, se obtienen resultados similares.

Se obtiene una mayor cantidad de amígdalina utilizando el Soxhlet, 30.1 g/kg frente a 26.8 g/kg, pero implica que solo se puede realizar una extracción en el momento, mientras que con la otra se pueden preparar hasta seis tubos de centrífuga.

Aunque con el Soxhlet se realiza la extracción en menos tiempo, implica un mayor gasto de los reactivos, en este caso metanol, que luego hay que recuperar por destilación. En la otra extracción se utilizan 20 ml por cada tubo.

6.4.7. Determinación de amígdalina en extracciones con manzanas

La amígdalina también se encuentra en la manzana, por lo que se realiza un estudio para conocer la cantidad de amígdalina que existe en las semillas (pepitas), el centro (corazón), la carne y en la piel de la manzana.

Se utilizan manzanas de la variedad Golden, las semillas se secan y se trituran, se pesan alrededor de 1.3 g y se llevan a un tubo de centrifuga añadiendo 20 ml de metanol como extractante. Se mantiene en agitación constante durante 24 h. Lo obtenido se filtra y se enrasa a 25 ml, luego se inyecta utilizando un filtro de jeringa.

Se prepara otra extracción con piel de la manzana, aproximadamente 1.8 g y se usa la misma cantidad de extractante, 20 ml de metanol. Después de las 24 h de agitación, se obtuvo un líquido amarillento y se realiza el mismo tratamiento que con las pepitas.

En el caso del corazón, se añadieron aproximadamente 2.6 g y 20 ml de metanol en el tubo de centrifuga. Después de que transcurra el tiempo de agitación, el extracto presenta un color más amarillento que el obtenido con la piel.

Y en los trozos de carne, se realiza el mismo proceso con aproximadamente 2.5 g de la manzana, el extracto presentaba un color menos amarillento que los anteriores.

A continuación, en la figura 6.31 se muestra una foto comparativa de la coloración de los extractos de las diferentes partes de la manzana. Y en las figuras 6.32 a 6.35, los cromatogramas correspondientes a cada una de las partes anteriormente mencionadas.

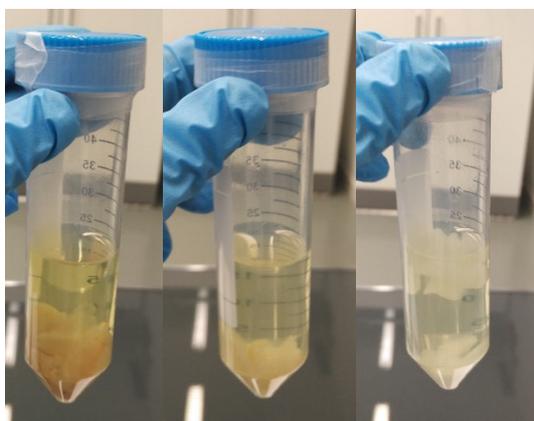


Figura 6.31. Comparativa de los extractos de la manzana (corazón, piel y trozos)

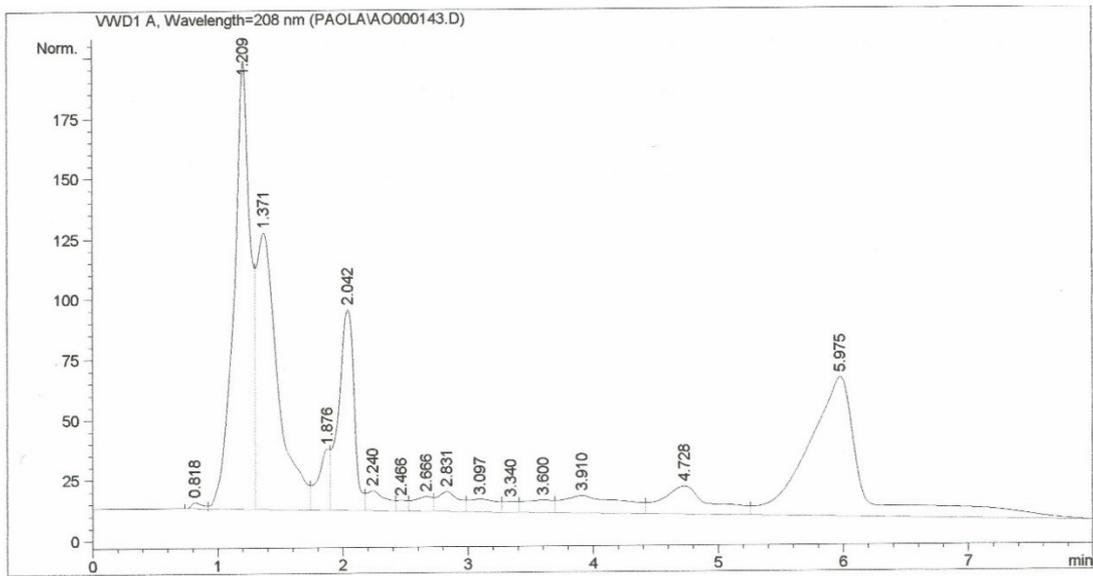


Figura 6.32. Cromatograma de la extracción de amígdalina en pepitas de manzana

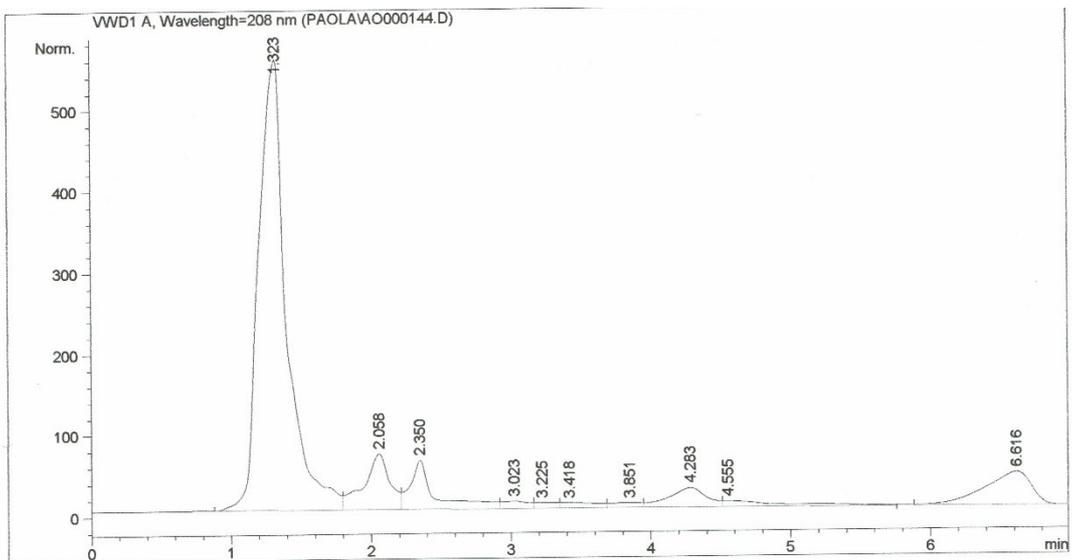


Figura 6.33. Cromatograma de la extracción en el corazón de la manzana

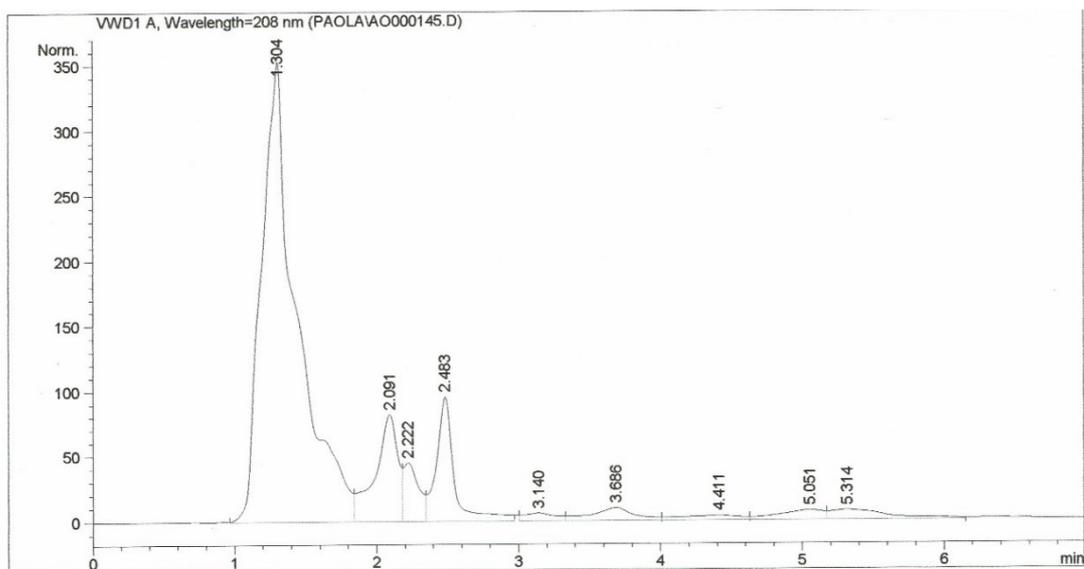


Figura 6.34. Cromatograma de la extracción de la piel de manzana

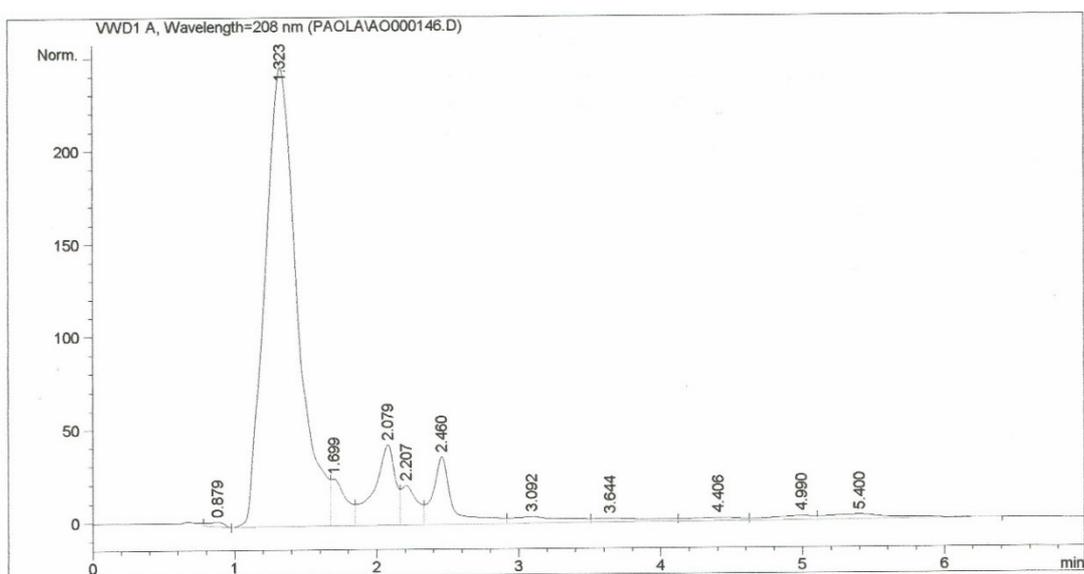


Figura 6.35. Cromatograma de la extracción de los trozos de manzana

En la siguiente tabla, 6.14, aparecen los resultados obtenidos para cada una de las partes de la manzana estudiadas.

	Área	t _r (min)	Peso (g)	Volumen final (ml)	Concentración (ppm)	mg amigdalina encontrados	g/kg
Pepitas	430,200	2,048	1,3058	25,0	113,1	2,83	2,2
Corazón	324,373	2,058	2,6212	25,0	43,2	1,08	0,4
Piel	271,543	2,091	1,7810	25,0	36,6	0,91	0,5
Trozo	159,526	2,079	2,4753	25,0	22,5	0,56	0,2

Tabla 6.14. Resultados de las extracciones de amigdalina en manzanas

En base a los resultados obtenidos, las semillas de manzana son las que poseen más cantidad de amigdalina, seguido del corazón. Los trozos de carne de la manzana son los que poseen menor cantidad de amigdalina.

6.4.8. Determinación de amigdalina en extractos de pasiflora

Los glucósidos cianogénicos se encuentran en una amplia variedad de plantas, pero pocos se han podido aislar y caracterizar. Una variedad de plantas conocida como Passifloraceae, entre las que se encuentran la papaya o el maracuyá, se ha estudiado para buscar compuestos cianogénicos, ya que las hojas, tallos y frutos inmaduros de esta especie pueden contener este tipo de glucósidos [16].

Dentro de la familia se encuentra la *Passiflora incarnata*, muy utilizada por sus propiedades calmantes e inductoras del sueño, aunque también se utiliza como aromatizante en alimentos y bebidas.

Por ello, se realiza un estudio de la presencia de amigdalina en la planta seca de la pasiflora, debido a que se suele tomar como una infusión o como extracto fluido hidroalcohólico. Se utilizan como líquido extractante agua y metanol, se añade aproximadamente 1.8 g de pasiflora en el tubo de centrifuga y 20 ml de agua o metanol.

Los tubos se dejan en agitación constante durante 24 h y a temperatura ambiente. El extracto de la pasiflora con metanol es de color verde oscuro, mientras que el de agua es de color marrón, esto se puede observar en la figura 6.36. Una vez que se filtran los extractos, se inyectan en el cromatógrafo usando un filtro de jeringa.

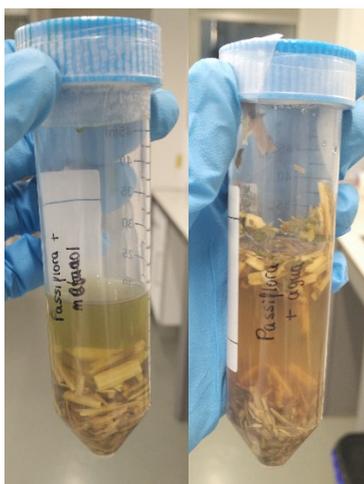


Figura 6.36. Extracto de pasiflora en metanol y en agua

A continuación, en las figuras 6.37 y 6.38 aparecen los cromatogramas obtenidos para la extracción de amigdalina en pasiflora, usando metanol y agua como extractante.

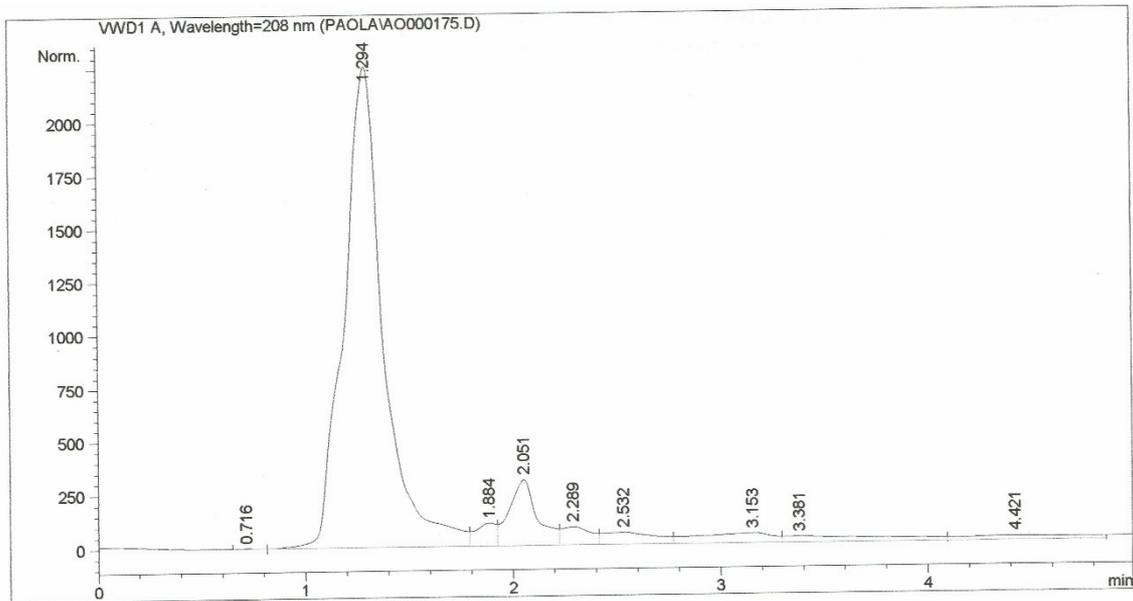


Figura 6.37. Cromatograma de la extracción de amigdalina en pasiflora (metanol)

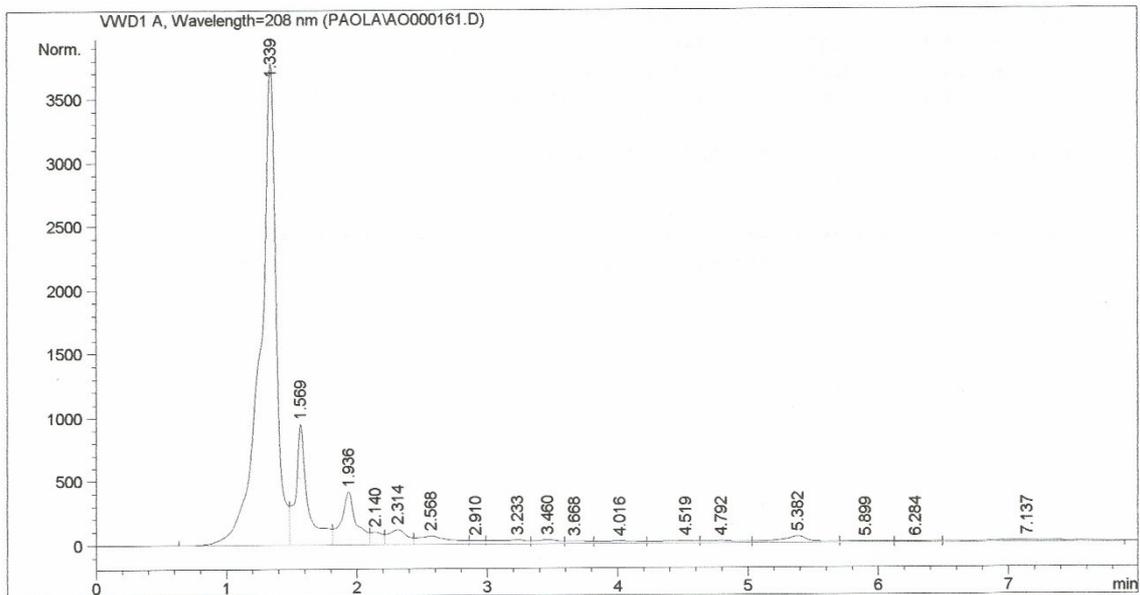


Figura 6.38. Cromatograma de la extracción de amigdalina en pasiflora (agua)

Al observar los cromatogramas no aparece el pico esperado de la amigdalina en la extracción con agua, lo que implicaría la ausencia de este compuesto en las infusiones, independientemente de su presencia en la muestra ya que en los extractos con metanol sí aparece.

Los resultados obtenidos para la extracción usando metanol aparecen en la tabla 6.15.

	Área	t _r (min)	Peso (g)	Volumen final (ml)	Concentración (ppm)	mg amigdalina encontrados	g/kg
Metanol	1061,3	2,051	1,8602	25,0	135,9	3,40	1,8

Tabla 6.15. Resultado de la extracción de amigdalina de la pasiflora (metanol)

7. Conclusiones

1) Se ha realizado un estudio por absorción molecular UV-Vis para determinar la longitud de onda de máxima absorción, 208 nm, para su posterior uso en análisis por HPLC, así como el intervalo óptimo de medida, entre 1 y 20 ppm, a esa longitud de onda. También se ha utilizado esta técnica para comprobar la posible degradación, con respeto al tiempo, de la amígdalina en disoluciones de agua y metanol. Se ha observado que, durante el periodo de cinco días, no existe una variación apreciable de la absorbancia.

2) Mediante espectroscopia de fluorescencia, se ha realizado un estudio para la determinación de las longitudes de onda óptimas de absorción y de emisión en agua y metanol, el resultado fue 236.4 nm en excitación y 475 nm en emisión. La utilización de la longitud de onda de máxima absorción, 208 nm, no mejora los resultados, posiblemente debido a inhibiciones de la fluorescencia por procesos de conversión interna o predisociación.

3) Se ha estudiado mediante espectroscopia Raman, la posibilidad de identificación y de determinación semicuantitativa de amígdalina en muestras de almendras. Se detecta un pico característico a 1000 cm^{-1} en el patrón que también aparece en las almendras amargas. Esto no ocurre en las almendras dulces, por lo que para su determinación sería necesario utilizar el dopaje mediante cantidades conocidas de amígdalina.

4) Se ha puesto a punto un método para la determinación de amígdalina por HPLC, la fase móvil más adecuada es la formada por 69.5% agua, 20% acetonitrilo, 10% metanol y 0.5% ácido acético 0.5 M. Los límites de detección obtenidos son 0.75 ppm en agua y 0.45 ppm en metanol y de cuantificación, 2.28 ppm en agua y 1.38 ppm en metanol. El pico característico aparece sobre 2.1 min.

5) Se ha puesto a punto un método para la extracción de amígdalina en diferentes muestras de almendras y partes de manzanas de la variedad Golden, mediante agitación en medio metanol y en un tiempo de extracción de 24 h, los resultados son próximos al 100%. También se ha comprobado el procedimiento en otro tipo de muestra, la pasiflora, utilizada como infusión en medios acuosos o como un extracto hidroalcohólico. Mediante HPLC se observa la ausencia de amígdalina en los extractos acuosos, no así en los realizados con metanol, donde ocurre la extracción del compuesto.

8. Anexo

8.1. Espectroscopia Raman



Figura 8.1. Espectro de almendras dulces (0 mg)



Figura 8.2. Espectro de almendras dulces con 10 mg de amigdalina

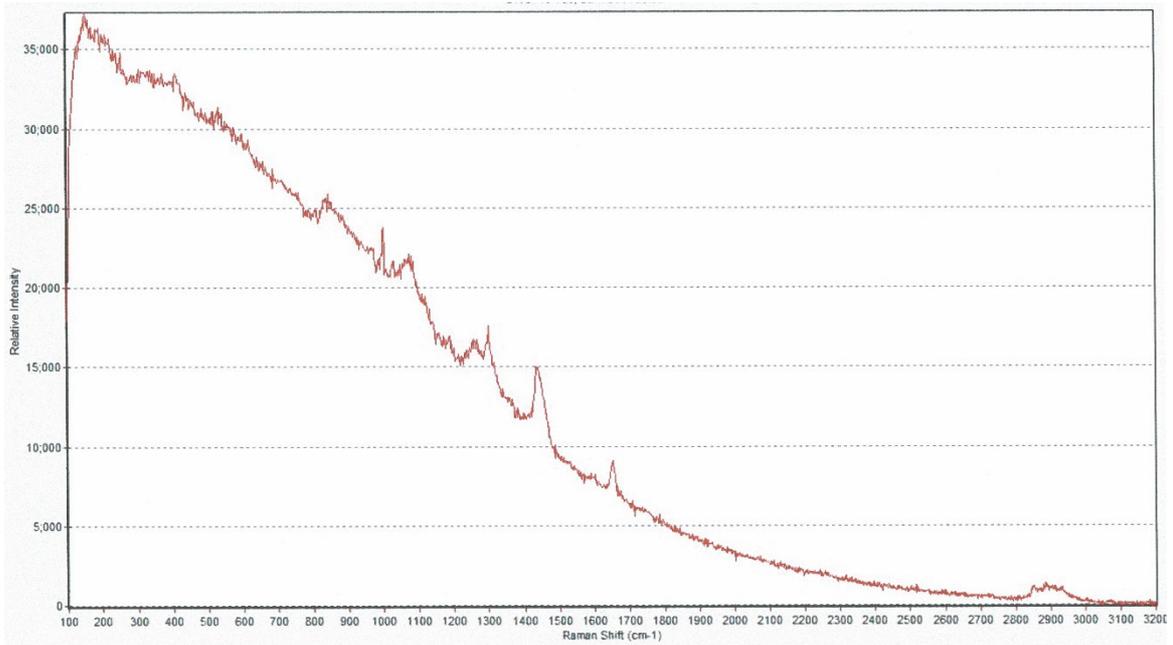


Figura 8.3. Espectro de almendras dulces con 50 mg de amigdalina

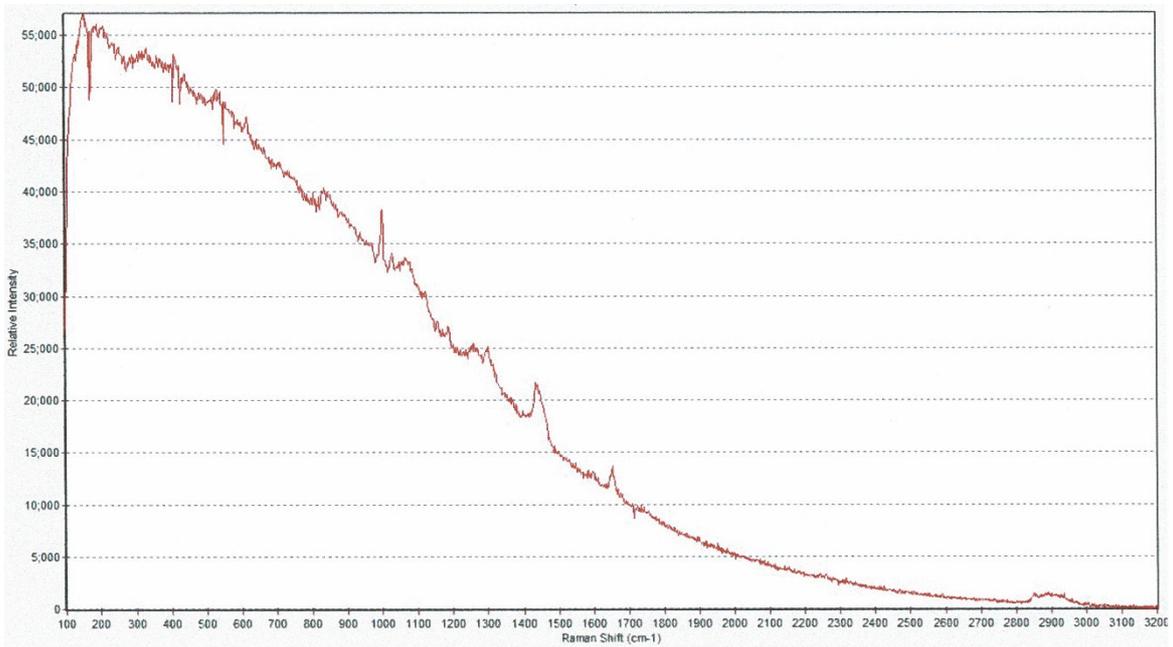


Figura 8.4. Espectro de almendras dulces con 100 mg de amigdalina

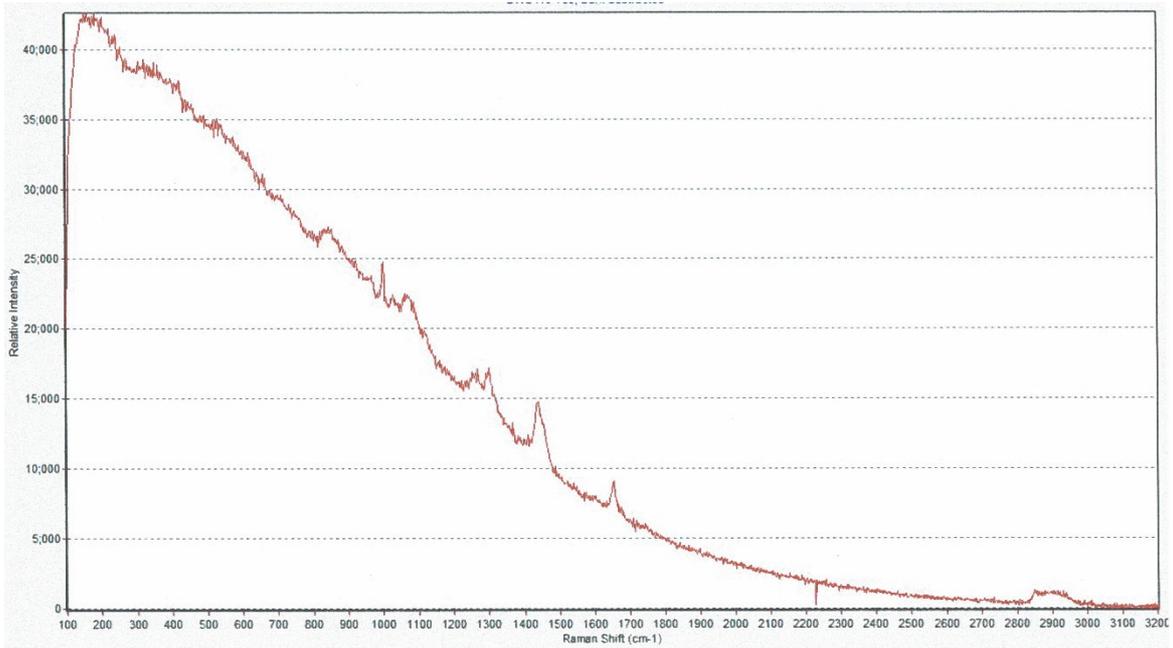


Figura 8.5. Espectro de almendras amargas (0 mg)

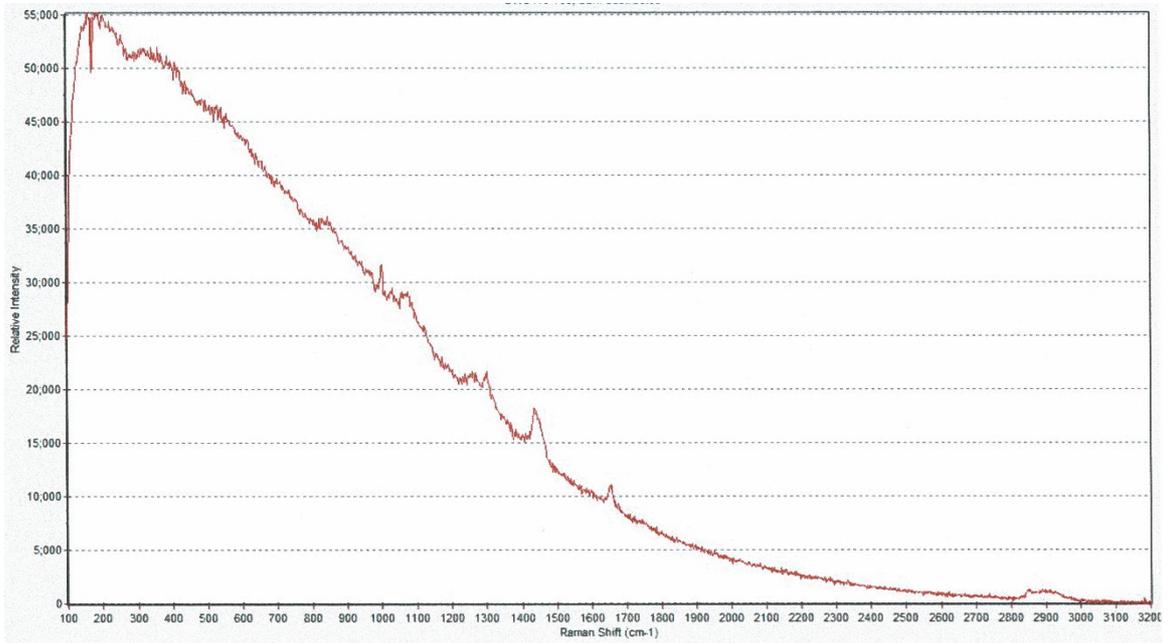


Figura 8.6. Espectro de almendras amargas con 10 mg amigdalina

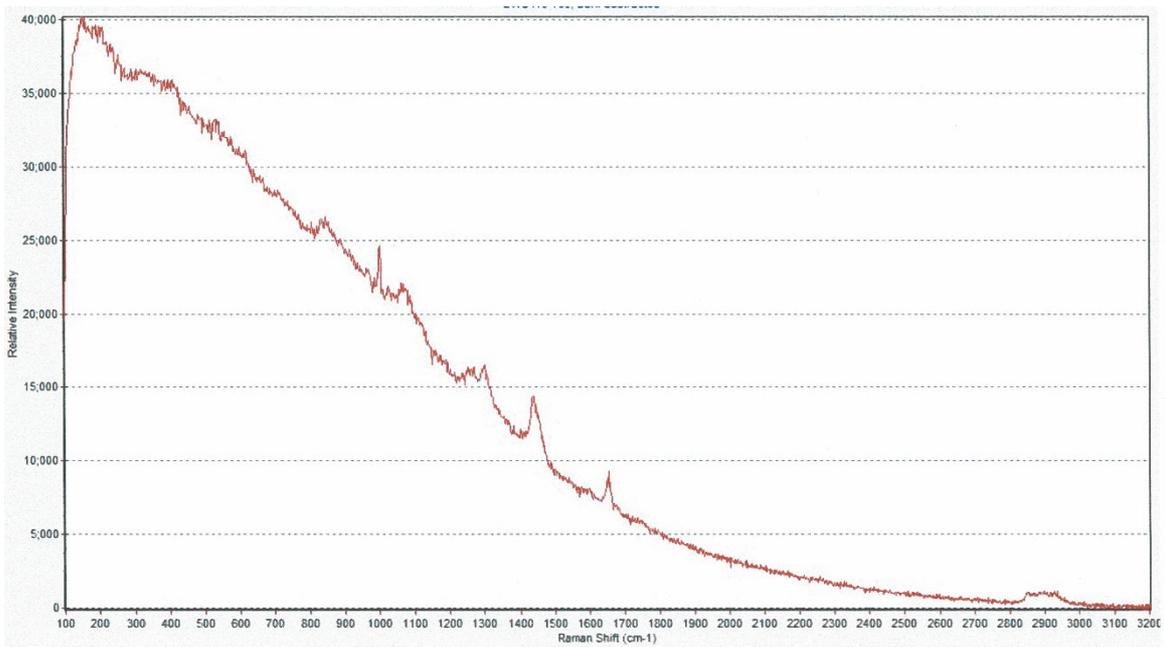


Figura 8.7. Espectro de almendras amargas con 50 mg de amigdalina

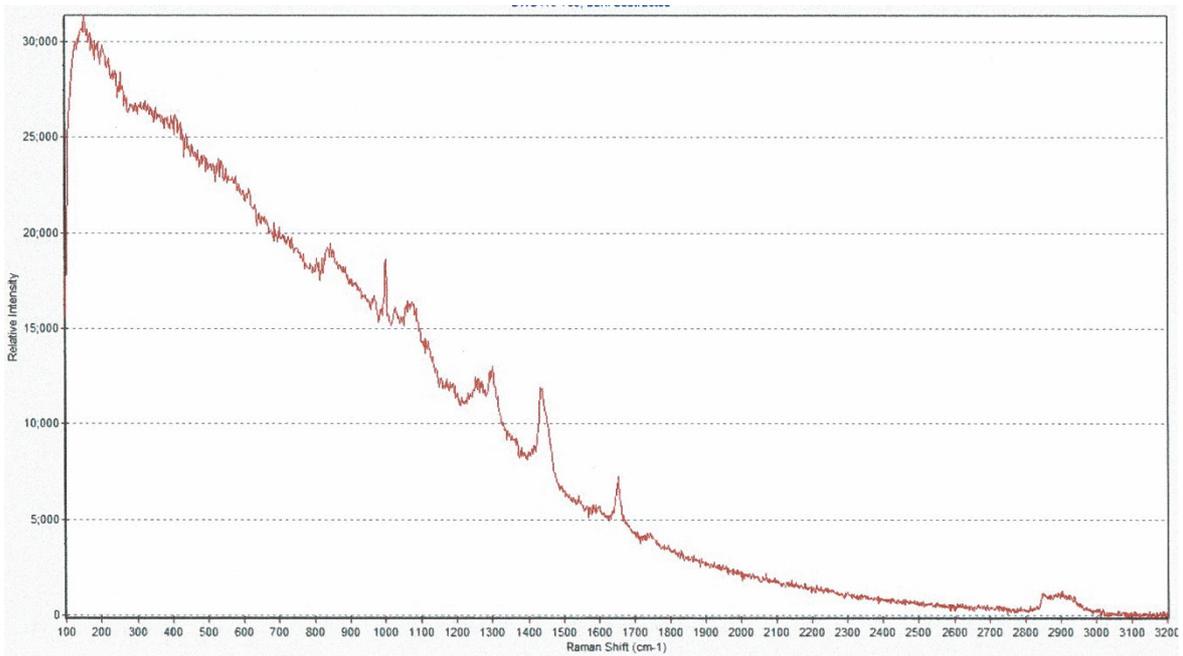


Figura 8.8. Espectro de almendras amargas con 100 mg de amigdalina

8.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

8.2.1. Estudio de la fase móvil

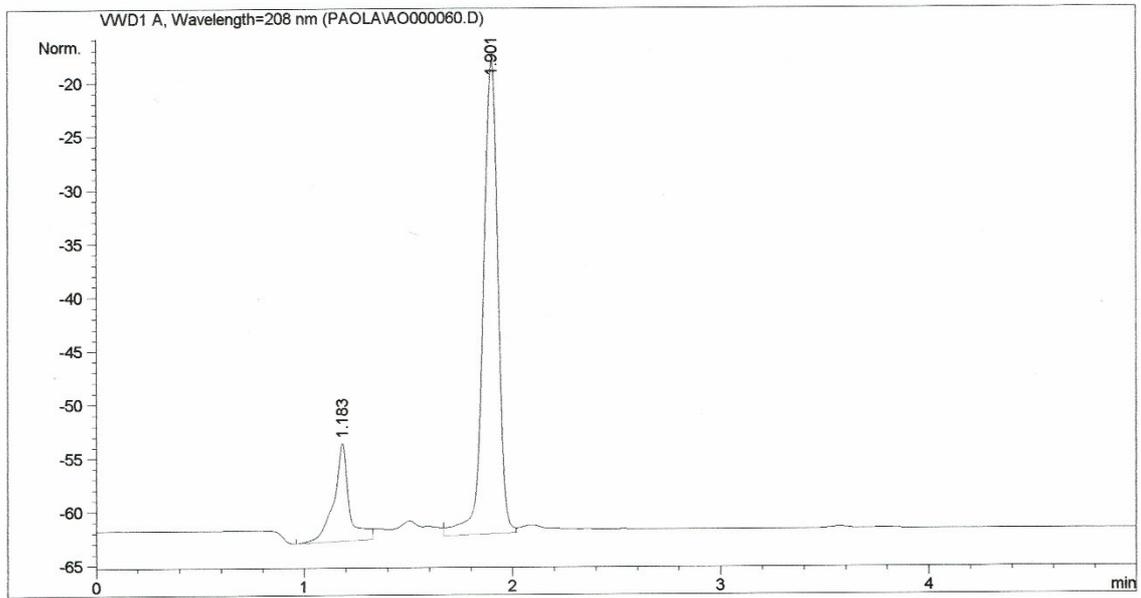


Figura 8.9. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 10,8 ppm (70:30)

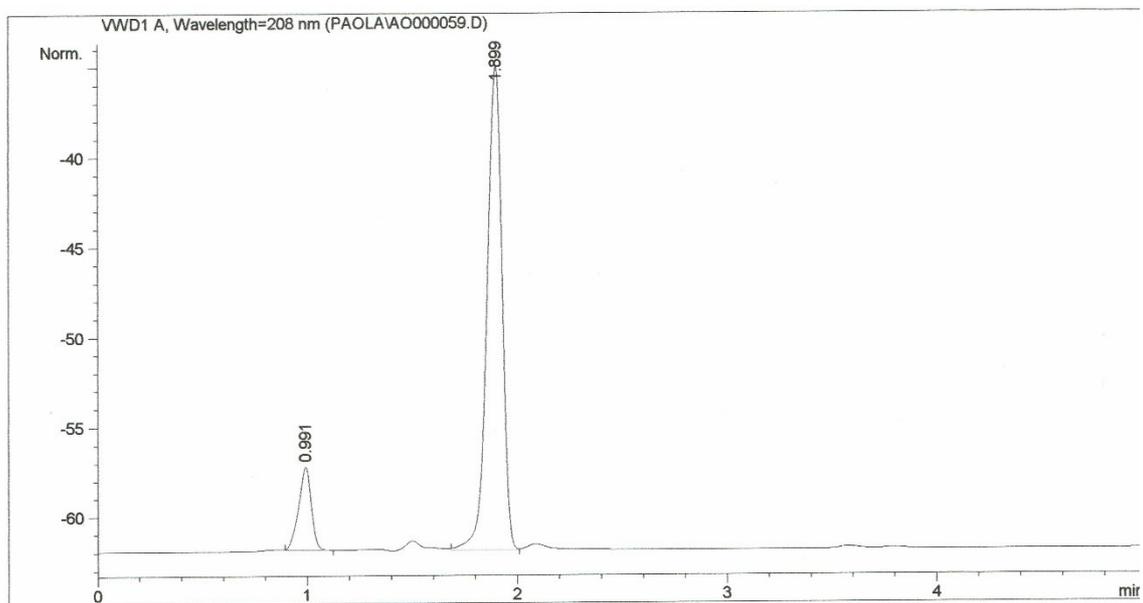


Figura 8.10. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 6,5 ppm (70:30)

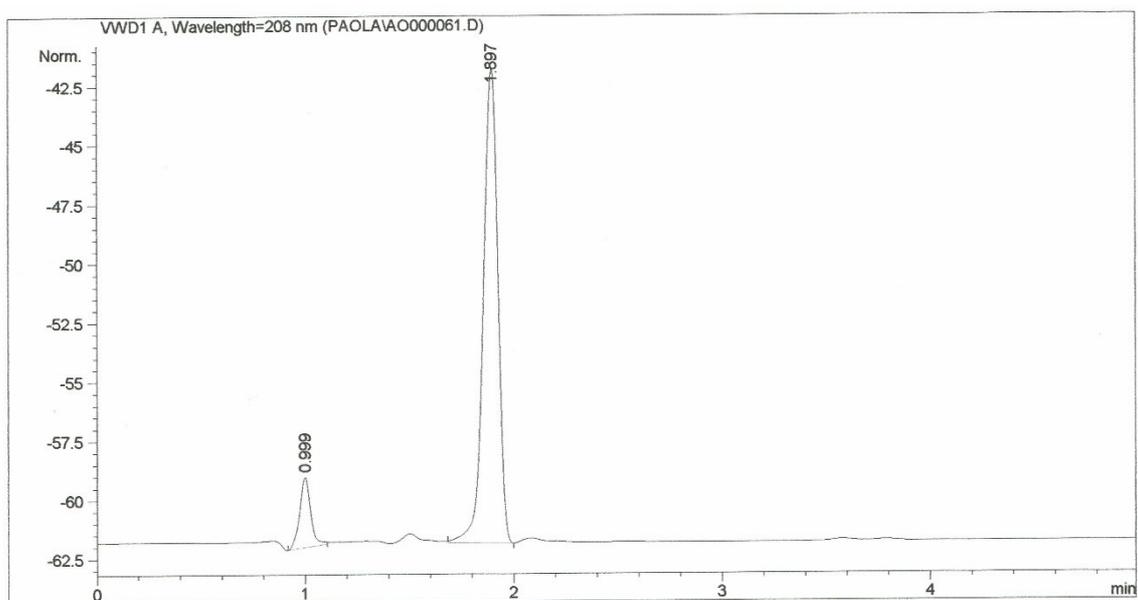


Figura 8.11. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 4,3 ppm (70:30)

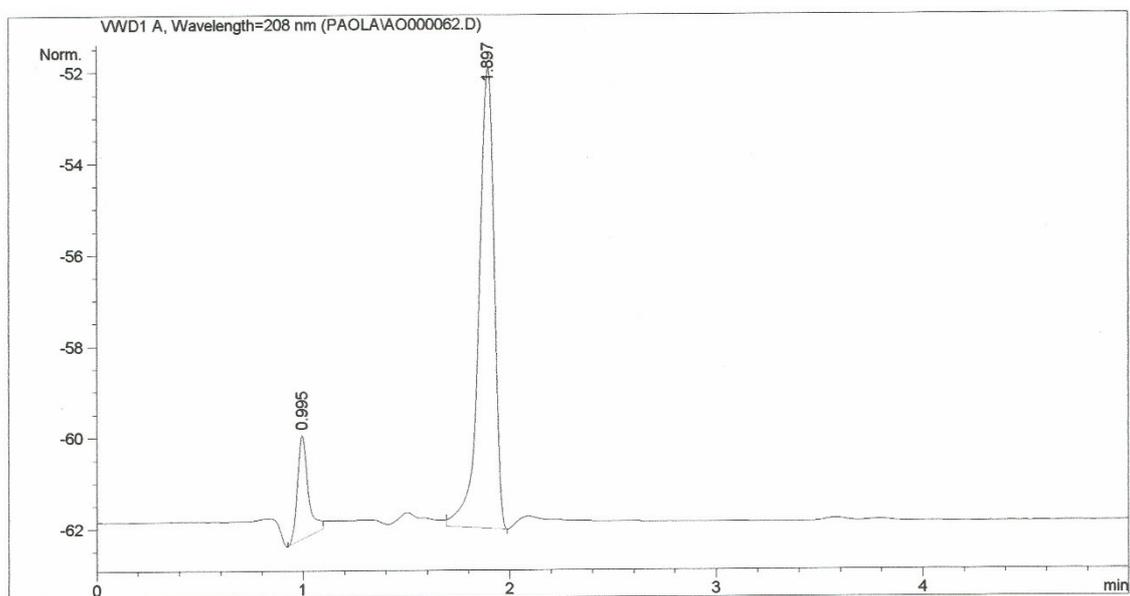


Figura 8.12. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 2,2 ppm (70:30)

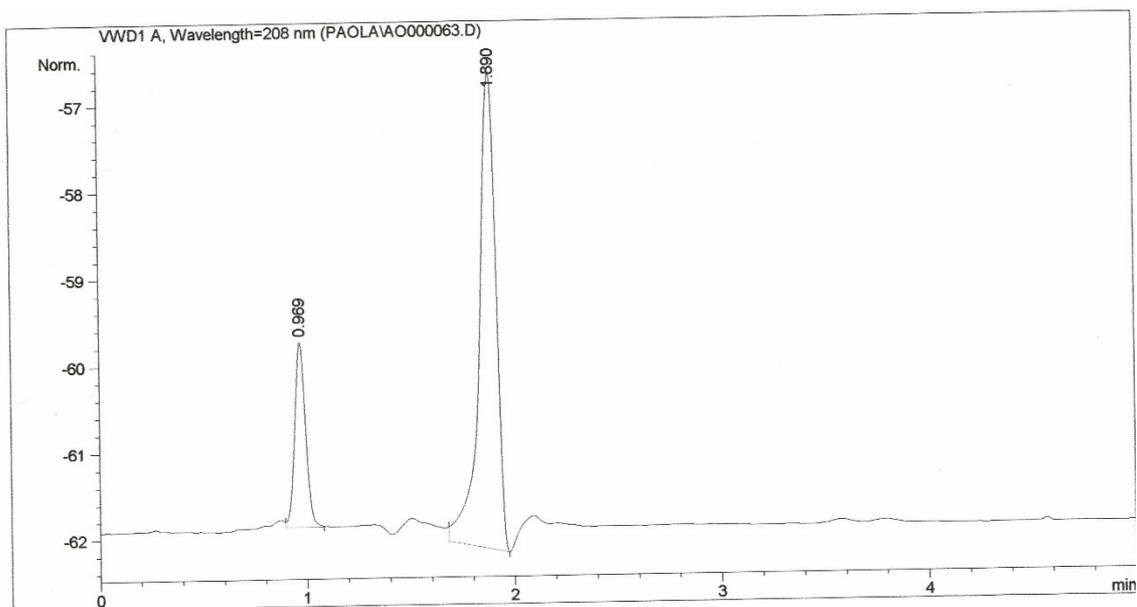


Figura 8.13. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 1,1 ppm (70:30)

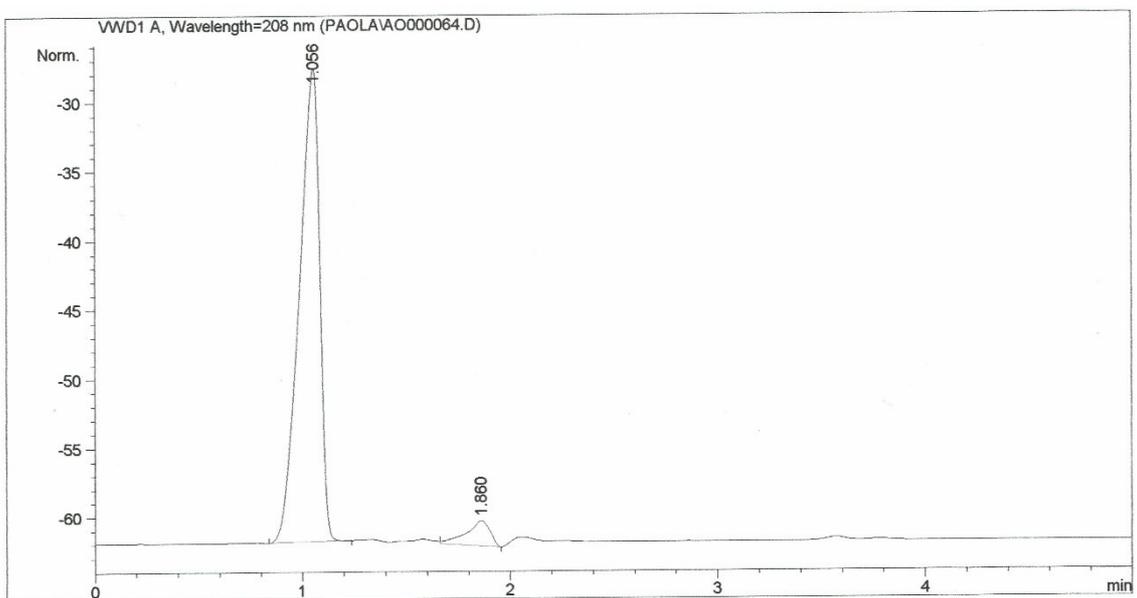


Figura 8.14. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 0,1 ppm (70:30)

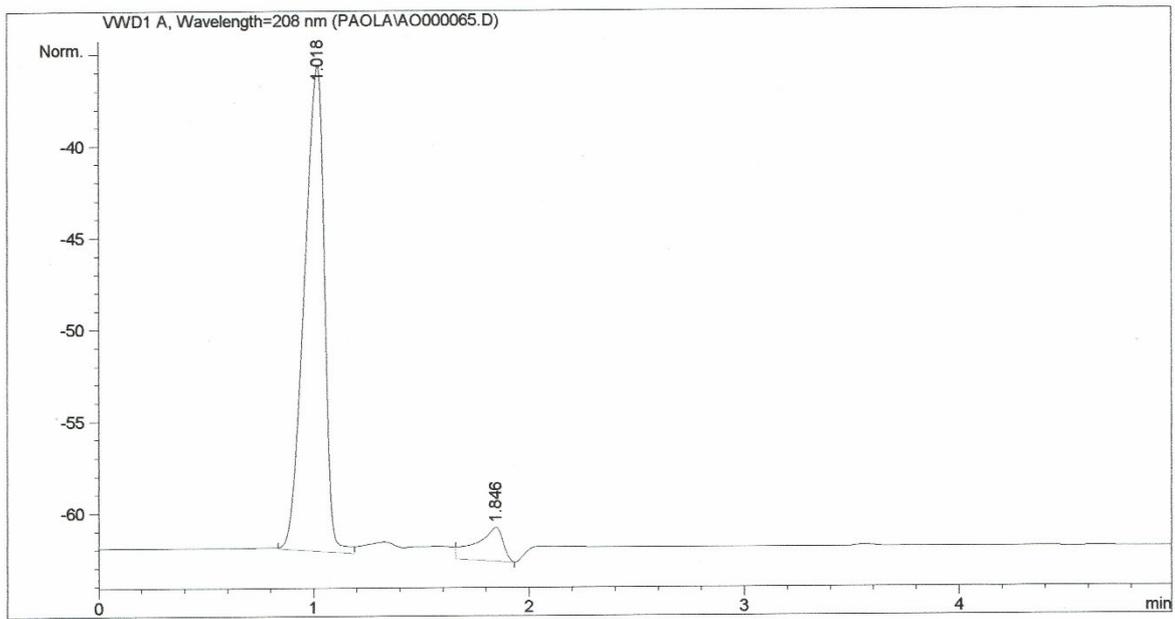


Figura 8.15. Cromatograma patrón de amigdalina en agua 0,01 ppm (70:30)

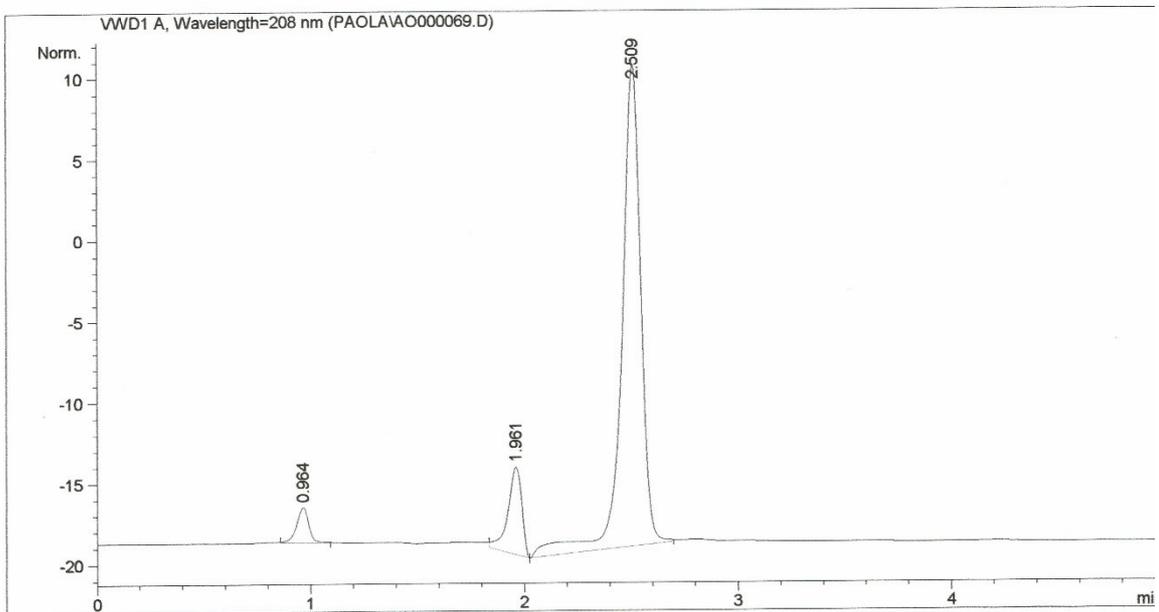


Figura 8.16. Cromatograma con condiciones de fase móvil 80% agua y 20% acetonitrilo (8,6 ppm)

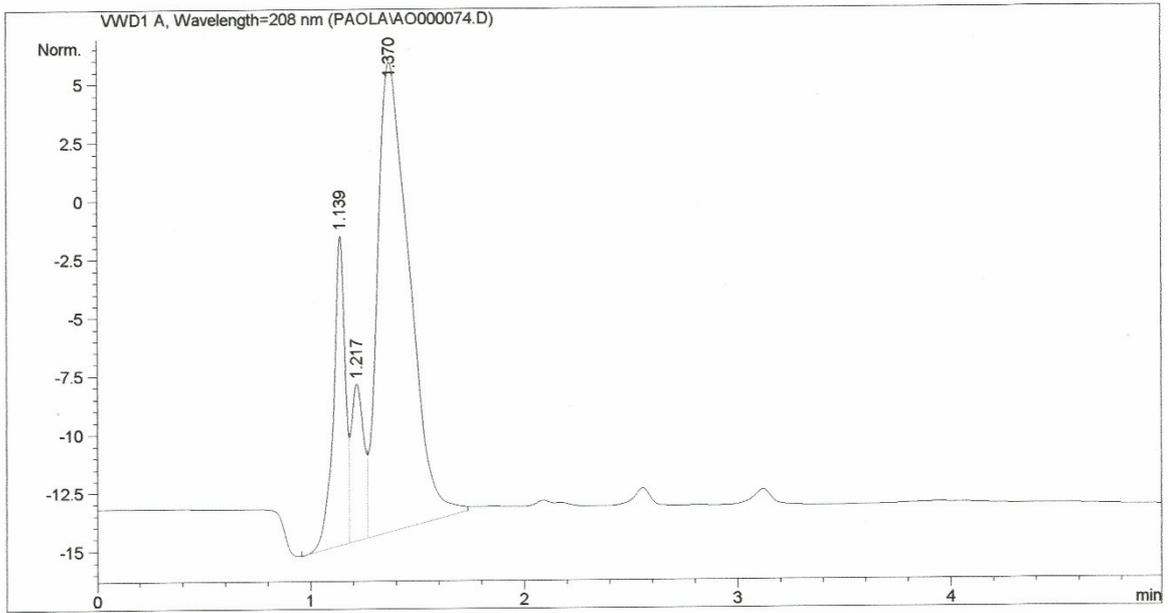


Figura 8.17. Cromatograma con condiciones de fase móvil 50% agua y 50% acetonitrilo

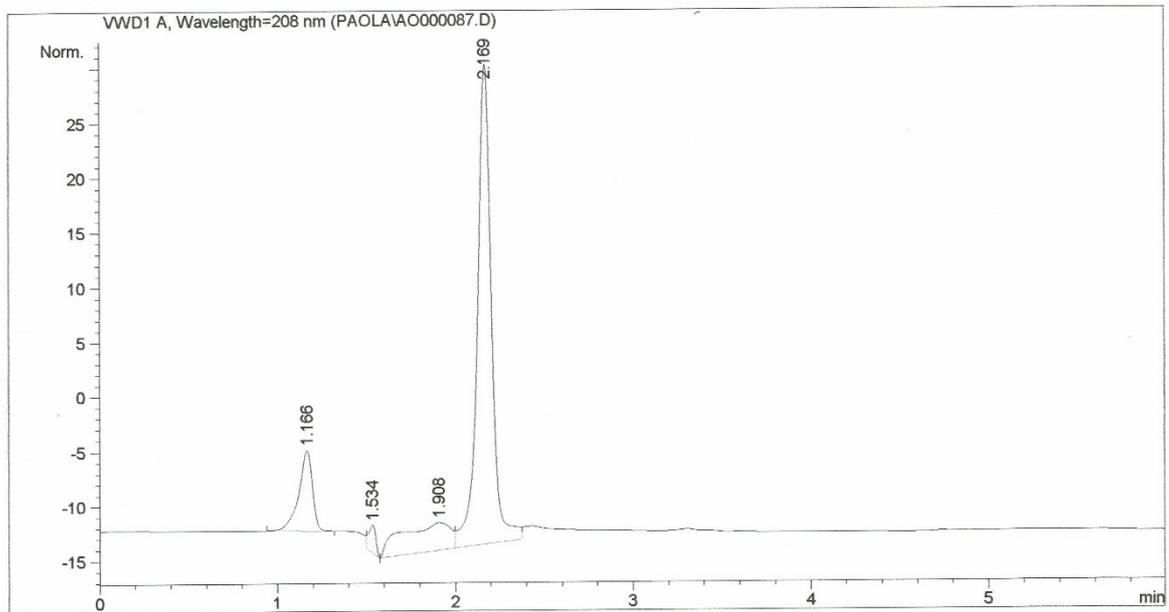


Figura 8.18. Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 20% acetonitrilo y 10% metanol (10,8 ppm)

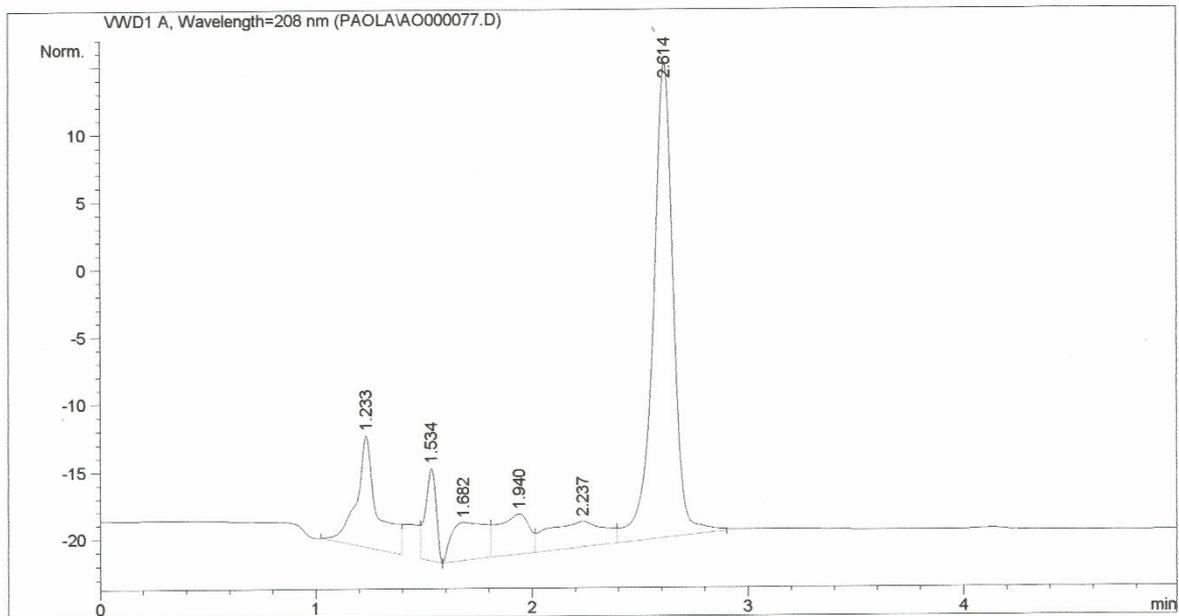


Figura 8.19. Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 15% acetonitrilo y 15% metanol (10,8 ppm)

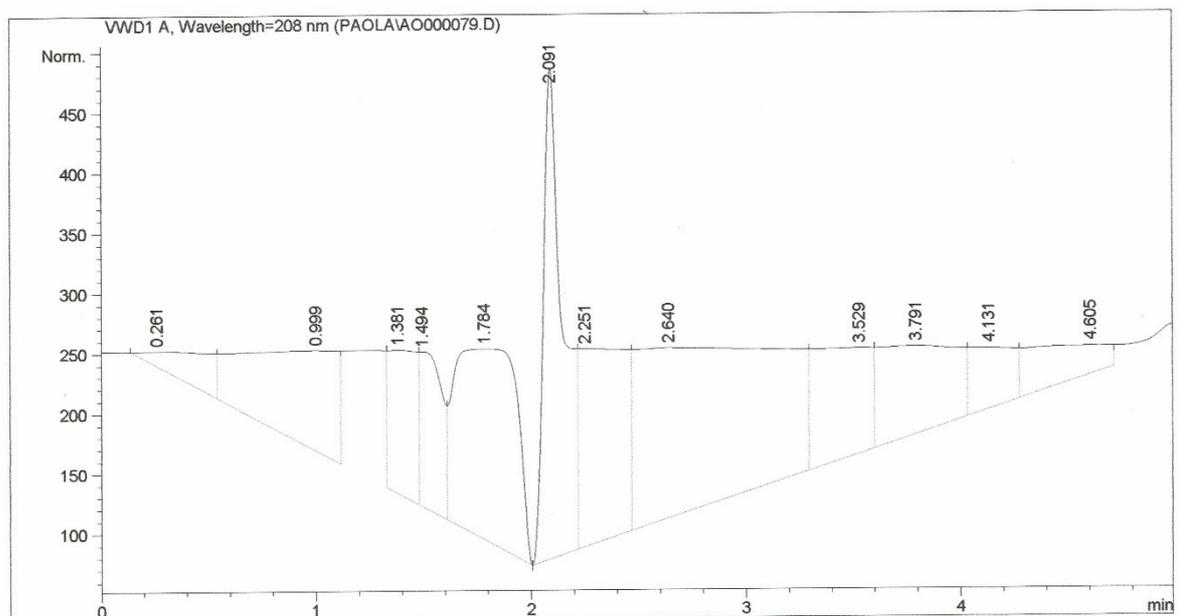


Figura 8.20. Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 10% acetonitrilo, 10% metanol y 10% ácido acético (10,8 ppm)

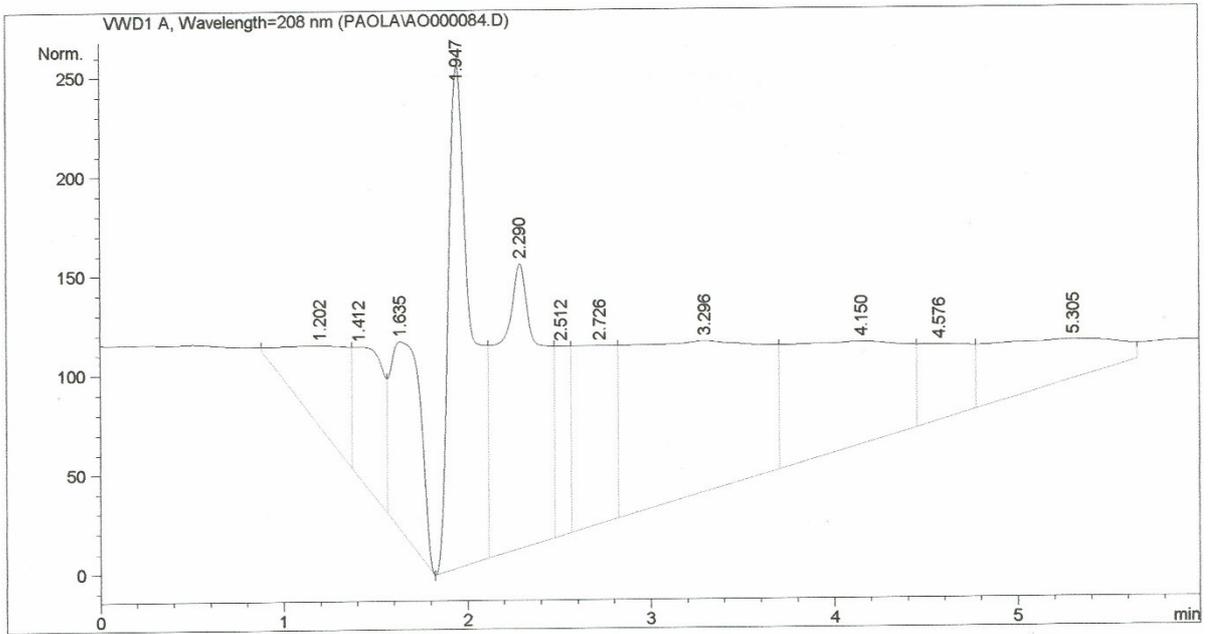


Figura 8.21. Cromatograma con condiciones de fase móvil 70% agua, 20% acetonitrilo, 5% metanol y 5% ácido acético (10,8 ppm)

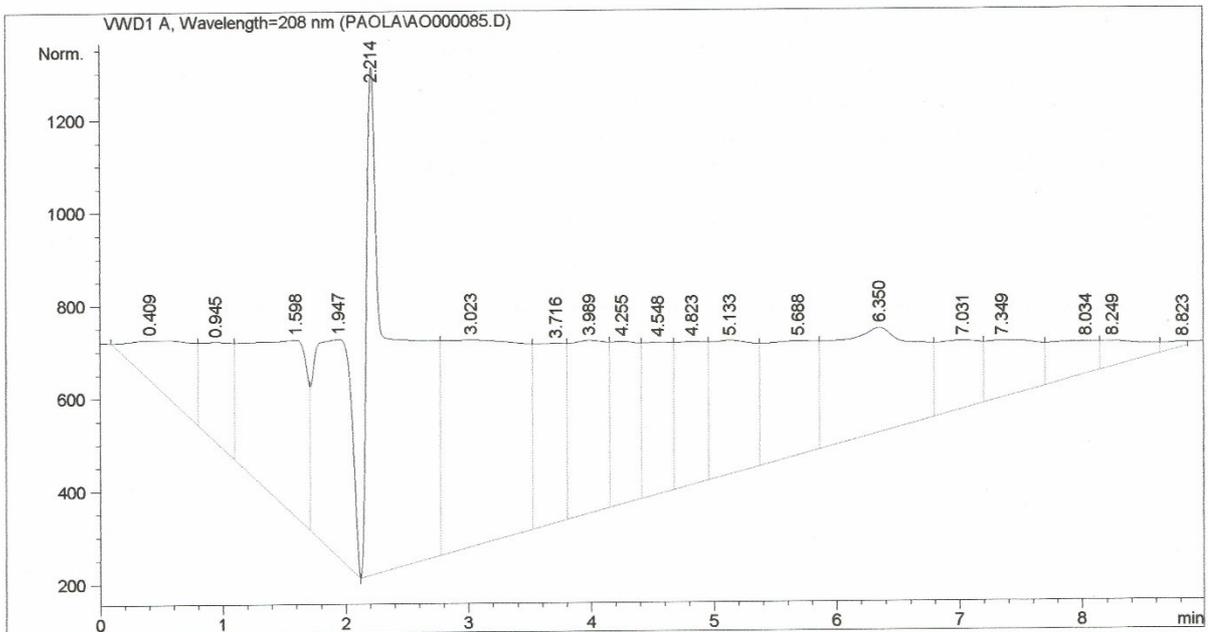


Figura 8.22. Cromatograma con condiciones de fase móvil 60% agua, 10% acetonitrilo, 5% metanol y 25% ácido acético (21,6 ppm)

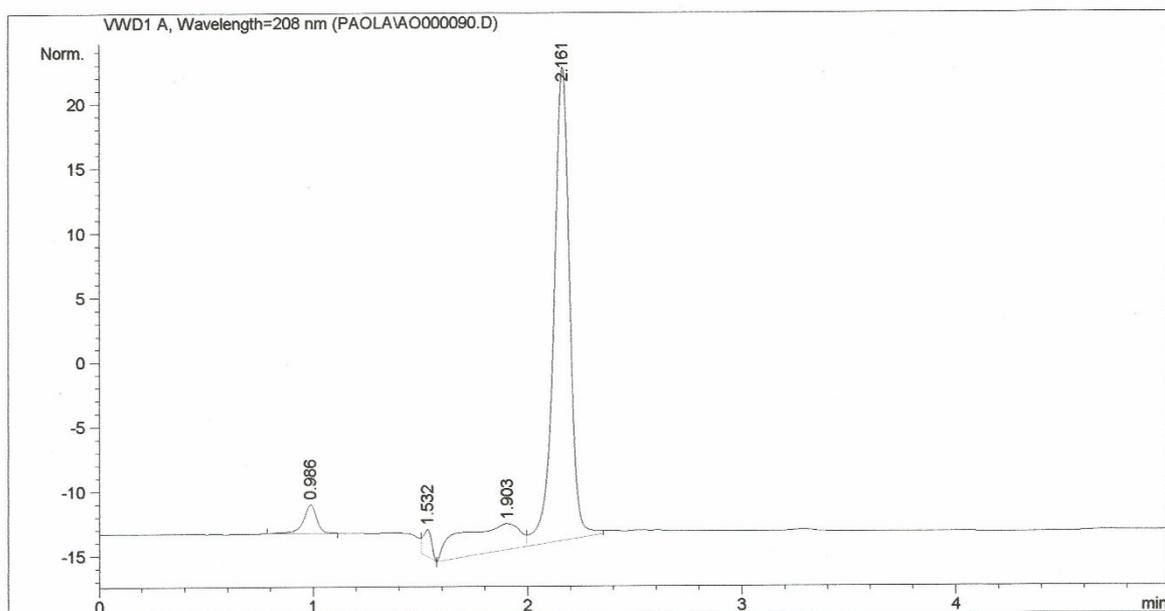


Figura 8.23. Cromatograma patrón amigdalina en agua 8,6 ppm (69.5:20:10:0.5)

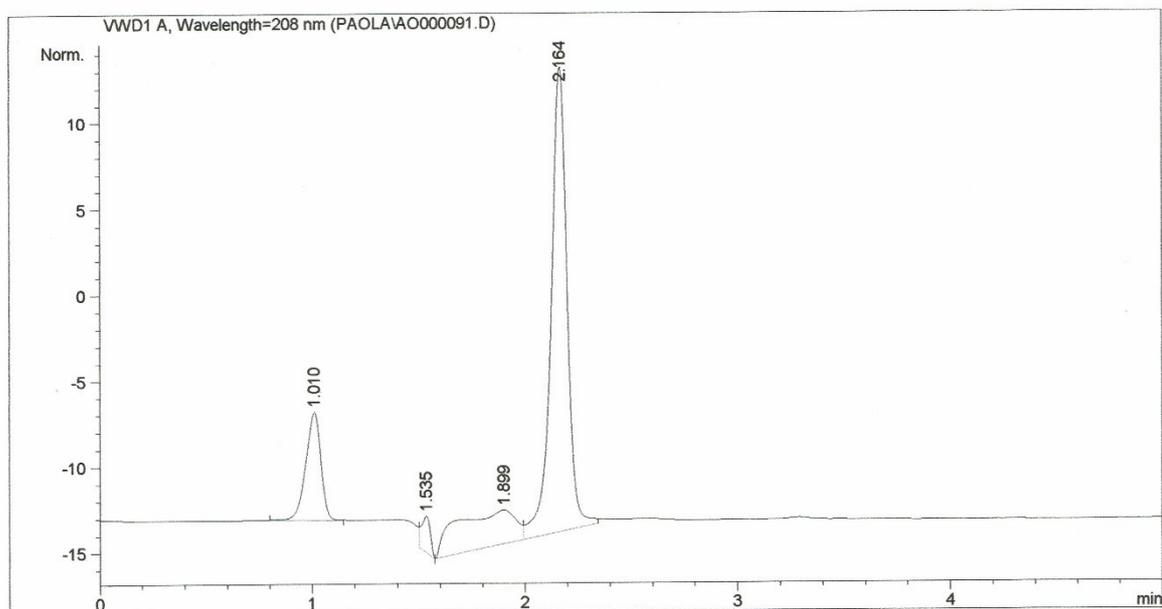


Figura 8.24. Cromatograma patrón amigdalina en agua 6,5 ppm (69.5:20:10:0,5)

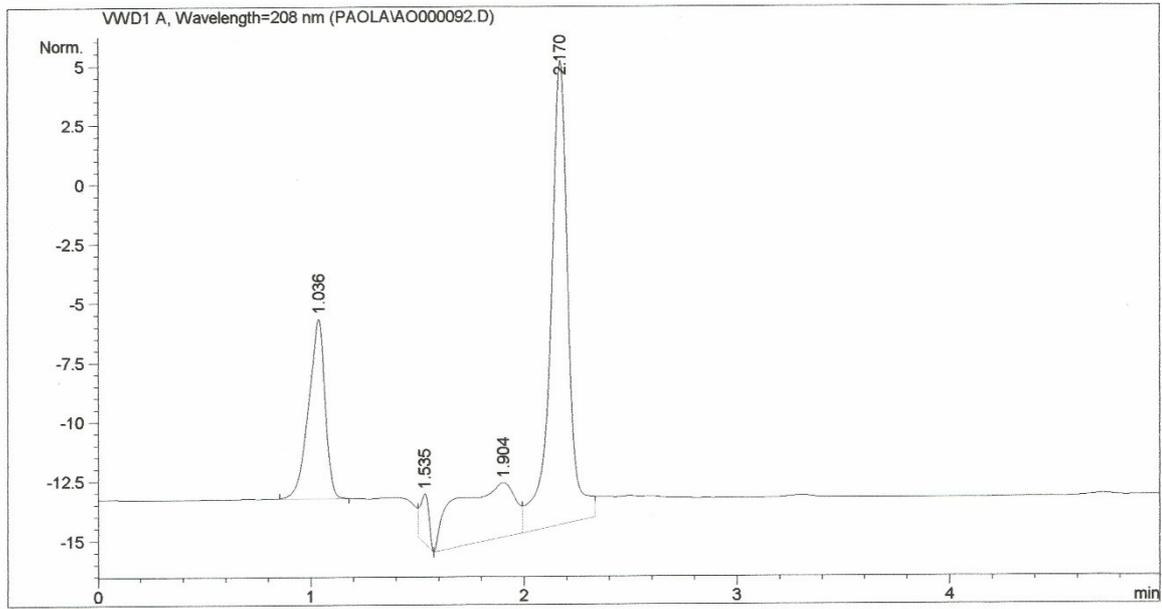


Figura 8.25. Cromatograma patrón amigdalina en agua 4,3 ppm (69.5:20:10:0.5)

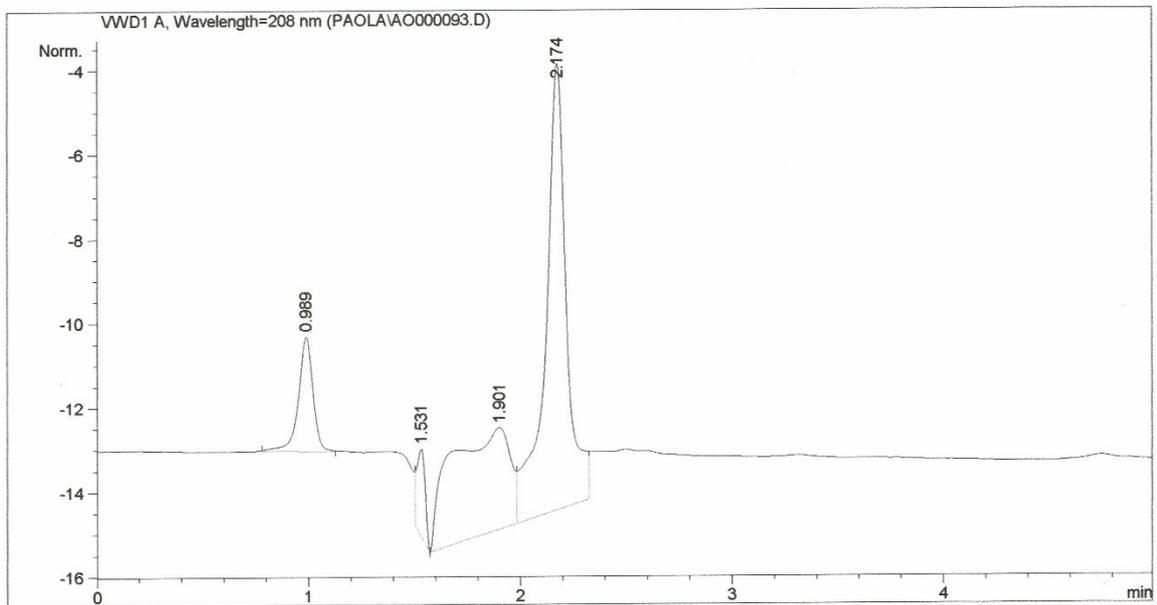


Figura 8.26. Cromatograma patrón amigdalina en agua 2,2 ppm (69.5;20:10:0.5)

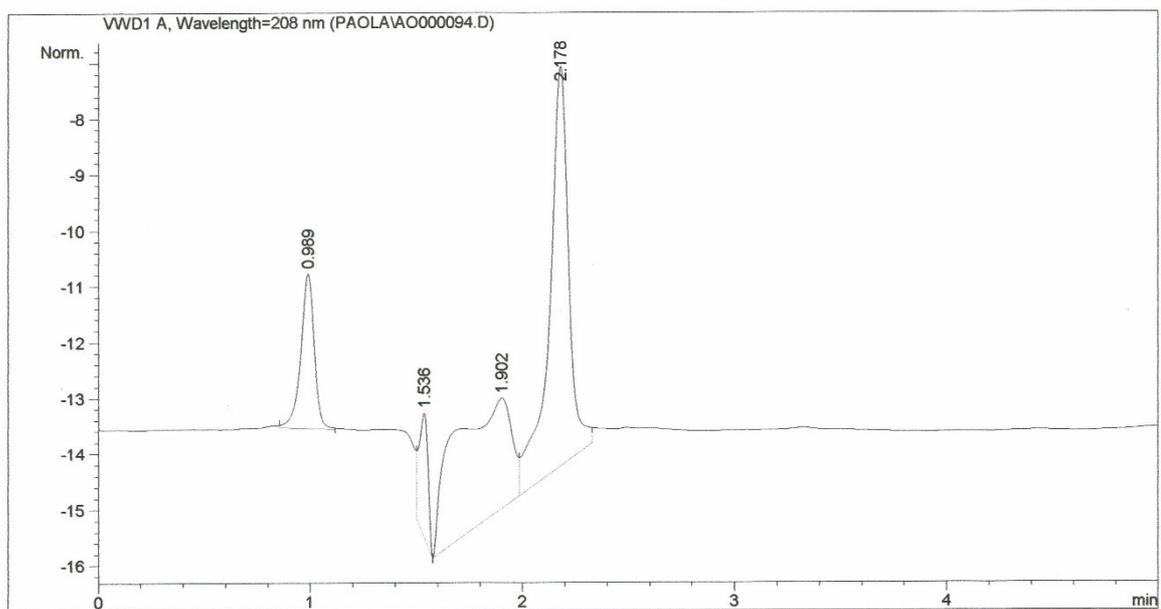


Figura 8.27. Cromatograma patrón amigdalina en agua 1,1 ppm (69.5:20:10:0.5)

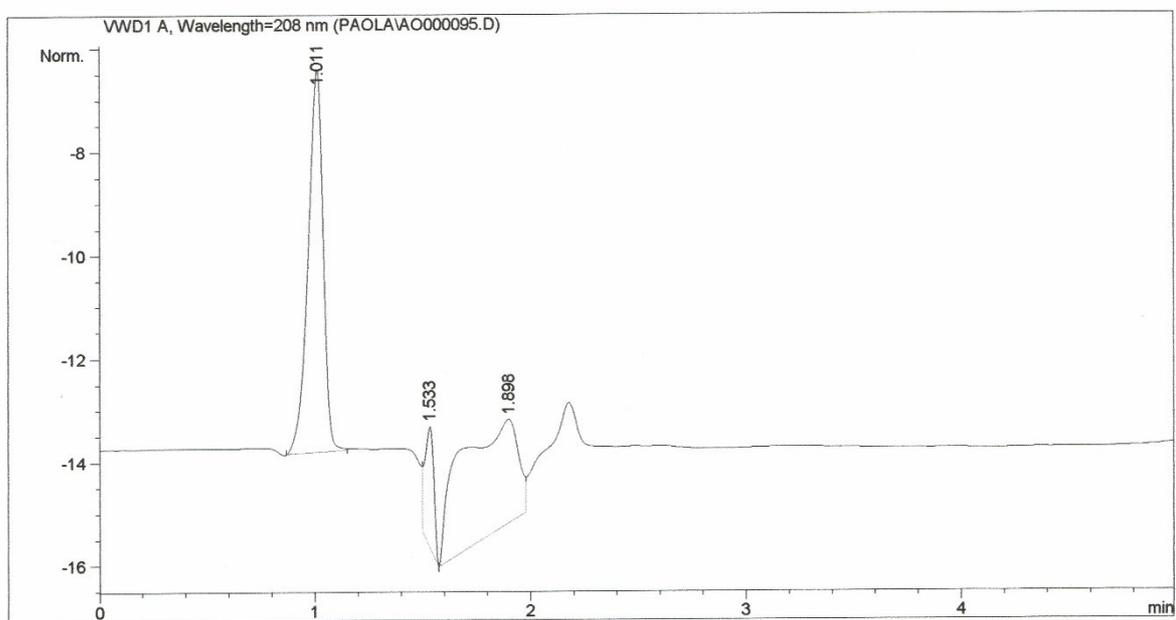


Figura 8.28. Cromatograma patrón amigdalina en agua 0,1 ppm (69.5:20:10:0.5)

8.2.2. Calibrado de la disolución de amígdalina preparada en metanol

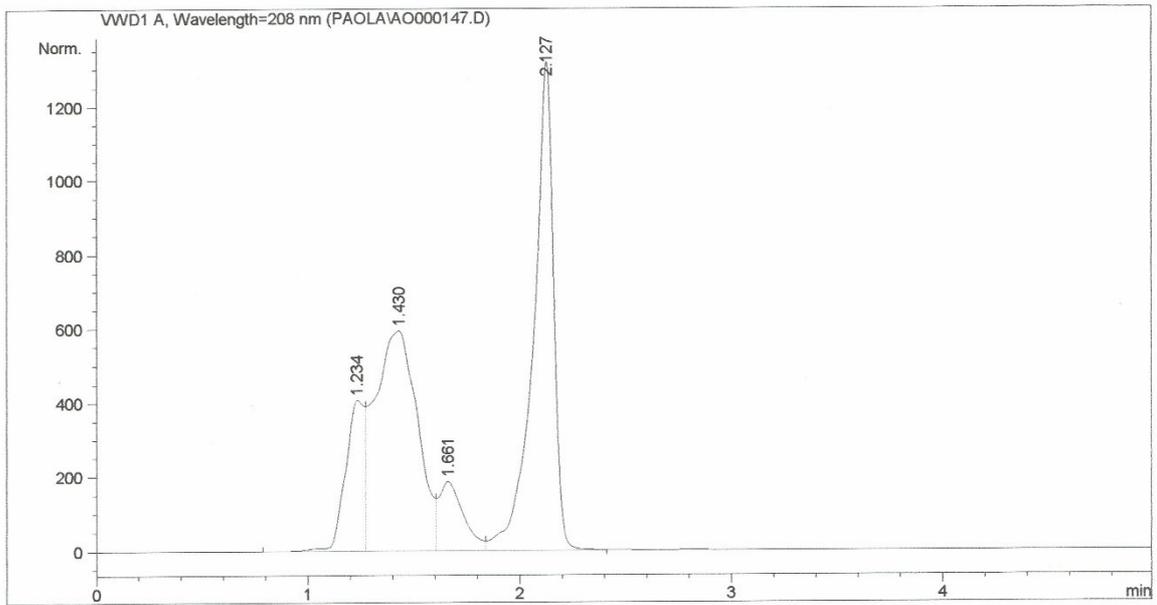


Figura 8.29. Cromatograma patrón amígdalina en metanol 1088,0 ppm (69.5:20:10:0.5)

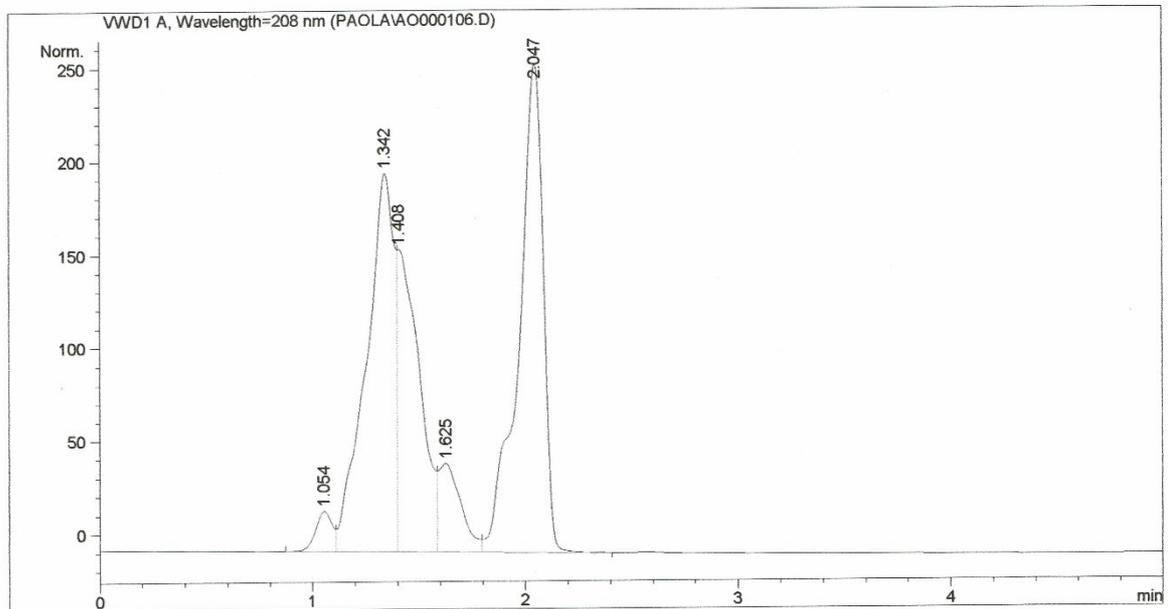


Figura 8.30. Cromatograma patrón amígdalina en metanol 272,0 ppm (69.5:20:10:0.5)

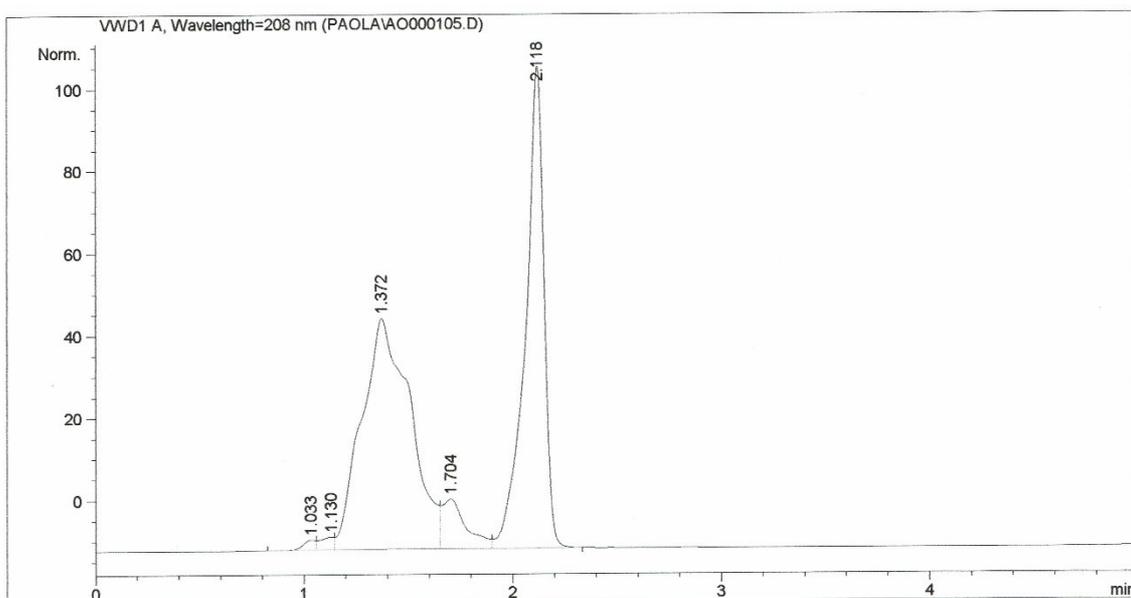


Figura 8.31. Cromatograma patrón amigdalina en metanol 87,0 ppm (69.5:20:10:0.5)

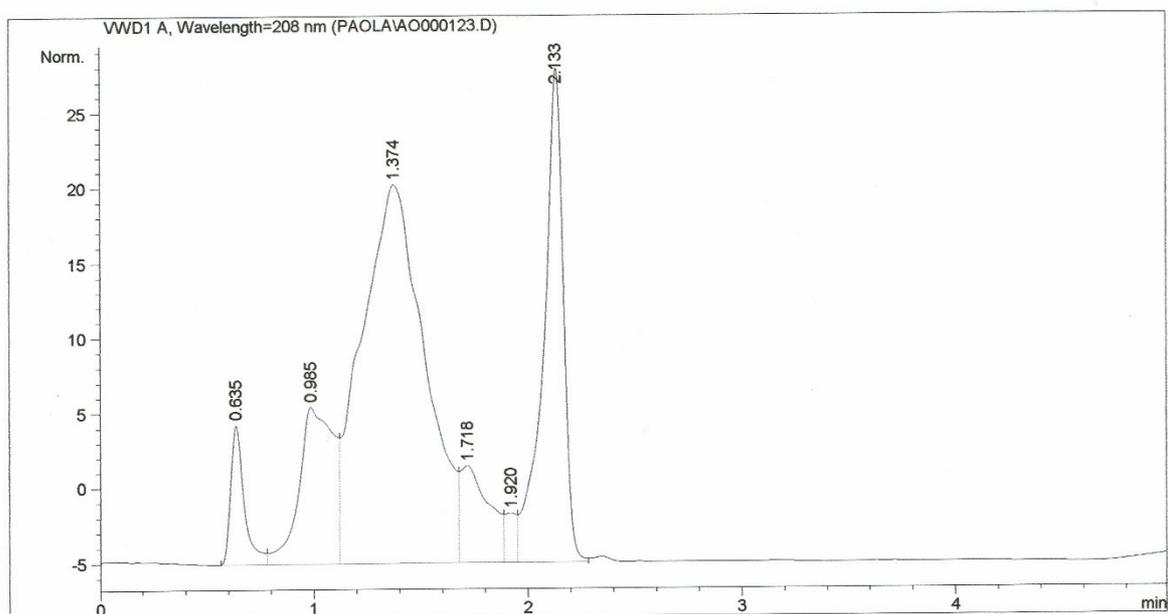


Figura 8.32. Cromatograma patrón amigdalina en metanol 27,2 ppm (69.5:20:10:0.5)

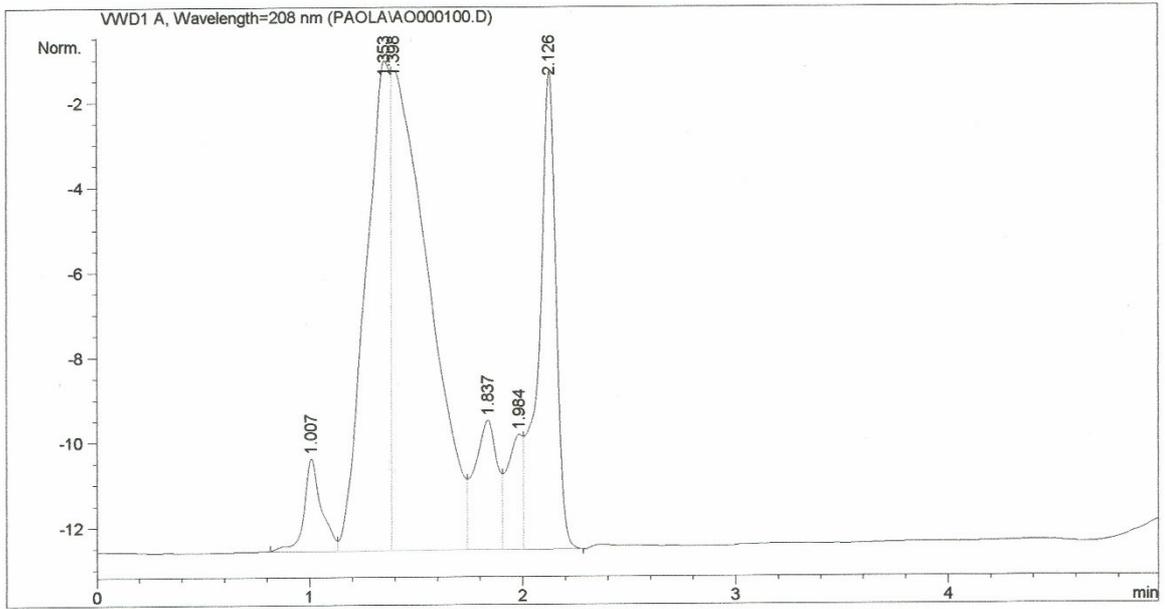


Figura 8.33. Cromatograma patrón amigdalina en metanol 8,7 ppm (69.5:20:10:0.5)

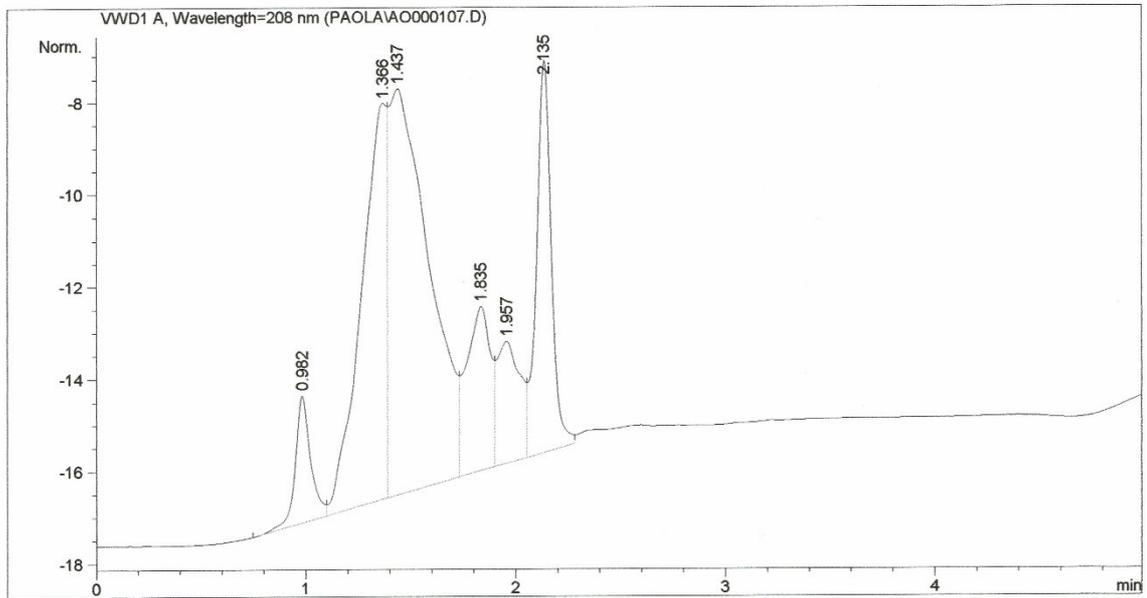


Figura 8.34. Cromatograma patrón amigdalina en metanol 4,3 ppm (69.5:20:10:0.5)

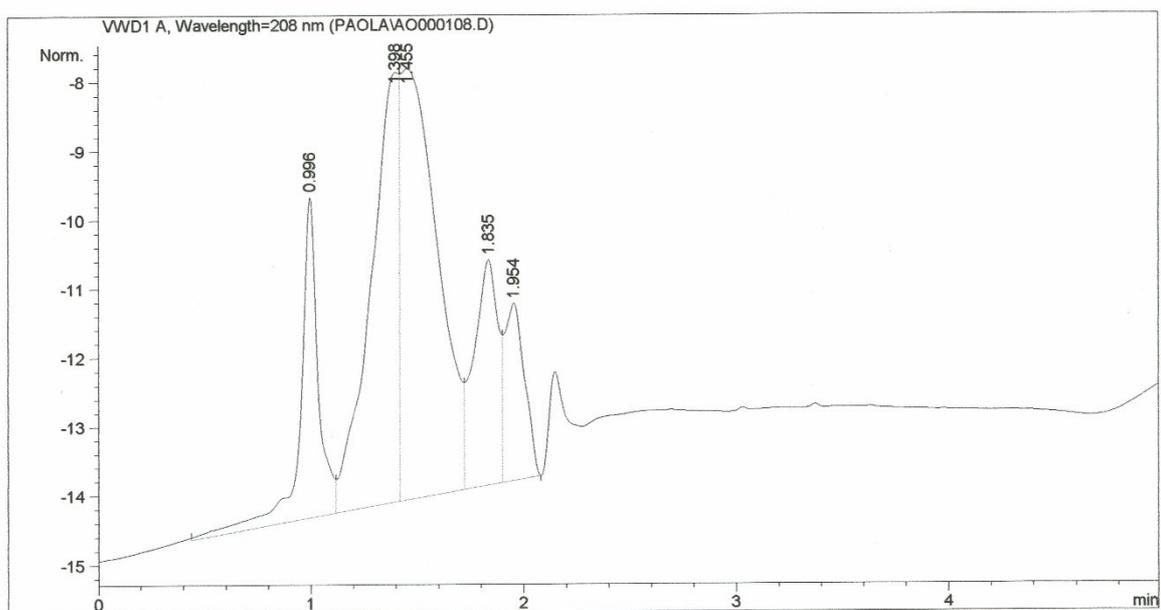


Figura 8.35. Cromatograma patrón amigdalina en metanol 1,1 ppm (69.5:20:10:0.5)

8.2.3. Determinación de amigdalina en extracciones de almendras dulces

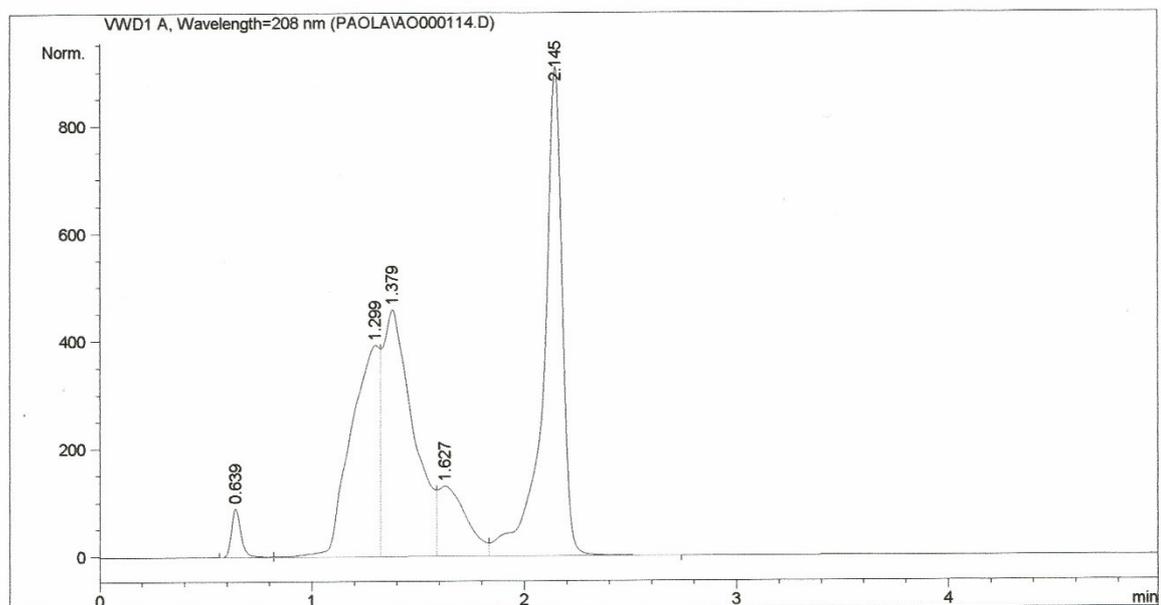


Figura 8.36. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 10 mg de amigdalina

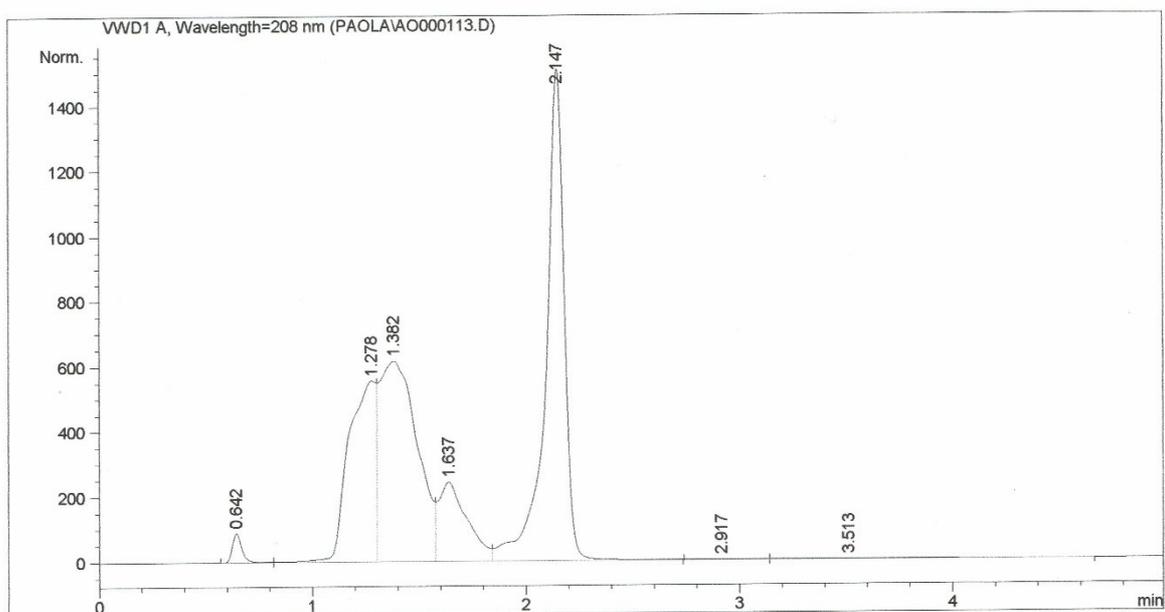


Figura 8.37. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 20 mg de amigdalina

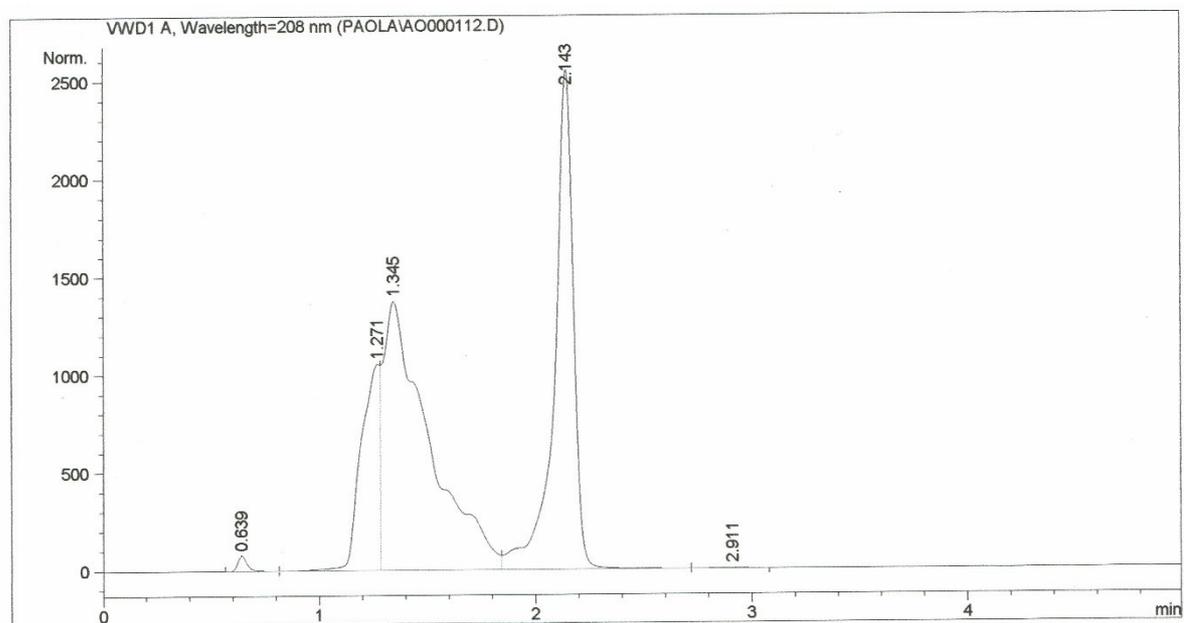


Figura 8.38. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 40 mg de amigdalina

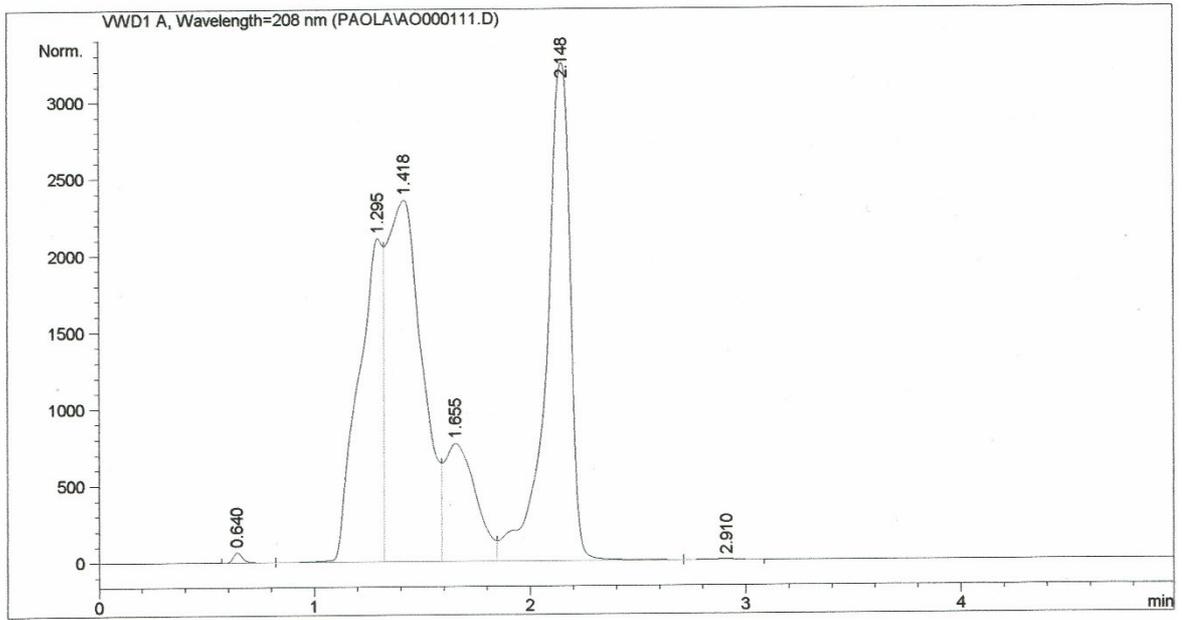


Figura 8.39. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 80 mg de amigdalina

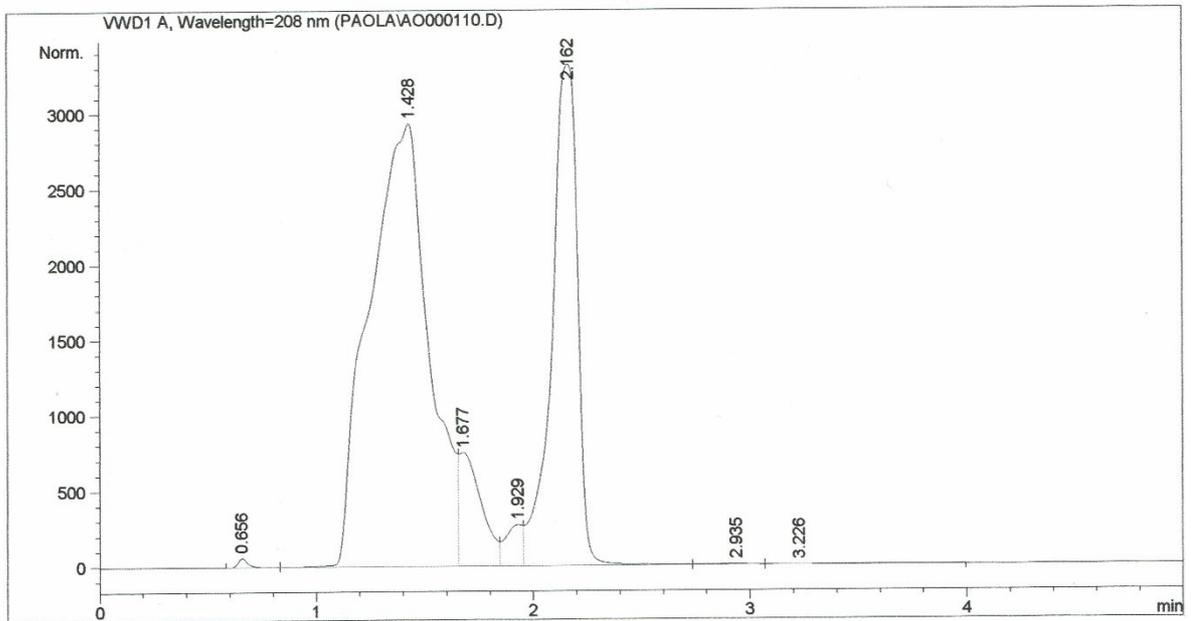


Figura 8.40. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 100 mg de amigdalina

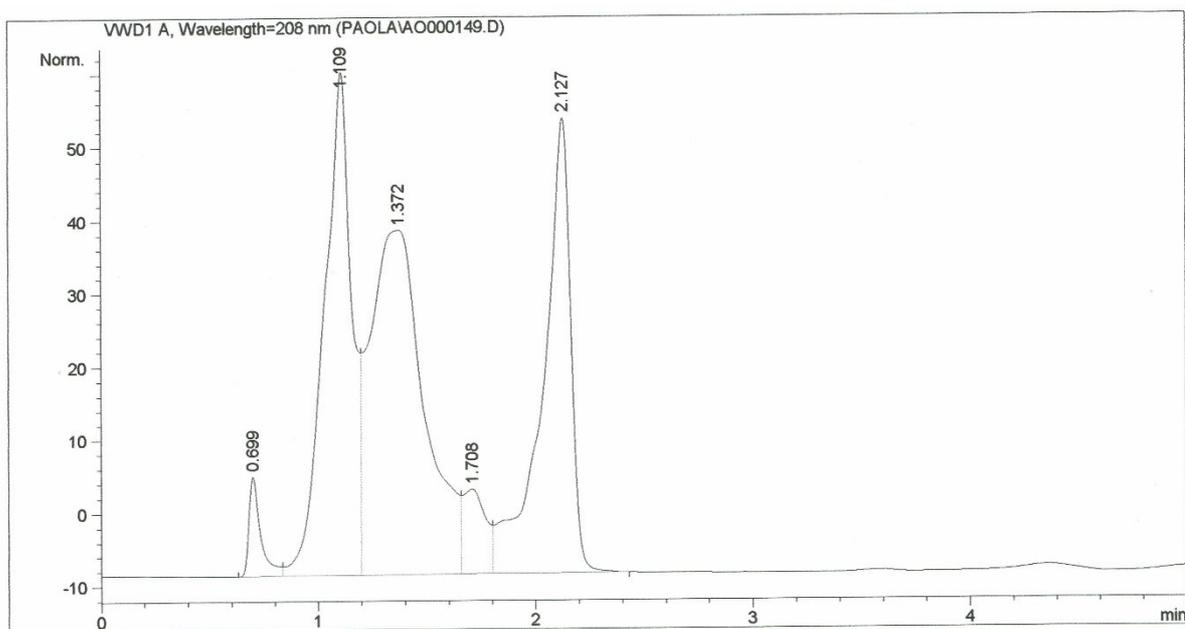


Figura 8.41. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 10 mg (dilución 1:10)

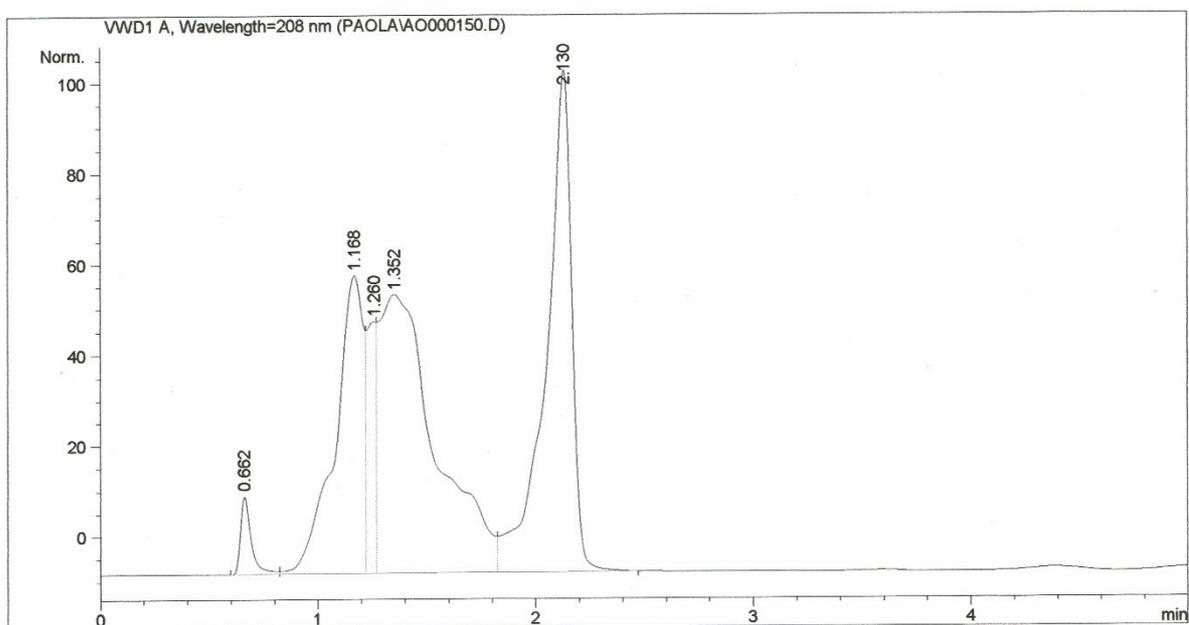


Figura 8.42. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 20 mg (dilución 1:10)

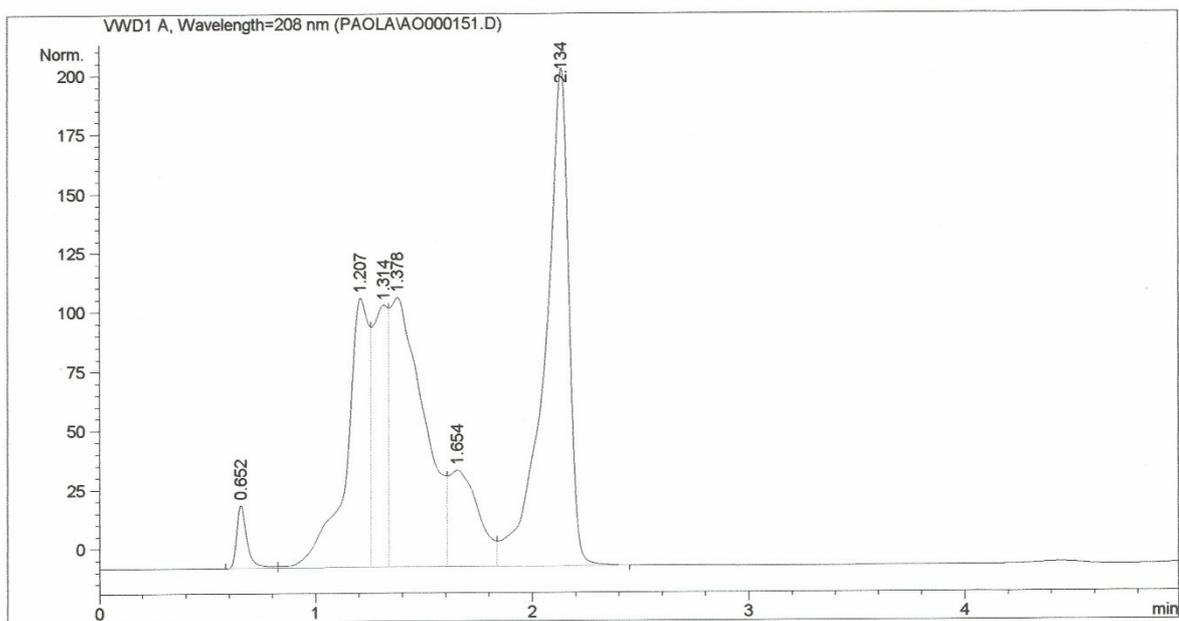


Figura 8.43. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 40 mg (dilución 1:10)

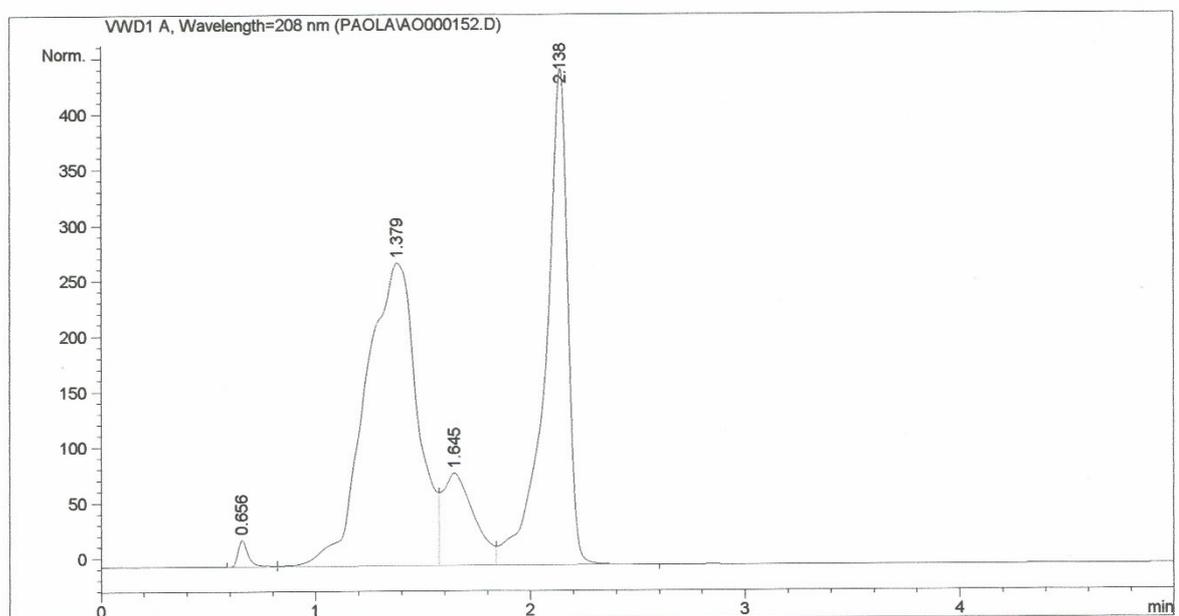


Figura 8.44. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 80 mg (dilución 1:10)

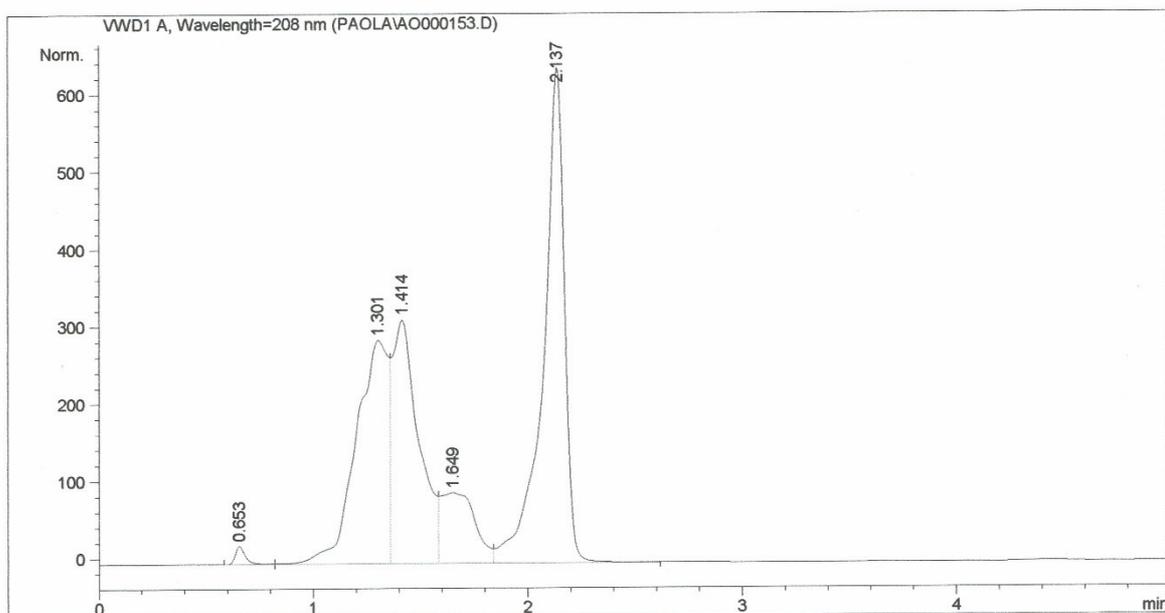


Figura 8.45. Cromatograma de la extracción de almendras dulces con 100 mg (dilución 1:10)

8.2.4. Método de adiciones patrón para las almendras dulces

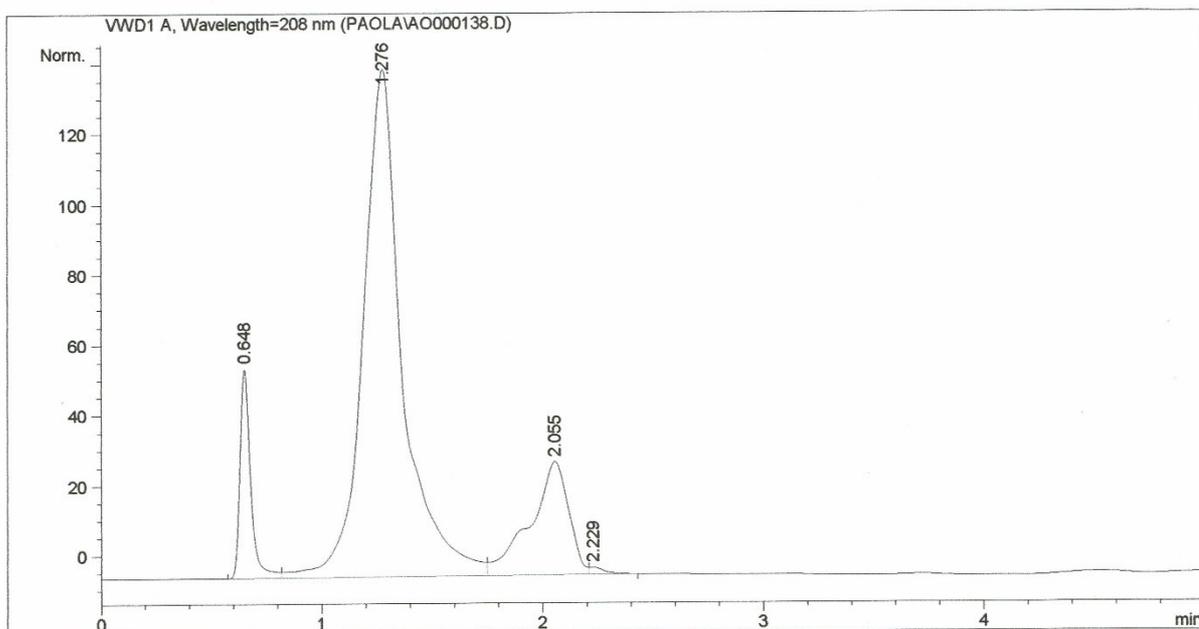


Figura 8.46. Cromatograma de la extracción MAP con 2 ml de 136,0 ppm

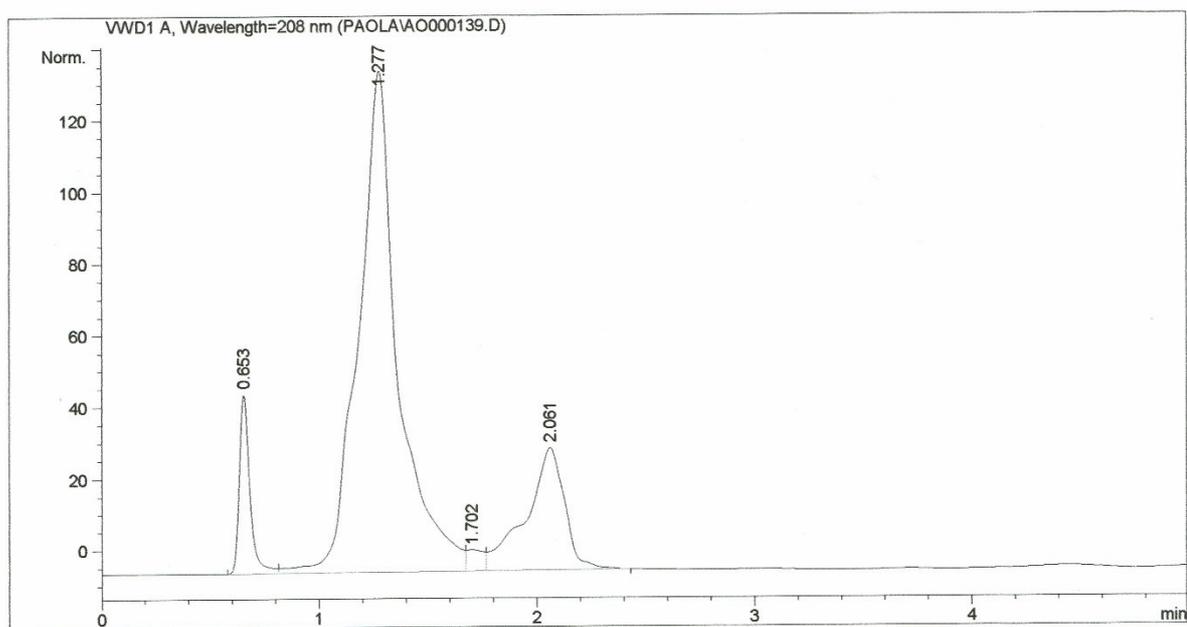


Figura 8.47. Cromatograma de la extracción MAP con 3 ml de 136,0 ppm

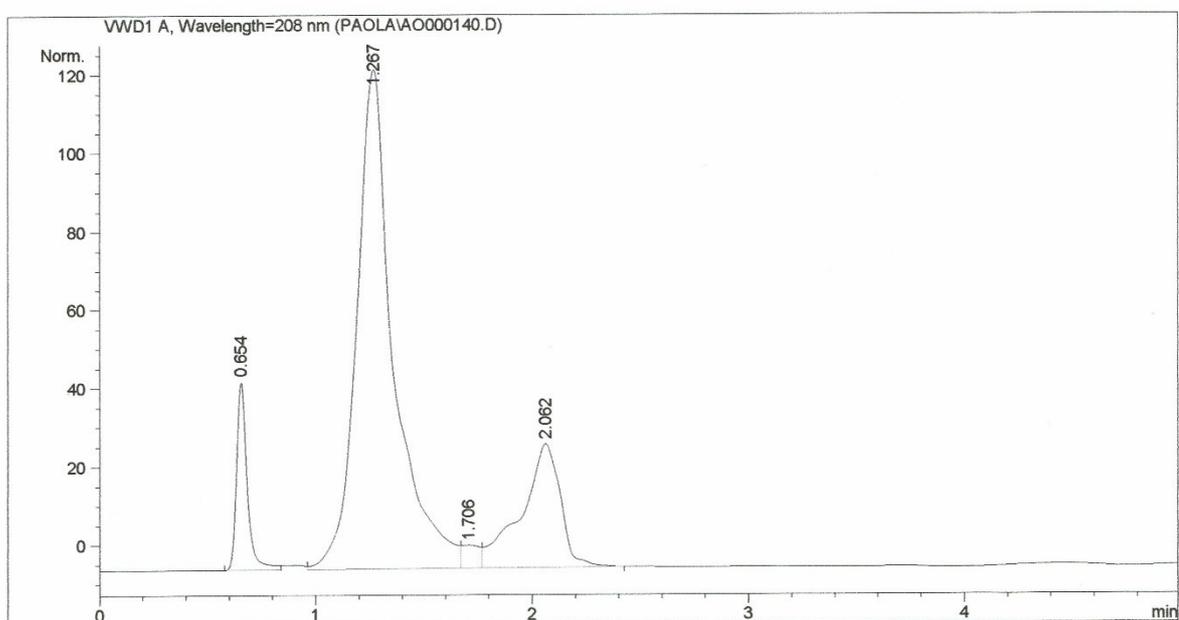


Figura 8.48. Cromatograma de la extracción MAP con 4 ml de 136,0 ppm

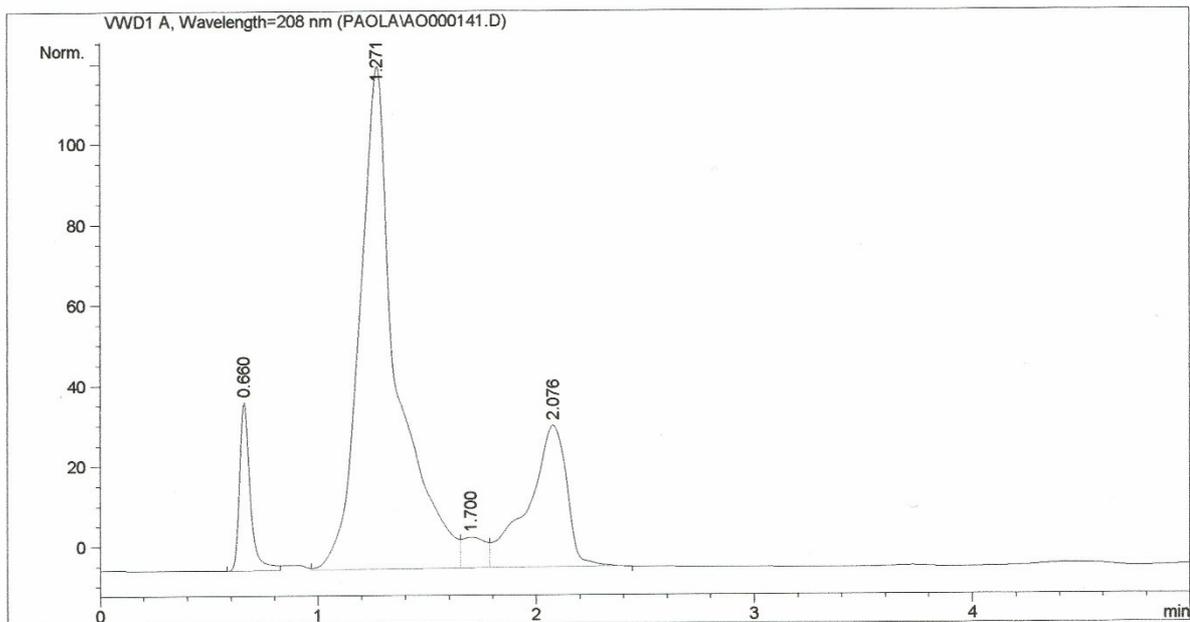


Figura 8.49. Cromatograma de la extracción MAP con 5 ml de 136,0 ppm

8.2.5. Determinación de amígdalina en extracciones de almendras amargas

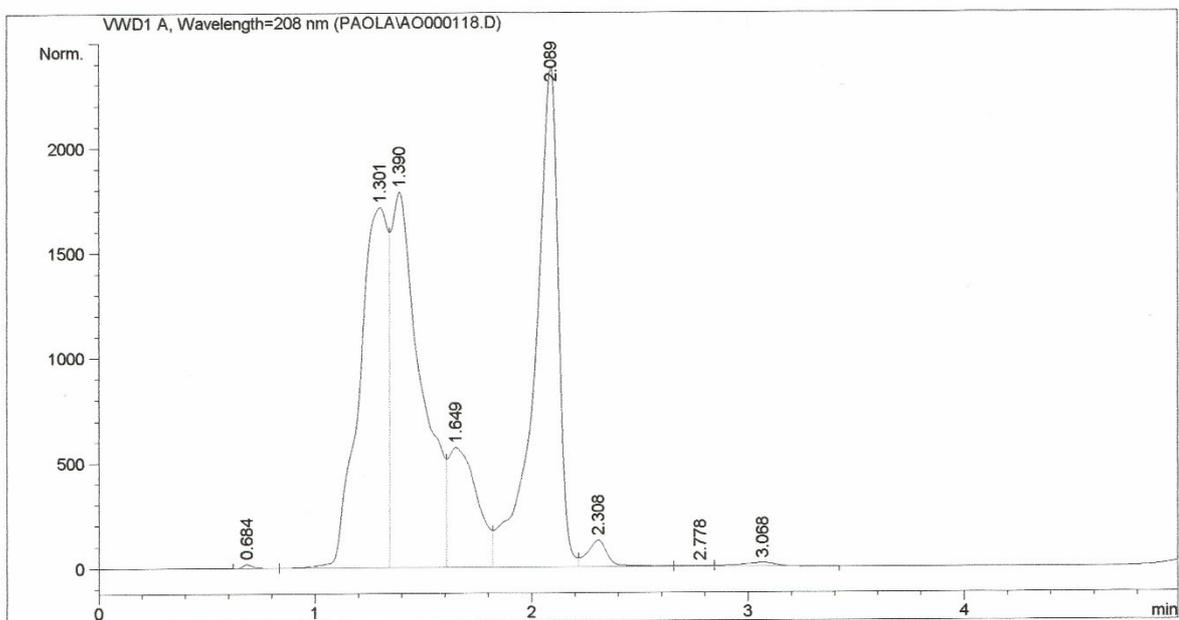


Figura 8.50. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 40 mg de amígdalina

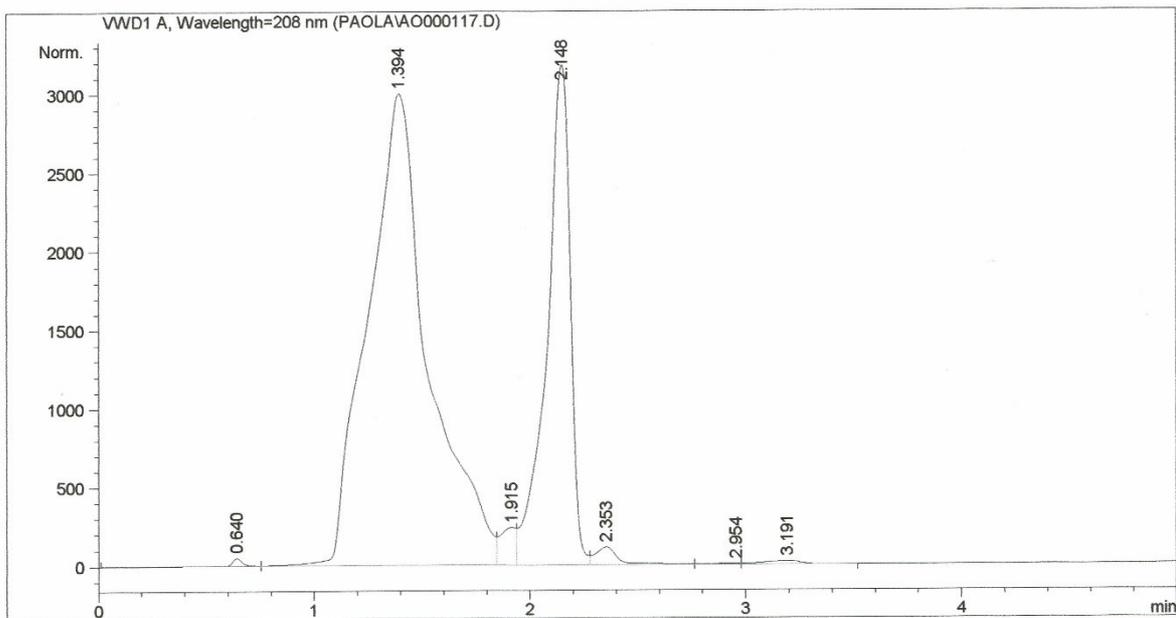


Figura 8.51. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 80 mg de amigdalina

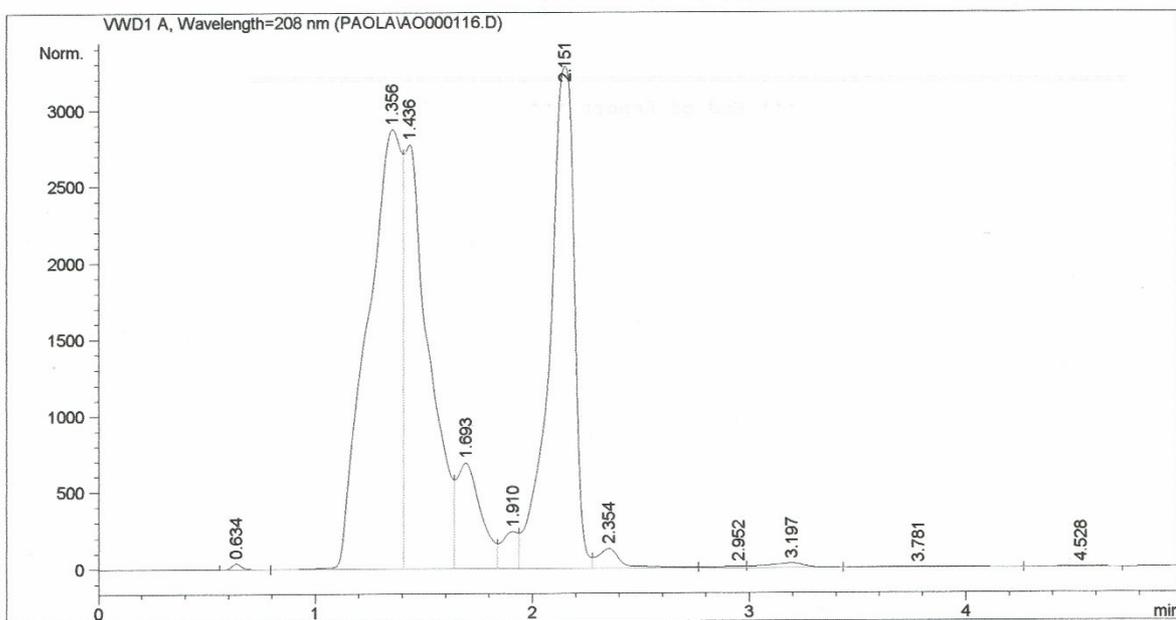


Figura 8.52. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 100 mg de amigdalina

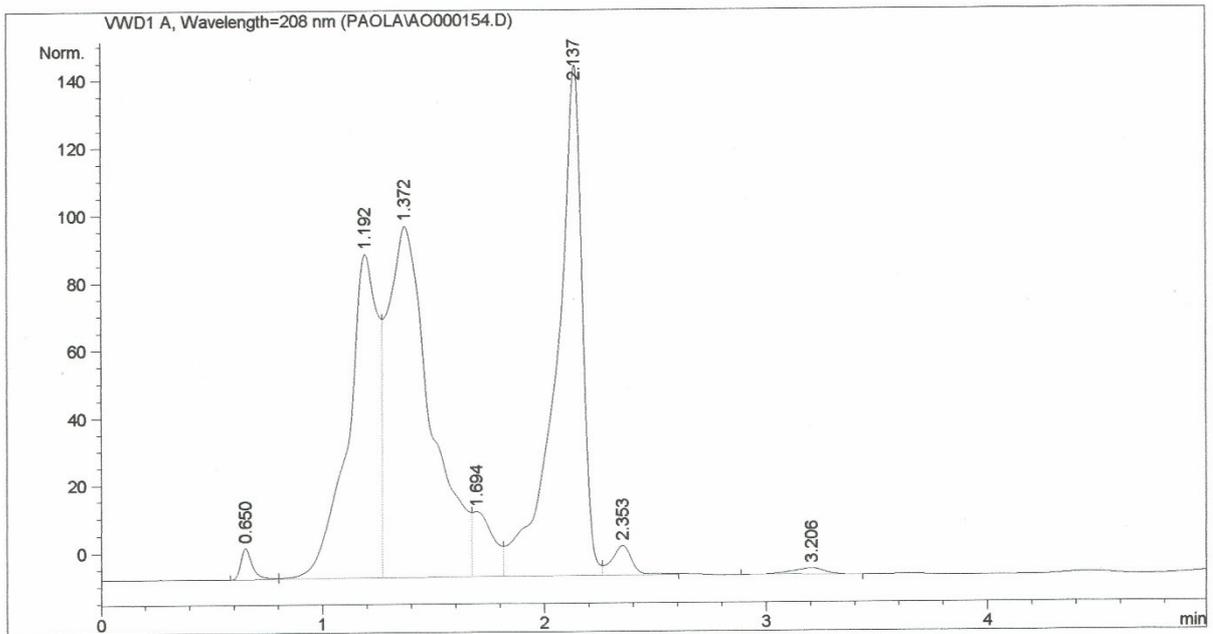


Figura 8.53. Cromatograma de la extracción de almendras amargas (dilución 1:10)

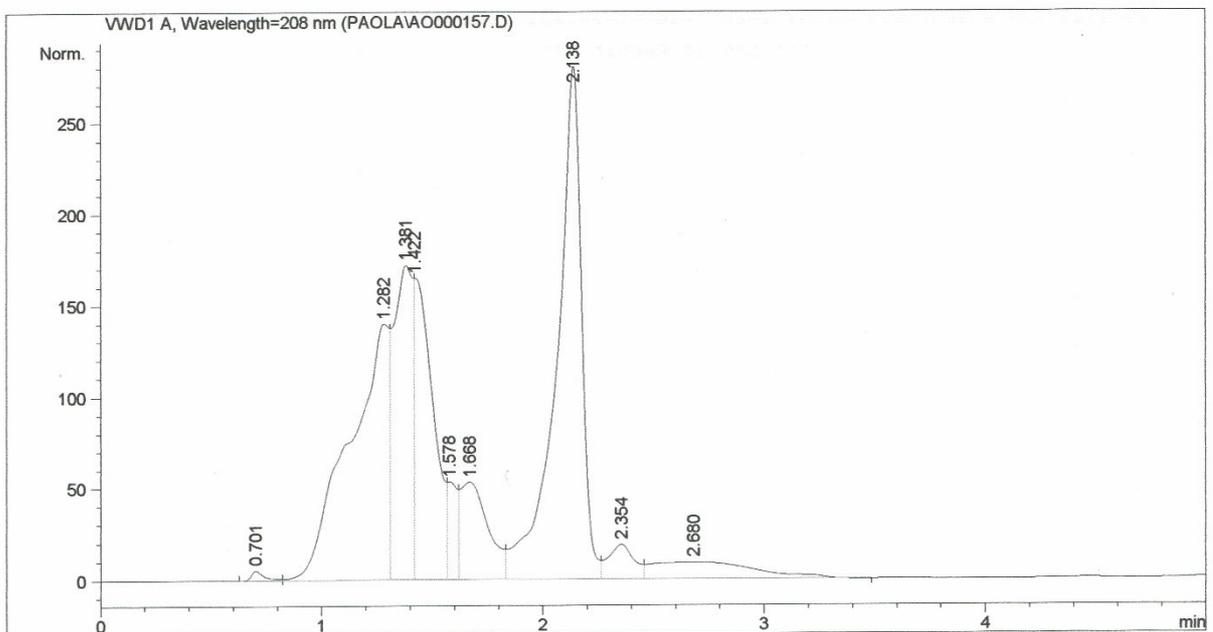


Figura 8.54. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 40 mg (dilución 1:10)

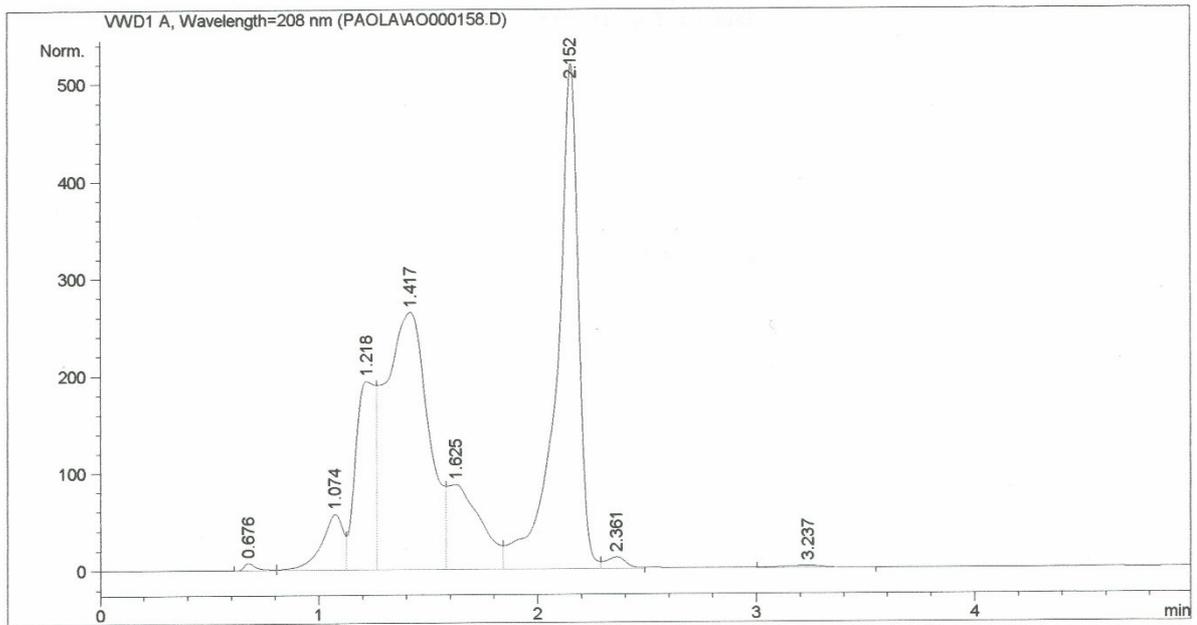


Figura 8.55. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 80 mg (dilución 1:10)

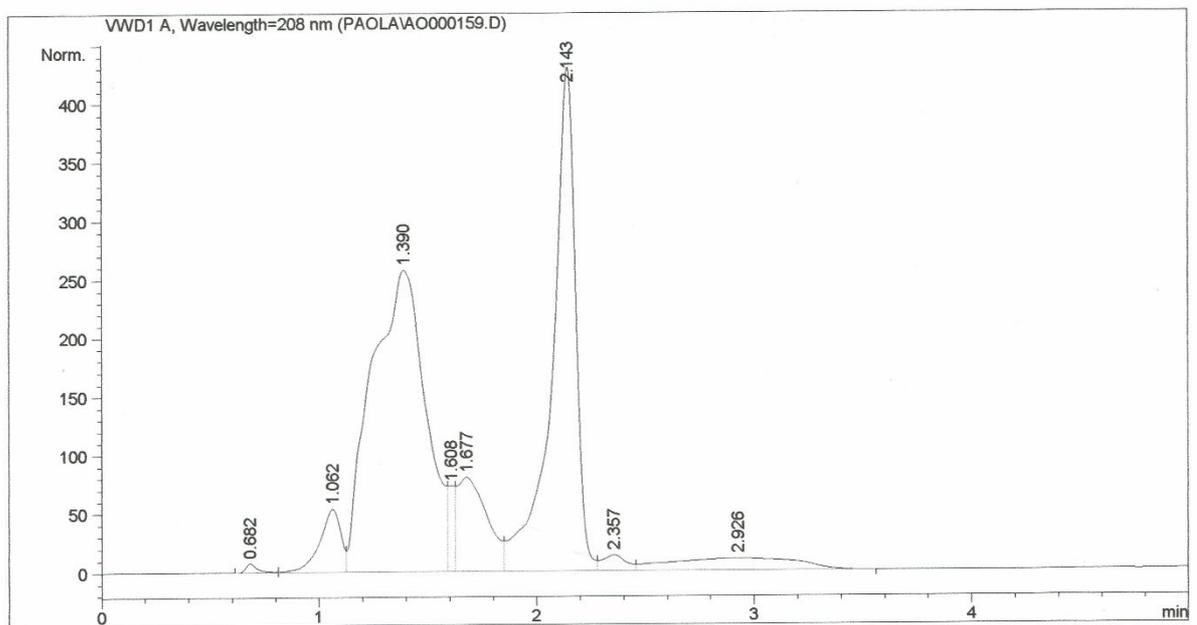


Figura 8.56. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con 100 mg (dilución 1:10)

8.2.6. Determinación de amígdalina en almendras amargas con Soxhlet

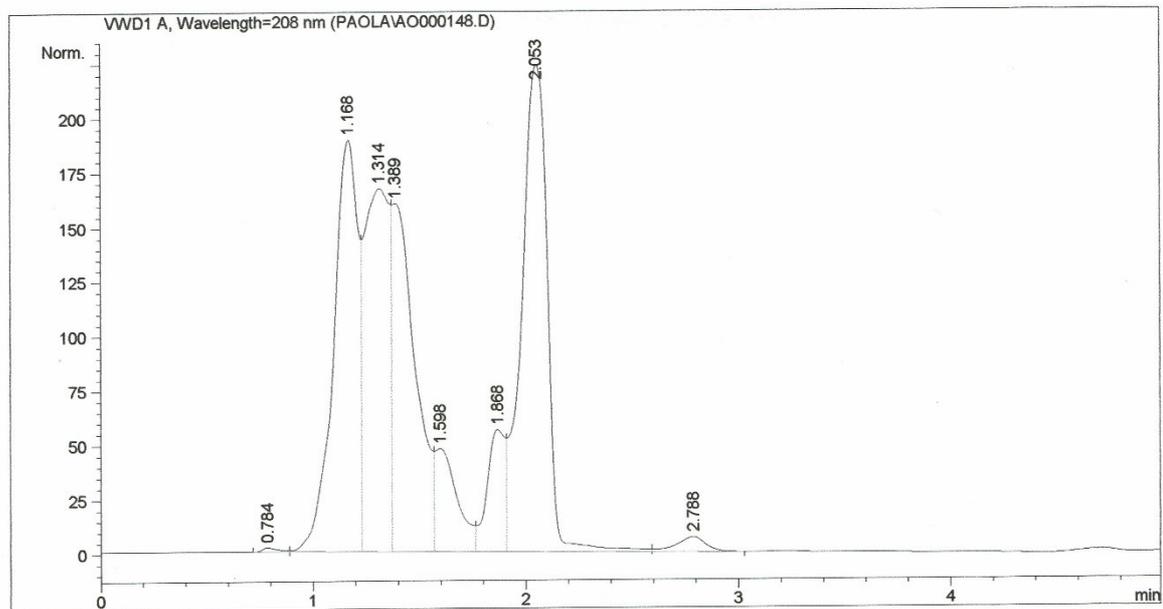


Figura 8.57. Cromatograma de la extracción de almendras amargas con Soxhlet (dilución 1:10)

9. Bibliografía

1. [BUSTINZA], Florencio

Glucósidos cianogénicos y fermentos que catalizan su hidrólisis.

Revista La Farmacia Moderna

[1936]

2. [PAULING], Linus

Orthomolecular Psychiatry.

Science, vol 160, 4

[1968]

3. [TOLONEN], Matti

Vitamins and Minerals in Health and Nutrition.

Woodhead Publishing.

[1990]

4. [ADAM], Abdel Majid

An in vitro study of amygdalin alone and complexed with Se (IV), Au (III), Ru (III) and V (III) ions: Structure, morphology and pharmacology

Journal of Molecular Structure 1195, 43-57

[2019]

5. [PARK], H.-J; [YOON], S.-H; [HAN], L.-S; [ZHENG], L.-T; [JUNG], K.-H; [UHM], Y.-K; [LEE], J.-H; [JEONG], J.-S; [JOO], W.-S; [YIM], S.-V; [CHUNG], J.-H; [HONG], S.-P

Amygdalin inhibits genes related to cell cycle in SNU-C4 human colon cancer cells.

World J. Gastroenterol. 11 (33) 5156-5161.

[2005]

6. [CHANG], H.-K; [SHIN], M.-S; [YANG], H.-Y; [LEE], J.-W; [KIM], Y.-S; [LEE], M.-H; [KIM], J.; [KIM], K.-H; [KIM], C.-J

Amygdalin induces apoptosis through regulation of Bax and Bcl-2 expressions in human DU145 and LNCaP prostate cancer cells.

Biol. Pharm. Bull. 29 (8) 1597-1602.

[2006]

7. [BOLARINWA], Islamiyat F.; [ORFILA], Caroline; [MORGAN], Michael R.A

Determination of amygdalin in apple seeds, fresh apples and processed apple juices.

Food Chemistry 170, 437-442

[2015]

- 8.** [BRADBURY], J.H; [EGAN], S.V; [LYNCH], M.J
Analysis of cyanide in cassava using acid hydrolysis of cyanogenic glucosides.
Journal of Science of Food and Agriculture, 55, 277-290
[1991]
- 9.** [SANTAMOUR], F.S
Amygdalin in Prunus leaves.
Phytochemistry, 47, 1537-1538
[1998]
- 10.** [CHASSAGNE], D.; [CROUZET], J.C; [BAYONOVE], C.L; [BAUMES], R.L
Identification and quantification of passion fruit cyanogenic glycosides.
Journal of Agriculture and Food Chemistry, 44, 3817-3820
[1996]
- 11.** [BOLARINWA], Islamiyat F.; [ORFILA], Caroline; [MORGAN], Michael R.A
Amygdalin content of seeds, kernels and food products commercially-available in the UK.
Food Chemistry 152, 133-139
[2013]
- 12.** [KAWAI], Satoshi; [KOBAYASHI], Keiko; [TAKAYAMA], Yuzi
Gas chromatographic enzymic determination of amygdalin.
Journal of Chromatography, 210 342-345
[1981]
- 13.** [STOBAUGH], J.F; [STERNSON], L.A; [REPTA], A.J
Anal. Lett., 9, 753
[1978]
- 14.** [CORTÉS], Victoria; [TALENS], Pau; [BARAT], José Manuel; [LERMA-GARCÍA], María Jesús
Potential of NIR spectroscopy to predict amygdalin content established by HPLC in intact almonds and classification based on almond.
Food Control 91, 68-75
[2018]
- 15.** [CORTÉS], Victoria; [TALENS], Pau; [BARAT], José Manuel; [LERMA-GARCÍA], María Jesús
Discrimination of intact almonds according to their bitterness and prediction of amygdalin concentration by Fourier transform infrared spectroscopy.

Postharvest Biology and Technology

(<https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.05.006>)

[2018]

16. [ARRÁZOLA], Guillermo; [GRANÉ], Nuria; [MARTÍN], María L.; [DICENTA], Federico
Determination of cyanogenic compound amygdalin and prunasin in almond kernels (Prunus dulcis L.) by using liquid chromatography.

Rev. Colomb. Quim. 42(3), 23-30

[2013]