UNIVERSIDAD TECNICA
FEDERICO SANTA MARIA

UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA

SEDE VIÑA DEL MAR - JOSÉ MIGUEL CARRERA

2-4

DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS POLIAROMÁTICOS EN MERKEN, PRODUCTO ELABORADO CON AJÍ CACHO DE CABRA

Trabajo de Titulación para optar al Título de Técnico Universitario en QUIMICA MENCION QUIMICA ANALITICA.

Alumnos:
Natividad Violeta Lozano Ibañez

Profesor Guía:
Sr. Jaime Carmi Karmy

2021

RESUMEN

Keywords: Hidrocarburos poliaromáticos, aji cacho de cabra, extracción por solvente, Soxhlet, Microondas, Cromatografía de gases.

En el presente trabajo se realizara un estudio de un método para determinar el contenido de hidrocarburos poliaromáticos en ají cacho de cabra ahumado (*Capicúa annuum*) de la manera más eficiente posible.

El desarrollo de la metodología se verá incompleto, puesto que por las condiciones actuales del país, no es posible realizar análisis experimentales, por lo tanto se ha propuesto un análisis teórico de datos para una comparativa. Esto, por la posible contaminación en el proceso de preparación del producto ahumado, poder deducir el proceso con mayor eficiencia, y, la cantidad presente de estos compuestos.

Para la determinación se propuso la extracción mediante dos métodos: método de Soxhlet y método de horno de microondas, considerando datos existentes de otros trabajos.

La cuantificación se efectúa por cromatografía de gas capilar acoplado con detector FID, por método de adiciones estándar con la identificación de hidrocarburos poliaromáticos por cromatografía de gas capilar acoplado con detector de masas.

De forma teórica, se desarrollara un análisis estadístico con los test: linealidad, límites de detección y cuantificación. No se desarrolla repetitividad ni exactitud por no haber duplicados ni una comparación a un valor real.

INDICE

RESUMEN
ÍNDICE DE TABLAS
ÍNDICE DE FIGURAS
SIGLAS Y SIMBOLOGÍA
INTRODUCCIÓN **1**

CAPITULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1.	ANTECEDENTES GENERALES	**3**
1.1.	El ají	**3**
1.2.	El Merkén	**5**
1.2.1.	Proceso de producción	**5**
1.3.	Hidrocarburos poliaromáticos	**7**
1.3.1.	Propiedades físico-químicas	**8**
1.3.2.	Exposición y contaminantes	**8**
1.3.3	Efectos genotípicos	**9**
1.3.4.	Clasificación	**10**
1.4.	Extracción de solventes	**12**
1.4.1.	Horno de microondas	**12**
1.4.2.	Extractor Soxhlet	**13**
1.5.	Cromatografía gaseosa	**14**
1.5.1	Gas portador, control de flujo y regulador de presión	**16**
1.5.2.	Sistema de inyección	**17**
1.5.3.	Inyección en columnas capilares y empaquetadas	**17**
1.5.3.1.	Modo de inyección directa	**17**
1.5.3.2.	Modo de inyección Split	**18**
1.5.3.3.	Modo de inyección Splitless	**18**
1.5.4.	Columnas	**18**
1.5.4.1.	Columna capilar	**19**
1.5.5.	Fase estacionaria	**19**
1.5.6.	Horno	**20**
1.5.7.	Detectores	**20**
1.5.7.1.	Detector de ionización de llama (FID o Flame Ionization Detector)	**21**
1.5.7.2.	Detector de espectrometría de masas	**21**
1.6.	Teorías del proceso cromatográfico	**22**

CAPÍTULO 2: PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS Y MARCO EXPERIMENTAL

2.	Planteamiento de objetivo y marco experimental	**26**
2.1.	Objetivos	**26**
2.1.1.	Objetivo general	**26**
2.1.2.	Objetivo específico	**26**
2.2.	Metodología	**26**
2.3.	Equipos y materiales	**26**
2.3.1.	Equipo	**26**
2.3.2.	Materiales	**27**
2.4.	Reactivos y soluciones	**27**
2.4.1.	Reactivos	**27**
2.4.2.	Muestra problema	**27**
2.4.3.	Soluciones	**27**
2.4.3.1.	Preparación de Estándares	**28**
2.4.3.2.	Preparación de soluciones	**28**
2.4.4.	Preparación curva de calibración	**28**
2.4.5.	Determinación de límites de detección y cuantificación.	**29**
2.5.	Procedimiento	**29**
2.5.1.	Método Horno de microondas	**29**
2.5.2.	Método Soxlhet	**30**
2.5.3.	Purificación	**30**
2.6.	Condiciones cromatográficas	**30**
2.7.	Expresión de cálculo	**31**
2.7.1.	Ecuación de la recta	**31**
2.7.2.	Media aritmética	**31**
2.7.3.	Desviación estándar	**32**
2.7.4.	Coeficiente de variación	**32**
2.7.5.	Límites de detección	**32**
2.7.6.	Límite de cuantificación	**33**

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.	Resultados	35
3.1.	Resultados extracción de resina	**35**
3.2.	Resultados hidrocarburos poliaromáticos en ají	**37**
3.2.1.	Curvas cromatográficas (test linealidad)	**37**

3.2.2. Análisis de hidrocarburos poliaromáticos **39**
3.2.3. Límite de detección y cuantificación **39**

DISCUSIÓN **41**

CONCLUSIONES **45**

BIBLIOGRAFÍA **46**

ANEXOS **49**

ANEXO A: Tablas de comparativa de métodos, extracción de ají cacho de cabra **50**
ANEXO B: Gráficos de linealidad teóricos **53**
ANEXO C: Límites de Detección y Cuantificación **65**
ANEXO D: Tabla resultados **71**

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1-1. Composición general del Ají (no ahumado) por cada 100 gramos.
Tabla 1-2. Composición del merkén.
Tabla 1-3. Clasificación de los HPAs según la IARC.
Tabla 2-1. Esquema de dilución para curva de calibración
Tabla 2-2. Esquema de condiciones cromatograficas.
Tabla 3-1. Volúmenes de inyección y curva de calibración, trabajo de capsaicina
Tabla 3-2. Método Soxhlet (4 Horas); Solvente: Etanol [Número de muestras=6]
Tabla 3-3. Método microondas (20 min; 120W); Solvente: Etanol [Número de muestras=6]
Tabla 3-4. Método Soxhlet (4 Horas); Solvente: Diclorometano [Número de muestras=6]
Tabla 3-5. Resultados en ají cacho de cabra.
Tabla 3-6. Curva de calibración de Fenantreno
Tabla 3-7. Curva de calibración de Fluoranteno
Tabla 3-8. Curva de calibración de Antraceno
Tabla 3-9. Curva de calibración de Pireno
Tabla 3-10. Resultados concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos
Tabla 3-11. Límites de detección y cuantificación

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1-1. Ají cacho de cabra ahumado
Figura 1-2. Ají cacho de cabra molido en polvo junto con hojuelas
Figura 1-3. Estructura de Hidrocarburos poliaromáticos (HPA)
Figura 1-4. Sistema de extracción Soxhlet
Figura 1-5. Diagrama de un cromatógrafo de gases

SIGLAS Y SIMBOLOGIA

Siglas

Vit.	:	Vitamina
PM	:	Peso molecular
N	:	Números de platos teóricos
L	:	Longitud de columna
H	:	Altura de platos teóricos

Simbología

W	:	Watts (medida de potencia eléctrica)
M	:	Metros (unidad de medida de distancia)
Cm	:	Centímetros (unidad de medida de distancia)
%	:	Porcentaje (Unidad de medida porcentual)
°C	:	Celsius (unidad de medida térmica)
g	:	Gramos
mg	:	Miligramos
µl	:	Microgramos
Um	:	Micrómetro
mm	:	Milímetros
ml/min	:	Milímetros por minuto
µl	:	Microlitros
g/mol	:	Gramos mol
ppm	:	Partes por millón

INTRODUCCIÓN

Los ajíes son una variedad de pimiento, calificado como un alimento picante, del género Capsicum, consumo de hábito en el continente americano, a través de su uso y consumo se han podido usar como aliño, condimento o incluso como refrigerio, y del cual se ha utilizado y combinado para la elaboración de otros aliños, como lo es el merkén.

El ají cacho de cabra es una variante del género, del cual se utiliza para la elaboración del merkén, en donde en su proceso de fabricación el fruto es secado y ahumado, proceso que se conoce por generar hidrocarburos poliaromáticos en una combustión incompleta.

Bajo las condiciones presentes, se tiene como objetivo determinar la presencia y cantidad de hidrocarburos poliaromáticos en muestras de ají cacho de cabra, y su derivado, el merkén. Esto mediante un estudio comparativo de métodos de extracción para determinar cuál será el que presente mejor confianza y eficiencia a la hora de trabajar con la muestra discutida.

Las muestras pasarán por procedimiento de extracción y purificación para la obtención de resina, en donde se cuantificará mediante el uso de cromatografía de gas capilar con detector FID, y por cromatografía de gases capilar con detector de masa.

CAPÍTULO 1: ANTECEDENTES GENERALES

1. Antecedentes generales

1.1. El ají

El ají, de la especie *Capsicum annuum* nativa de Norteamérica y Sudamérica, conocido también como pimiento, chile o morrón, es un vegetal de origen americano donde su cultivo se da más en zonas de clima cálido y húmedas, calificado como una hortaliza tipo B. Con más de 150 variedades, este alimento se consume fresco como condimento y en una variedad de salsas.

Esta también es una planta *Herbácea perenne*, quiere decir que puede sobrevivir más de dos años, pero se tiende a cultivar de forma anual, posee una raíz voluminosa y profunda, pivotante y adventicia. Sus tallos son glabrescentes ramificados con hojas aovadas, pecioladas, solitarias o por pares. Pueden llegar a crecer flores blancas nacientes en la axila de las hojas con el tallo, de cáliz acampanado. El fruto es de color verde al estar inmaduro y rojo al madurar, de gran tamaño, es una baya hueca con 2-4 tabiques donde se alojan las semillas comprimidas de color amarillo, de sabor picante de diversa intensidad dependiendo del fruto.[3]

Fuente: https://www.elfrescochile.com/aji-cacho-de-cabra-100grs

Figura 1-1. Ají cacho de cabra ahumado

El ají es un condimento de alta conservación no perecible, posee una composición de sustancias varias como vitamina C y A, con bajo o nulo niveles de grasa, algo típico de vegetales, su componente mas característico es la capsaicina que provoca el sabor picante junto con una irritación, y su consumo excesivo puede provocar dolor al estómago e incluso problemas gastrointestinales.

Tabla 1-1. Composición general del Ají (no ahumado) por cada 100 gramos. (Department of agriculture, USDA, 2020)[18]

Componente	**Proporción**
Calorías	30
Agua	93,89 g
Carbohidratos	4,64 g
Fibra	1,7 g
Azúcares	2,40 g
Proteínas	0,86 g
Calcio	10 mg
Fósforo	20 mg
Fierro	0,34 mg
Potasio	175 mg
Sodio	3 mg
Retinol (vit. A)	27 ug
Acido ascórbico (vit. C)	80,4 mg
Vitamina E	0,37 mg
Tiamina (vit. B_1)	0,057 mg
Rivoflavina (vit. B_2)	0,042 mg
Niacina (vit. B_3)	0,028 mg
Piridoxina (vit. B_6)	0,224 mg
Ácido fólico	0 ug
Zinc	0,13 mg
Cobre	0,066 mg
Magnesio	10 mg
Manganeso	0,122 mg

1.2. Merken

Un condimento en polvo u hojuelas de color rojo, que se obtiene del ají cacho de cabra, *Capsicum annuum var. Longum*, que corresponde a un cultivo natural, variedad del centro-sur de chile, local de la región de la Araucanía, utilizada por el pueblo indígena mapuche para la preparación de este. Se ha ido reemplazando por otros híbridos de ají más productivos para su producción comercial. [14]

Fuente: https://www.doyouknowchile.cl/2019/02/18/merken/

Figura 1-2. Ají cacho de cabra molido en polvo junto con hojuelas

1.2.1. Proceso de producción

La forma artesanal consiste empezando con el secado del vegetal al sol, procurando el mover los vegetales para lograr una equidad en el secado de estos, volviendo regularmente la cosecha a un área seca, evitando así decoloración y crecimiento de hongos, aunque una exposición a la intemperie puede provocar pérdidas y contaminación. Se prosigue con secarlo sobre humo de fuego de leña, provocando que se obtenga del ají un color más oscuro y un cierto sabor ahumado, posterior a este proceso el vegetal es tostado y molido en un mortero o un molino manual, con esto se obtiene hojuelas o un polvo del aji, dependiendo de cómo y cuánto fue molido. [15](p.9)

La alternativa semi-industrial inicia con la cosecha de los ajíes verdes hasta su maduración, tornándose de un color rojizo intenso. Pasan a ser secados con luz natural donde podrían utilizase bastidores que se pueden mover dentro o fuera hasta que se

obtenga una humedad bajo el 10%, conservando su olor y color uniforme, además de reducir el tiempo de secado.

Otras formas de secado son con secadores con bombas de calor, que funcionan a bajas temperaturas, especialmente utilizados cuando el clima es cambiante, pues la calidad del ají decae cuando este se vuelve marrón. Algunos agricultores locales también utilizan bodegas exclusivas para el secado y ahumado del ají, estas no poseen ventanas, están construida de adobe y posee un techo hecho de tejas, al interior se encuentran junto a las paredes unas zarandas, que son superficies como repisas hechas de madera donde se coloca el ají, en el centro de la casa se encuentran los fogones a base de leña o resina, que permiten la deshidratación y el ahumado del ají. En adición también, se llega al procedimiento de tostado, donde el ají se tuesta de manera homogénea, además de que se extrae el pedúnculo, para evitar sabores amargos. Al perder una gran cantidad de humedad estos se muelen, incluidos o no las semillas, en un molino de martillo hasta reducirlos a polvo o escamas, luego de esto, dependiendo el producto que se desee, se mezclan con sal y semillas de cilantro tostadas y trituradas. [5](p.14)

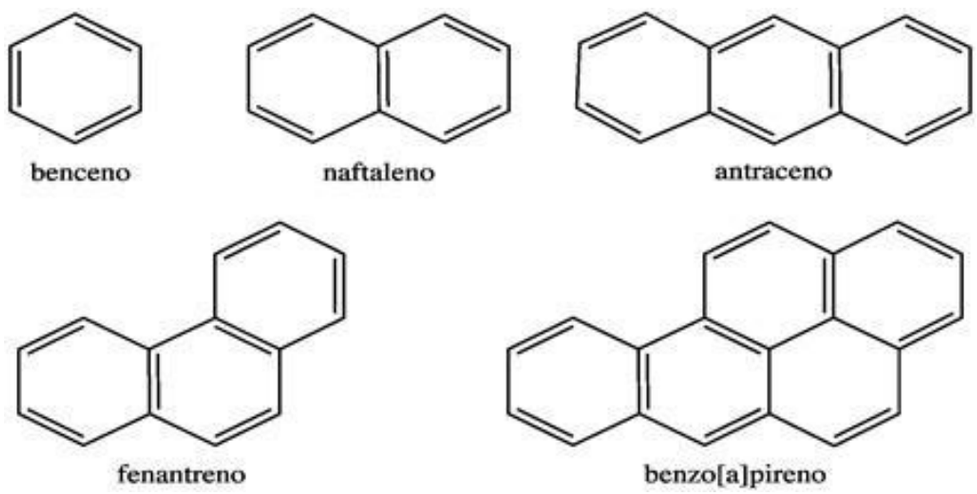
Tabla 1-2. Composición del merkén. (Ministerio de agricultura, Chile, 2010)[15]

Componente	**Ministerio Agricultura CH**
Humedad	6,2%
Proteína	9,6%
Lípidos	8,6%
Fibra cruda	31,7%
Azúcares	29,5%
Cenizas	14,5%

El proceso de ahumado del ají, que produce su particular aroma y sabor, es donde son adquiridos los hidrocarburos poliaromáticos. Todo esto en un ambiente rico en humo, en un espacio cerrado. La quema incompleta de materia orgánica como fuente de calor produce, en consecuencia, la formación de partículas de hidrocarburos poliaromáticos que puede derivar en una próxima absorción por los ajíes. [26]

1.3. Hidrocarburos poliaromáticos

Los hidrocarburos poliaromáticos (HPA), también comprendidos como hidrocarburos aromáticos cíclicos o polinucleares (PAHs por sus siglas en inglés), son una familia de compuestos orgánicos formados por dos o más anillos aromáticos, los cuales contienen átomos de carbono e hidrógeno principalmente. En general sin sustituyentes, aunque existen compuestos que poseen átomos de nitrógeno, flúor, cloro u otros grupos más complejos.



Fuente: https://www.fedebiocombustibles.com/nota-web-id-1540.htm

Figura 1-3. Estructura de Hidrocarburos poliaromáticos (HPA)

Estos compuestos son generados por la combustión incompleta, insuficiencia de oxígeno, de la materia orgánica, gases, aceites y carbón, además se encuentran de forma natural en el petróleo, alquitrán y productos utilizados para combustibles, como fósiles y biomasa. La contaminación ambiental causada por derrames de petróleo puede provocar la contaminación en alimentos, especialmente en pescado o productos pesqueros. Generalmente, las mayores concentraciones de HPAs se encuentran en productos ahumados, productos marinos como moluscos frescos, especies, salsas.

Entre los más conocidos están el naftaleno, antraceno, benzo(a)pireno (BaP), siendo este último ser conocido por tener el mayor potencial de capacidades cancerígenas, teratogénicos y mutagénico. Este se utiliza como un indicador de la

exposición y permite la evaluación de riesgo asociada con la absorción de HPAs, características que otros hidrocarburos poliaromáticos comparten y han llevado a considerarlo como contaminantes prioritarios por la Agencia Norteamericana de Protección del Medioambiente (US-EPA).[10]

1.3.1. Propiedades físico-químicas

A pesar de estar formados en su mayoría por anillos bencénicos saturados, algunos están constituidos por anillos de cuatro, cinco o seis átomos de carbono, otros de ellos no saturados, el tamaño, la forma de las moléculas, y presencia de sustituyentes determinan las características químicas y biológicas, y el tema más discutido sobre estos compuestos, sus efectos sobre la salud.

Entre los compuestos del tipo HPAs las características varían entre ellos, algunos son volátiles, a temperatura ambiente están en estado gaseoso, en cambio otros tienen un punto de ebullición alto, esto dependiendo de su peso molecular y su presión de vapor, y se encuentran en un estado sólido.

Estos cuando se presentan de forma pura son sólidos incoloros, blancos, amarillos, además de presentar una diversa intensidad en su olor.

En aspectos generales se puede decir que los hidrocarburos poliaromáticos presentan una insolubilidad en agua, son de carácter apolar y son pobremente solubles en algunos disolventes orgánicos como tolueno, acetona, ciclohexano, o metanol. Estos tienen un comportamiento liposoluble, quiere decir, que presentan una afinidad a las grasas, y, a disolverse en ellas, lo cual permite que atraviesen con facilidad la piel y entren al organismo. Otra característica destacable es que algunos presentan inestabilidad fotoquímica, es decir, que se degradan a la exposición de la luz, esta propiedad indica que si no son absorbidos por un organismo, no tendrán una gran permanencia en el ambiente, en aspectos generales su remanencia en el ambiente es entre semanas hasta un par de meses.

"*También se afirma que la presencia de regiones "bahía" o "fiordo" en la estructura de los HPA es una característica común si presentan propiedades tóxicas, pues aumentan la reactividad de las moléculas*" (Comisión del Codex Alimentarius, 2004). [21]

1.3.2. Exposición y contaminantes

La exposición de los HPAs se da generalmente en mezclas complejas, no como compuestos simples, la composición de cada emisión depende de diversos factores, como lo son el tipo de combustible y sus propiedades, además de cómo se llevó a cabo

esa combustión, lo que se quiere decir es que estos compuestos rara vez se encuentran solos. Estos compuestos tienden a ser emitidos a la atmósfera, transportados en fase de vapor o al estar unidos a material particulado, favoreciendo procesos de oxidación y reducción. Generalmente emitidos en incendios forestales, de desechos industriales, agrícolas, domésticos y combustibles fósiles.

Los compuestos más volátiles, estos con dos o tres anillos aromáticos, son emitidos en fase gaseosa, mientras que alrededor del 80% de los HPAs con más de 5 anillos se encuentran más asociados a partículas atmosféricas.

En los suelos estos permanecen como depósitos, independientes de la humedad; tiende a haber una mayor contaminación en zonas urbanas, las aguas superficiales pueden ser contaminadas por descargas industriales y tratamientos de aguas residuales y liberados a los suelos, lo cual, al estar combinado con otras partículas pueden llegar a contaminar acuíferos subterráneos. La degradación en cualquier caso puede tardar semanas y hasta meses, causada por microorganismos principalmente. Otros tipos de degradaciones se dan por la luz.

Por último, el contenido de hidrocarburos poliaromáticos es mayor en las plantas y animales que en las aglomeraciones de tierra o agua, aunque aparenta no ser por cadena trófica. En un aspecto positivo, los HPAs no contribuyen a la reducción en la capa de ozono o calentamiento global.

1.3.3. Efectos genotípicos

La absorción de los compuestos se da mediante la ingestión, inhalación y contacto dérmico, siendo el medio de transporte uno de los factores que hace variar la cantidad del compuesto, además del tiempo y lugar de exposición.

Estos no solo se limitan a material particulado, pueden ser absorbidos por los pulmones mejor que por la superficie de la piel, ingresar al sistema linfático, al sistema circulatorio, pero los hidrocarburos poliaromáticos prefieren distribuirse y metabolizarse en los órganos y tejidos con alto contenido en lípidos, como el hígado o tejido adiposo.

Estos compuestos no son acumulativos en el organismo y la mayoría son eliminados a los días de su absorción, principalmente de la orina y las heces. Sin embargo, durante el proceso metabólico para su expulsión fuera del organismo, estos pueden sufrir una serie de reacciones y así convertirse en compuestos muy reactivos que se unen al ADN produciendo problemas en la replicación de este, lo cual se traduce a un incremento en la probabilidad de contraer cáncer.

El metabolismo de los HPAs provoca un aumento en su polaridad transformándolas en sustancias hidrofílicas para así acelerar su excreción, este mismo

proceso es el que provoca que algunos metabolicen a sustancias de carácter mutágeno o carcinógeno activas.

Al establecerse en el organismo estos sufre una oxidación enzimática realizada por sistemas de oxidasas de función mixtas, ubicadas en el hígado, pero este proceso metabólico puede producirse en glándulas suprarrenales, testículos, tiroides, pulmones, piel, glándulas sebáceas e intestinos, capaces incluso de atravesar la barrera placentaria y llegar al feto, causando problemas en su salud, alteraciones o incluso el aborto involuntario de la criatura.

Los productos resultantes de estas reacciones, epóxidos y dihidrodioles, son los causantes de la aparición de cáncer, provocando un ataque en forma de aductos covalentes en el ADN, generando errores en la replicación o codificación entre las bases pirimidinas y purinas, lo cual inicia el proceso de mutación, que se entiende como una mayor probabilidad de cáncer.

A pesar de que algunos de los hidrocarburos poliaromáticos no presentan características mutagénicas o cancerígenas tienen la características de actuar como co-cancerígenos si estos interactúan con sus homólogos cancerígenos.

Tipos de cáncer relacionados al HPA

- Cáncer de pulmón
- Cáncer de vejiga urinaria
- Cáncer de piel
- Cáncer de mama
- Cáncer de huesos
- Cáncer de estómago

1.3.4. Clasificación

La clasificación de la Agencia Internacional para la investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés), ha establecido la siguiente clasificación:

Grupo 1: Sustancias o exposición que se sabe que son cancerígenos para el ser humano.

Grupo 2A: Sustancias o exposición que son probables cancerígenos para el ser humano. Entra en la clasificación las sustancias cancerígenas para los animales pero no hay suficiente información en los seres humanos.

Grupo 2B: Sustancias o exposición que son posibles cancerígenos para el ser humano. Sustancias de las cuales no hay suficiente información sobre los seres humanos y para las que hay pruebas que indican que pueden producir cáncer en animales de experimentación, pero no son concluyentes sobre si son cancerígenos animales.

Grupo 3: Sustancias de las cuales no se dispone suficiente información sobre su capacidad cancerígena.

Grupo 4: Sustancias que probablemente o no se consideran cancerígenas para el ser humano.

Los compuestos clasificados en el grupo 1 no se discute su potencial cancerígeno y se tomar acciones de salud y un control sobre la exposición de este, en cambio los clasificados en el grupo 2A se les mantiene una constante investigación, clasificándolos al grupo 1 o degradándolos al grupo 2B, donde de igual manera se le seguirá una investigación pero con una menor prioridad a otros. [10] (p. 77-79)

Tabla 1-3. Clasificación de los HPAs según la IARC. (Vives *et al*, 2001)[28]

HPAs	Abreviatura	IARC
Benzo[a]pireno	B[a]P	1
Criseno	CHR	2B
Benzo[a]antraceno	B[a]A	2B
Benzo[b]fluoranteno	B[b]F	2B
Benzo[k]fluoranteno	B[k]F	2B
Indeno[123-cd]pireno	I[1,2,3-cd]P	2B
Dibenzo[a,h]antraceno	DB[a,h]A	2A
Benzo[ghi]perileno	B[ghi]P	3
Benzo[j]fluoranteno	B[j]F	2B
Ciclopenta[cd]pireno	CPP	2A
Dibenzo[a,l]pireno	DB[a,l]P	2A
Dibenzo[a,e]pireno	DB[a,e]P	3
Dibenzo[a,i]pireno	DB[a,i]P	2B
Dibenzo[a,h]pireno	DB[a,h]P	2B
5-Metilcriseno	5-MC	2B
Benzo[c]fluoreno	BF	3
Naftaleno	NA	2B

Fenantreno	PHE	3
Antraceno	ANTH	3
Fluoranteno	FLA	3
Pireno	PY	3

1.4. Extracción de solventes

1.4.1. Horno de microondas

La extracción asistida por microondas se basa en la utilización de ondas electromagnéticas de alta energía que afectan en la rotación molecular y la movilidad iónica, permitiendo que los compuestos de interés pasen de la muestra a un disolvente. El equipo consiste en unos diversos recipientes transparentes a esta radiación que pueden ser sistemas abiertos o cerrados a una temperatura superior al punto de ebullición del solvente, girando para lograr uniformidad, pues dentro del horno de microondas la radiación no es homogénea.

El calentamiento provocado por la radiación dependerá de qué mecanismo se utilice, siendo lo crítico el coeficiente de pérdida dieléctrica, ósea, que dicho material posea propiedades dieléctricas. Este coeficiente se basa en la capacidad de un material de acumular energía electromagnética para luego convertirla en calor.

La base del mecanismo de interacción, en donde el intervalo de frecuencia se encuentra entre 300 y 3000000 MHz, entre radiación y materia, consiste en:

1) Una onda electromagnética atraviesa un fluido, esto provoca la migración de iones en función del campo eléctrico, pero lleva asociada la resistencia del fluido al movimiento de iones, esta resistencia produce un calentamiento y vibración.
2) Moléculas con dipolos eléctricos, el campo eléctrico produce una rotación de los mismos, con esto, la onda al pasar los dipolos se encuentran ordenados en dirección del campo pero al cesar, las moléculas se dispersan produciendo fricción contra el disolvente, lo que trae aparejado calor y vibración.

Cuando el campo eléctrico es eliminado, el desorden molecular se restaura y con ello se libera la energía absorbida en forma de calor. La temperatura y presión

afectan a la eficacia y velocidad de extracción, donde se aumentan la solubilidad del analito y aceleran la cinética de desorción del analito desde la matriz.
Se producen diferentes mecanismos dependiendo del disolvente que se utilice:

1) En disolventes polares o mezclas de estos, el calentamiento ocurre por rotación de dipolos. Se caracterizan por tener altos coeficientes de pérdida dieléctrica, dado origen a altas temperaturas oscilando a los 200 °C.
2) En disolventes transparentes a la energía de microondas, se entiende coeficiente de pérdida dieléctrica bajo, aquí el disolvente actúa como un medio solubilizador de los analitos, donde la muestra contiene agua libre en su estructura. Aquí el agua en exceso tiene como efecto un sobrecalentamiento provocando la ruptura de membranas celulares, el disolvente se difunde en la matriz y extrae los analitos.

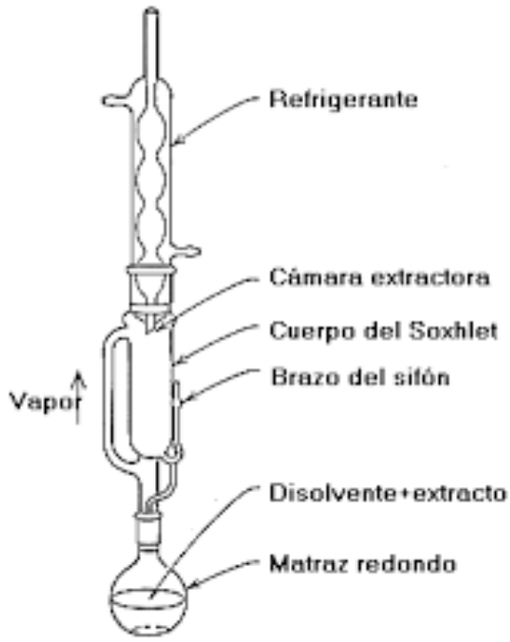
Entre sus ventajas está que no requiere un gran consumo de solventes y se reduce el tiempo de extracción, puede llegar a altas temperaturas y presiones, se tiene un control de todos los parámetros de extracción, junto con una agitación y extracción simultánea, y no necesita un agente deshidratante o un secado de la muestra, a diferencia del método de extracción Soxhlet. El detalle a tomar en sus propiedades microscópicas, es que este proceso no altera la estructura en las moléculas.

En consecuencia se requerirá un filtrado posterior para separar el analito, además de ser un equipo costoso. [4]

1.4.2 Extractor Soxhlet

Esta extracción es el método estándar para la extracción de muestras sólidas y es utilizado como el principal método de referencia.

El procedimiento consiste en que la muestra sólida y pulverizada se coloca en un cartucho que se sitúa en la cámara de extractor del sistema. El solvente es calentado entrando en contacto con el cartucho que contiene el analito, mediante su evaporación y posterior condensación. El analito disuelto en el solvente orgánico pasa a un sifón que llena la cámara y termina desbordándose, para luego caer de forma líquida a un balón, donde se repite el proceso hasta completar la extracción y se concentra en el disolvente. Cuando este proceso termina por completo, se deberá seguir con una evaporación, generalmente por un rotavapor, para eliminar todo el solvente.



Fuente: www.pinterest.es

Figura 1-4. Sistema de extracción Soxhlet

Sus ventajas son: Mejorar la solubilidad del analito, pues la extracción se realiza con un solvente caliente, una gran capacidad de recuperación, a diferencia de la extracción por microondas no se necesita un posterior filtrado, y por último es un método que no depende de la matriz.

En sus inconvenientes se presenta que es un proceso lento, pues dependerá el tiempo de cuan eficiente sea la extracción, normalmente entre 6-24 horas, no es aplicable a muestras que se descompongan con el calor o reaccionen, se requiere de grandes cantidades de solventes, alrededor de 50 a 300 ml, y posterior a la extracción se necesitará de una evaporación. [4]

1.5. Cromatografía gaseosa

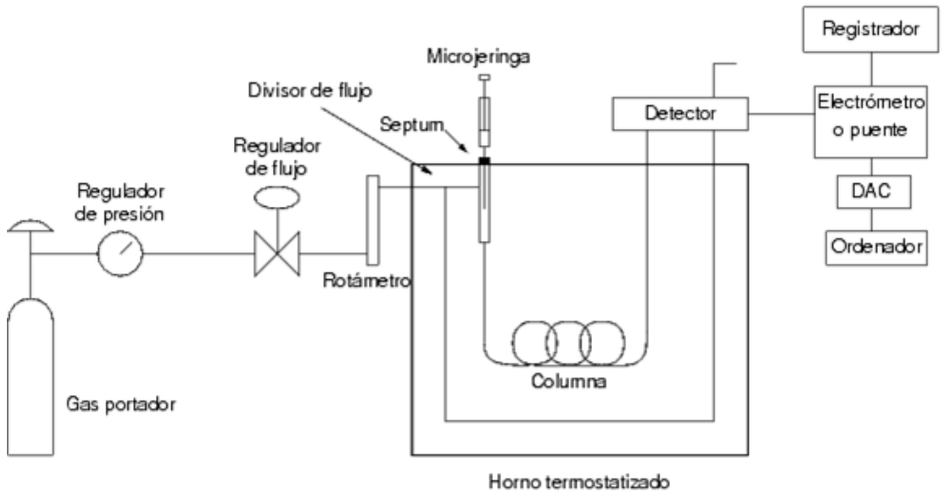
La cromatografía es una técnica instrumental de separación, en donde logra su propósito a través del paso de la muestra, facilitado por una fase móvil y por una fase estacionaria, donde su interacción con ambas fases por sus propiedades, permitirá el retraso y alejamiento de compuestos, ayudado por el caudal en la columna y la longitud de esta, permitirá la separación completa de cada componente de la muestra inyectada.

En el caso de la cromatografía de gas, esta técnica permite analizar muestras gaseosas, liquidas y solidas que logren ser vaporizadas, que sean volátiles, a una

temperatura por debajo de 0°C hasta 300°C, puesto que se debe evitar su descomposición. Debe poder resistir una presión de vapor de 300mm de mercurio sin alteraciones.

Cuando la fase móvil es un gas inerte que lleva la muestra, que no interaccionan entre sí, por una columna, un tubo relleno de un material que corresponde a la fase estacionaria, en caso de ser un líquido sobre un sólido inerte este se denomina cromatografía gas-líquido, en donde sucede un proceso de partición, en cambio, si la fase estacionaria es un sólido activo se clasifica como cromatografía gas-sólido, en donde sucede un proceso de adsorción para la separación de componentes.

Cada analito en cuestión tendrá una interacción diferente con la fase estacionaria, y su velocidad de migración y su tiempo de retención será establecido según la distribución de la muestra por la fase móvil y la fase estacionaria. Aquí cada compuesto que posean una mejor afinidad quedará retenido más tiempo por la fase estacionaria, en caso contrario, los que no estén fuertemente retenidos, podrán moverse con más facilidad para salir primero de la columna.



Fuente: es.wikipedia.org/wiki/Cromatografía_de_gases

Figura 1-5. Diagrama de un cromatógrafo de gases

Entre las ventajas presentes del método van desde la versatilidad para separar la muestra, modificando la fase estacionaria y las condiciones cromatográficas, como por ejemplo la temperatura o presión y así lograr la mejor eficiencia en el análisis, como ser un análisis rápido y sencillo, durando hasta unos 30 minutos máximos y no se requiere un gran conocimiento teórico pero si uno básico para comprender el funcionamiento y posibles errores o problemas que pueden presentarse, y por último la sensibilidad del

equipo, donde con la ayuda de los detectores pueden identificar hasta partes por billón de las muestras e incluso inyectar muestras menores a 1 microlitro.

Pero en consecuencia, el equipo solo funcionara siendo la muestra de característica volátil, eso significa que no podrá identificar azúcares, aminoácidos o nucleótidos, y no se podrá analizar tampoco compuestos que pueden contener un peso molecular superior a 600, y el uso de un instrumento que logre identificar a los componentes transportados. En el caso de no ser compuesto volátiles en su estado original, se podrá hacer una derivatización del compuesto para obtener otro que sí pueda ser volatilizado y analizado.

1.5.1. Gas portador, control de flujo y regulador de presión

El gas portador, considerado como la fase móvil, debe ser un gas inerte para evitar que interactúe con la muestra o con la columna, además de poseer una alta pureza y poseer una baja difusión, con esto, debe transportar el analito en cuestión y crear una matriz adecuada para el detector.

Gases como el helio, argón, nitrógeno, hidrógeno o dióxido de carbono, son los más comunes para usar, pero dependerá también del tipo de detector que se utilice. Según las curvas de Van Deemter (HEPT vs. velocidad lineal), el hidrógeno es el mejor gas para utilizar en la cromatografía pero sitúa una alta peligrosidad por ser un gas inflamable.

Para el caudal, estos son controlados mediante reguladores de presión de dos niveles: un manómetro se ubica en la salida del cilindro de gas, además de un regulador de presión o flujo instalado en el cromatógrafo. Las presiones de entrada varían entre 10-25 psi, dando caudales de 1-25 ml/min en las capilares y entre 25 a 150 ml/min en columnas de relleno.

Se entiende que si la operación es isométrica, cuando la permeabilidad de la columna no varía, el flujo del gas se regula a la entrada de la columna, mediante un regulador de presión, en cambio, si la operación no es isométrica, se necesita un regulador diferencial para compensar la variación de la presión en caída de la columna a consecuencia de la temperatura.

Para medir el caudal con a mayor exactitud se utiliza un rotámetro o un simple medidor de pompas de jabón. Los rotámetros tienen como principal inconveniente lo imprecisos que son, aun si están calibrados, pues se contaminan con productos de la columna o un constante uso los desgasta, produciendo errores, por ello, el medidor de burbujas de jabón es más utilizado.

Se debe tener en control la presión, pues una mayor presión en el sistema significa un menor tiempo de retención de los compuestos en la columna.

1.5.2. Sistema de inyección

Estos dispositivos tienen la principal función de vaporizar la muestra a analizar, para luego agregarse a la corriente de gas portador hacia la columna, esta función es instantánea cuando la muestra es inyectada. Llevado a cabo por una micro jeringa que introduce una muestra líquida o gaseosa, las muestras sólidas se inyectan en forma de disolución en donde el disolvente se pierde en la corriente de la purga, atraviesa un diagrama de caucho instalado a la entrada de la columna, donde la temperatura es mayor a la del horno, fluctuando entre 25 a 50°C sobre esta.

Se debe inyectar la cantidad adecuada y de manera rápida, para evitar el ensanchamiento de las bandas de salida o una baja de eficiencia, efecto que se da en cantidad altas de muestra e inyecciones lentas.

El uso de una válvula de seis vías o válvula de inyección, donde se inyecta una cantidad constante en forma de bucle de la válvula se utiliza para poder usar la reproducibilidad.

1.5.3. Inyección en columnas capilares y empaquetadas

Este es un bloque metálico termoestable, con aislamiento y buen conductor del calor además de presentar un termostato para controlar y mantener la temperatura, ubicado en el interior del horno La muestra es inyectada en el interior de la cámara por una micro jeringa a través de un septum donde se vaporiza de forma inmediata y se mezcla con el gas portador, previamente calentada, en una cámara de mezcla conocida como “liner” de material inerte, donde después es arrastrada por la corriente de gas a la columna.

Las inyecciones en columnas empaquetadas permiten una mayor capacidad de muestra, además de una inyección directa, que no presenta una disminución de la eficiencia.

Las inyecciones en columnas capilares, su capacidad de carga en las inyecciones y en su separación es menor, pues las columnas son muy afectadas por los disolventes y presentan menor sensibilidad. Como no existen jeringas que puedan llegar a cantidades inferiores a 0,1 ul, se utilizan técnicas para dividir la muestra, y entregar una alícuota a la columna, explicadas a continuación:

1.5.3.1. Modo de inyección directa

La técnica se basa en la inyección lenta y completa, evitando el regreso de esta, se evapora y transporta completamente y de manera directa a la columna por la fase

móvil, a consecuencia, muestras termolábiles pueden ser descompuestas en este proceso por tratarse de un proceso, cuando se produce un regreso de muestra, se producirá picos con colas anchas.

1.5.3.2. Modo de inyección Split

En esta técnica la muestra es vaporizada en la cámara del inyector a una alta temperatura para luego ser dividida de manera que solo una parte entra a la columna, una división de muestra raramente uniforme (orden de 10:1 a 200:1).

Reduciendo la cantidad de muestra se obtienen bandas cromatográficas con gran eficiencia, pero en sus desventajas se ve la pérdida de linealidad en compuesto de alto peso molecular, degradaciones térmicas en superficies de metal o de vidrio mal desactivadas.

1.5.3.3. Modo de inyección Splitless

Este método inyecta el 95% de la muestra en la columna usando la misma instrumentación utilizada en el modo Split, en consecuencia se obtiene una mayor sensibilidad, indicando la capacidad de detectar pequeñas concentraciones junto con una buena reproducibilidad pero con mayor complejidad de uso. Otras desventajas presentes es que la transferencia de la muestra es más lenta, un proceso más largo y la descomposición es probable.

1.5.4. Columnas

Las columnas de forma de tubo están formadas de materiales, preferiblemente inertes, donde en su interior se encuentra la fase estacionaria, en el exterior de la columna están recubiertas con película de polímero (poliamida) para aumentar la resistencia, pues sin estas, es atacada por el oxígeno provocando que la columna se oxide y en consecuencia, se rompa.

La interacción de la fase estacionaria y el analito además del tiempo que este se demora en recorrer la columna depende estrictamente en la presión que la fase móvil o gas portador posee, donde según la ecuación de los gases ideales, a la temperatura mayor presión de vapor se traduce a una mayor velocidad de migración pero una menor retención en consecuencia, pues eluyen de manera más rápida.

Además se obtendrá una mayor eficiencia de la columna en cuanto menor sea el equivalente a la altura de un plato teórico, según la ecuación de Van Deemter (Ecuación

1-1), o en la ecuación de Golay (Ecuación 1-2), en donde se agrega el término $\bar{u}$ equivalente a la presión.

1.5.4.1. Columna capilar

Estas columnas son de un largo que va desde los 5 a 60 metros y de un diámetro comprendido entre 0,2 y 0,8 mm y en general tienen una capa fina de fase estacionaria de 0,1-1,0 um, son tubos abiertos que para que se obtenga una buena separación de analitos, se entiende, una buena cromatografía, deberán ser más largas los tubos, debido a que la permeabilidad hacia los gases es mayor.

Estos tubos son hechos de material inerte que puede ser sílica fundida, vidrio pirex, acero inoxidable, nylon o silcosteel, donde la fase estacionaria está depositada o particionaria en las paredes, a diferencia de las columnas rellenas que poseen la fase estacionaria en granitos, al no haber granitos de soporte sólido se utiliza la ecuación de Golay para la eficiencia.

$$H = \frac{B}{\bar{u}} + (C_M + C_S) * \bar{u}$$

Ecuación 1-2. Ecuación de Golay

Dónde:

B: término de difusión longitudinal

C_M: término de transferencia de masa fase estacionaria

C_S: término de transferencia de masa fase móvil

$\bar{U}$: término de velocidad de flujo de fase móvil

Se tiene un control de elusión más difícil, 1 a 10 ml y una presión menor a las columnas rellenas, además de usar una válvula más fina que en una rellena.

1.5.5. Fase estacionaria

A diferencia de la cromatografía líquida, la fase móvil es cromatograficamente inerte y las separaciones son hechas solo por la fase estacionaria y la interacción que tiene con la muestra.

La fase estacionaria deberá presentar una selectividad ante la muestra, se entiende que deberá ser diferencial a los componentes y presentar una separación adecuada. Deberá también presentar un amplio rango de temperaturas (entre los -60 a 400 °C) para evitar en lo posible su pérdida y provocar un "sangrado" en el cromatograma. Debe presentar una buena estabilidad química, no reaccionar con la muestra, una buena durabilidad, ser poco viscoso, presentar una alta pureza y una buena solubilidad, si esta es baja, los componentes eluyen de manera muy rápida.

1.5.6. Horno

Los hornos se encargan de establecer la temperatura de la columna, la cual se encuentra en su interior, estos poseen un amplio rango de la misma (temperatura ambiente a 400 °C) que no deberá ser afectado por la temperatura del inyector ni del detector, quiere decir, que es independiente a estos dos. La magnitud del calor debe ser uniforme en toda la columna y poseer un sistema de ventilación interna para mantenerla. Se debe tener un fácil acceso para los cambios de columna, y la capacidad de un calentamiento y enfriamiento rápido, con una precisión de +/- 0,1 °C.

Una técnica en cromatografía líquida se basa en el sistema de gradiente, su equivalente en cromatografía gaseosa es el cambio de temperatura según el tiempo de la separación, la cual constituye una programación lineal de temperatura modificando y aumentando la misma, lo que logra conseguir la separaciones de componentes en menor tiempo. Esto intenta resolver los problemas típicos de elución, donde compuestos muy volátiles se sobreponen en el cromatograma o en caso contrario, compuestos pocos volátiles se demoran demasiado en pasar por el detector y son detectados como picos anchos y mal definidos.

Las interferencias van desde la variación del caudal del gas, la viscosidad de un gas aumentando con la temperatura, que con esto aumenta la presión, y, en consecuencia baja el caudal. La deriva de línea base puede aumentar por la volatilización de fase estacionaria líquida, cuando se tiene una alta temperatura la fase estacionaria empieza a "sangrar" y se tiene un aumento en la línea base.

1.5.7. Detectores

Los componentes ya separados por la columna pasan a un sistema de detección, este examina continuamente el material eluido generando una señal eléctrica al pasar el analito proporcional a la cantidad eluida.

El problema de los detectores es el ruido, el cual es cualquier componente de la señal generada por el detector que no es originado por la muestra. Las causas más

comunes son los contaminantes en los gases, impurezas en el detector y descarga a tierra deficiente o una pérdida de fase estacionaria.

1.5.7.1. Detector de ionización de llama (FID o Flame Ionization Detector)

Al detector de ionización de llama se le considera un detector universal pues responde a todo compuesto orgánico de enlace C-H. Funciona en base a la formación de iones cuando un compuesto se quema en una llama de hidrógeno y oxígeno, en este tipo de llamas no hay iones, no conduce una corriente eléctrica lo que proporciona la línea base en el cromatograma. Cuando un compuesto orgánico eluye, este se quema y genera iones por su combustión lo cual dará una señal en el detector, una vez la señal es detectada esta es amplificada para poder ser registrada. La llama consta de 3 regiones:

- Región combustión: Mezclas de los gases, precalentados, inicio de la ruptura de las moléculas H2, O2 y analitos.
- Zona de reacción: reacciones exotérmicas con producción o consumo de H, O, HO, OH, CH, C2 e iones CHO-, que generan una corriente eléctrica y por ende la señal.
- Zona de incandescencia: emisión de luz por decaimiento de especies excitadas.

Los iones y electrones en la llama son recolectados por un ánodo colector, un colector cilíndrico polarizado, sobre este se mide la corriente iónica entre la punta del quemador y el electrodo colector.

Estos detectores entregan una elevada sensibilidad y selectividad a compuestos con uniones C-H. La combustión de H_2 apenas genera radicales, en cambio en uniones C-H, un ion es formado de cada 10^4 átomos de carbono quemados. Este detector no es sensible a gases nobles, amoniaco, óxidos de nitrógeno, H_2, O_2, N_2, CO, CO_2, CS_2, H_2O, CCl_4, perhalogenados, HCOOH, HCHO. La temperatura generalmente deberá estar a unos 5 a 10 °C mayor a la muestra, su efecto de temperatura es despreciable, pero se debe aumentar por seguridad.

1.5.7.2 Detector de espectrometría de masas

La espectrofotometría de masas es una técnica analítica que permite identificar compuestos, por medio de un espectro característico y único de cada molécula, medir su concentración en orden de ppm o ppb y proporciona información sobre la estructura de la molécula.

Funciona a base de la fragmentación de la muestra, que luego es ionizada en un patrón característico de la especie química mediante el bombardeo con electrones, provocando la emisión estimulada de un electrón de las molécula, y en sí, ionizarla. Según las siguientes reacciones:

$$ABCDE + e^- \rightarrow ABCDE^+ + 2e^-$$

El ion formado se fragmenta:

ABCDE+ -> AB + CDE+

ABCDE+ -> AB+ + CDE

ABCDE+ -> A+ + BCDE

Los fragmentos formados se separan según sus masas moleculares, esto sucede por una relación masa/carga, utilizando un sistema colector de campos eléctricos, cuadrupulos (cuatro imanes) y en vacío. El espectro de masas formado a partir de las sustancias es debido a la consecuente detección de iones de las moléculas de la muestra, el cual es único en cada compuesto químico.

1.6. Terminología en cromatografía

- Tiempo de retención (tr): Tiempo en el que el compuesto permanece en la columna antes de su elución, medido desde el punto de extracción hasta el máximo de la señal.

- Tiempo muerto (tm): Tiempo en el que un compuesto no es retenido por la columna, desde el punto de inyección hasta el detector.

- Tiempo de retención corregido (t'r): Tiempo real de retención de un compuesto en la columna.

$$t'r = tr - tm$$

- Velocidad lineal media del gas portador (ū): Corresponde al largo de la columna dividido por el tiempo muerto, expresado en cm/seg.

$$\bar{u} = \frac{L}{tm}$$

- Razón de fases:

$$\beta = \frac{\text{Volumen de la fase líquida (mL)}}{\text{Volumen de la fase móvil (mL)}}$$

- Factor de capacidad (k'): Razón entre el tiempo de que el soluto permanece en la fase estacionaria y en la fase móvil, o la cantidad de soluto en la fase estacionaria y en la fase móvil.

$$k' = \frac{t'r}{tm} = \frac{M_s}{M_m}$$

Dónde:

M_s: cantidad de soluto en fase estacionaria.

M_m: cantidad de soluto en fase móvil

- Selectividad: Se entiende como la razón entre el factor de capacidad entre dos solutos que aparecen de forma consecutiva en el cromatograma. Donde un mayor valor de α significa una columna más selectiva, si α es 1= no hay separación. Se le debe considerar la mejora de los parámetros que pueden afectar el ancho de un pico.

$$\alpha = \frac{k_b}{k_a}$$

- Plato teórico (N): Longitud requerida en una columna para establecer un equilibrio entre fase móvil y fase estacionaria. Este dato mide la eficiencia de la columna y se considera buena eficiencia mientras más platos teóricos tenga.

$$N = 16\left(\frac{tr}{Wb}\right)^2 = 5{,}54\left(\frac{tr}{W_{1/2}}\right)^2$$

Dónde:

W_b: Ancho de la base de un pico, obtenido por el intercepto de las tangentes a los puntos de inflexión de la curva con la línea base.

$W_{1/2}$: Ancho a media altura de un pico

- Altura equivalente de un plato teórico (H): Se entiende como el largo de columna requerido para un plato teórico. Donde un valor pequeño de H significa una mayor cantidad de platos teóricos, lo que se entiende como una mayor eficiencia. De igual manera H mide el ensanchamiento de banda cromatográfica, el cual es otra medida de eficiencia utilizando la ecuación de Van Deemter y la ecuación de Golay.

$$H = \frac{L}{N}$$

- Resolución (R): Es la medición cuantitativa de la separación de dos picos, donde un valor igual o mayor a 1.5 se le considera buena o una separación completa.

$$R = \left(\frac{k}{1+k}\right)\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{\sqrt{N}}{4}\right)$$

CAPÍTULO 2: PLANTEAMIENTO DE OBJETIVOS Y MARCO EXPERIMENTAL

2. Planteamiento de objetivo y marco experimental

2.1. Objetivos

2.1.1. Objetivo general

Identificar los compuestos hidrocarburos poliaromáticos presentes en el ají cacho de cabra ahumado y merkén.

2.1.2. Objetivo específico

- Estudio comparativo de métodos de extracción de solventes horno microondas y Soxhlet en solventes hexano y acetona.
- Determinación de un método alternativo de extracción de solventes, para comprobar su confiabilidad.
- Determinación de concentración de HPAs en el ají cacho de cabra y merkén.

2.2. Metodología

Se extraerán los compuestos a identificar de ají cacho de cabra por los métodos Soxhlet y horno de microondas. Posteriormente, se identificará los hidrocarburos poliaromáticos presentes en cada muestra por cromatografía de gases.

2.3. Equipos y materiales

2.3.1. Equipo

- Cromatógrafo Agilent Technologies 7890a con detector FID.
- Cromatógrafo Agilent 7890ª con detector de masa Agilent 5975C inert MSD
- Columna Rtx-5MS (0,25 mm id x 30m x 0,25um).
- Microondas Anton Parr, modelo 3000
- Rotavapor, Buchi Rotavapor R-114.

- Balanza semi-analítica, Sartorius TE 313s.
- Manta calefactora, Nahita modelo 655.

2.3.2. Materiales

- Extractor Soxhlet 150 mL.
- Balón 250mL.
- Tapas esmeriladas para balones.
- Tubo de ensayo con tapa.
- Papel filtro
- Embudo de vástago largo.
- Espátula
- Varilla
- Probeta 10 mL y 100mL
- Matraz aforado 100ml
- Micropipetas 2-20 µL, 40-200 µL y 100-1000 µL clase A

2.4. Reactivos y soluciones

2.4.1. Reactivos

- Diclorometano (CH_2Cl_2), PM=84,93 g/mol, grado P.A, Merck
- Acetona (CH_3COCH_3), PM=58,04 g/mol, grado P.A, Merck
- Hexano (C_6H_{14}), PM=86,18 g/mol, grado P.A, Merck
- Gas calidad cromatográfica: helio, hidrógeno y aire.

2.4.2. Muestra problema

- Ají cacho de Cabra ahumado (Ají cacho de cabra deshidratado 50 g, marca Huer-Top)
- Merken (Merquen 90 g, marca Winkler)

2.4.3. Soluciones

- Solución de hexano/acetona (94:6 v/v).
- Solución multi estándar de HPAs

2.4.3.1. Preparación de Estándares

a) Solución stock mezcla (200 ppm): Pesar aproximadamente 20 mg en un vaso precipitado de 25 ml en una balanza analítica (precisión 0,0001g) los siguientes compuestos por separado, se consideran estos por ser los más posibles de aparecer en mayor cantidad en ají cacho de cabra ahumado.

- Fenantreno, (CH14Cl0), PM=178,23 g/mol, grado P.A, Merck
- Fluoranteno, (CH16Cl0), PM=202,26 g/mol, grado P.A, Merck
- Pireno, (CH16Cl0), PM=202,26 g/mol, grado P.A, Merck
- Antraceno (CH14Cl0), PM=178,23 g/mol, grado P.A, Merck

Se deberán disolver en pequeñas cantidad de hexano/acetona (94:6 v/v), y pasar cada una cuantitativamente, junto con un lavado posterior, a un matraz aforado de 100 ml y aforar hasta completar volumen y homogeneizar.

b) Solución intermedia (2 ppm): Tomar una alícuota de 250 ul de la solución stock mezcla de 200 ppm, y depositarlo en un matraz aforado de 25 ml, enrasar con solución de hexano/acetona (94:6 v/v) hasta completar volumen.

2.4.3.2. Preparación de soluciones

a) Preparación solución hexano/acetona (94:6 v/v): Medir 940 ml de hexano en una probeta de 1 litro, adicionar 60 ml de acetona, asegurarse que las proporcionar hayan sido las correctas y trasvasar el contenido en un envase ambar de 1 litro, previamente ambientado y sellar.

2.4.4. Preparación curva de calibración

a) Curva de calibración: Se preparan seis niveles para una curva de calibración a base de una solución intermedia de 2,0 ppm. Se toma una alícuota correspondiente a la cantidad a necesitar para la curva, y traspasa a un matraz aforado de 10 ml y se enrasa con el disolvente hexano/acetona (94:6 v/v), así construyendo según se explica en la Tabla 2-1:

Tabla 2-1. Esquema de dilución para curva de calibración

Concentración (ug/L)	Alícuota (ul)
500	6,25
1000	12.5
1500	18,75
2000	25
2500	31.25
3000	37,5

2.4.5. Determinación de límites de detección y cuantificación.

a) Bajo la confección de una nueva curva de calibración en triplicado, con concentraciones menores de analito, conocida como un gráfico rango inferior, determinando una nueva ecuación de la calibración, de donde se obtiene b, correspondiente a la pendiente y Ybl, correspondiente a la respuesta a concentración cero.

b) Se determina la desviación estándar de cada concentración de la curva de rango inferior, se confecciona una tercera curva utilizando las concentraciones de la segunda curva y las desviaciones estándar obtenidas de esta misma, extrapolando a concentración cero y obteniendo el estimado Sbl.

c) Estos datos se remplazan en la primera parte de la ecuación y = Ybl+3$xSbl$, el resultado obtenido se reemplaza en la ecuación de la recta del grafico rango inferior y se procede a despejar x.

2.5. Procedimiento

2.5.1. Método Horno de microondas

- Pesar 20 gramos de muestra triturada y secar a 60°C por 1 hora.
- Pesar 1 gramo de muestra seca y se agregan en seis tubos de teflón del equipo microondas.
- Se agrega 10 mL de solvente hexano/acetona (94:6 v/v).
- Programación del equipo: Especificar solvente y volumen (10mL), masa de la muestra (1g) y la potencia (120W), con un tiempo programado de 20 minutos.

- Al terminar el proceso, se filtra la muestra, cuantitativamente, mediante un filtro Whatman 4, lavando con porciones del solvente hasta un mínimo de 3 veces.
- El filtrado se recoge en 6 balones de 250 mL, previamente tarados y llevados a peso constante.
- Eliminar el solvente del balón evaporando en baño de agua o en rotavapor hasta más menos 3 a 4 ml, para una posterior evaporación en corriente de nitrógeno hasta ajustar a 2 ml.

2.5.2. Método Soxlhet

- Pesar 70 gramos de muestra triturada y secar a 60°C por 1 hora
- Pesar 10 gramos de muestra seca y transferir a un cartucho de extracción.
- Colocar el cartucho en el interior de un extractor Soxhlet y conectar el extractor a un balón de destilación previamente tarado de 250ml.
- Agregar el solvente hexano y acetona (94:6 v/v) a través del extractor, y mantener a reflujo por 4 horas.
- Eliminar el solvente del balón evaporando en baño de agua o en rotavapor hasta más menos 3 a 4 ml, para una posterior evaporación en corriente de nitrógeno hasta 2 ml.

2.5.3. Purificación

- Instalar columna polipropileno (Bakerbond) de 6 ml.
- Rellenar con fase estacionaria de 1 g de sílice de 40 um. Se debe impedir que las columnas se sequen.
- Pasar la resina a través de la columna, dejar secando las columnas aspirando aire por ½ hora, y eluir con 2x3ml de hexano/diclorometano (1:4).
- Concentrar el extracto en rotavapor a 1 mL aproximadamente.
- Secar y reducir bajo corriente de N2.
- Reconstituir a 1 mL e inyectar 1 ul al cromatógrafo.

2.6. Condiciones cromatográficas

Tabla 2-2. Esquema de condiciones cromatograficas.

Detector	**GC-FID-MS**

Columna	Rtx-5 (0,25 mm id x 30m x 0,25 µm)
Temperatura de horno	T° inicial: 100°C (1 min) 10 °C/min T° final: 280 °C (5 min)
Temperatura inyector	200°C
Temperatura detector	260°C
Modo de inyección	Splitless, 45 s Split cerrado
Gas portador	Helio, flujo 1ml/min
Volumen de inyección	1 ul

2.7. Expresión de cálculo

2.7.1. Ecuación de la recta

Se utiliza la ecuación de la recta para cuantificar y obtener los resultados necesarios en base a una curva de calibración, según la ecuación:

$$Y = bx + a$$

Dónde:
y= área del analito.
b= pendiente de la recta.
a= intersección con el eje y.
x= concentración del analito en la recta ajustada (ppb).

2.7.2. Media aritmética

La media aritmética ($\bar{x}$) es la suma de un conjunto de datos dividida por la cantidad de estos, demostrada en la siguiente ecuación:

$$= \frac{\sum_{i=1}^{n} X_i}{n}$$

Dónde:

n = número de datos

x_i = sumatoria de los datos

2.7.3. Desviación estándar

Es una medida de dispersión de datos con respecto al valor promedio de estos, explicado en la ecuación:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{n} \bar{X} \ (X_i -)^2}{n-1}}$$

Dónde:

x_i= datos de muestra.

$\bar{X}$ = media aritmética de los datos.

n= número de datos.

2.7.4. Coeficiente de variación

Es una relación entre el valor promedio y la desviación estándar que indica que tan confiables y precisos son los datos obtenidos, según la ecuación:

$$CV = \frac{S}{\bar{X}} * 100$$

Dónde:

s= desviación estándar.

$\bar{X}$ = media aritmética de los resultados

2.7.5. Límites de detección

El límite de detección se entiende como la cantidad mínima que es revelada por el detector, correspondiente a la cantidad del blanco multiplicado por tres, según la ecuación:

$$LD = \frac{Ybl + 3 * Sbl}{b}$$

Dónde:

Ybl= respuesta a concentración cero.

Sbl= desviación estándar de las áreas graficas de concentración rango inferior.

B= pendiente de gráfico de concentración rango inferior.

2.7.6. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación se entiende como la cantidad mínima para ser cuantificada, este teóricamente equivale a la cantidad del blanco multiplicado diez veces.

$$LC = \frac{Ybl + 10 * Sbl}{b}$$

Dónde:

Ybl= respuesta a concentración cero.

Sbl= desviación estándar de las áreas gráficas de concentración rango inferior.

B= pendiente de gráfico de concentración rango inferior.

CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3. Resultados

Considerando las circunstancias del país, no se puede realizar la parte experimental que requería esta propuesta hasta nuevo aviso, en cambio, se ha propuesto hacer un estudio comparativo de los métodos Soxhlet y microondas, además de determinar la cantidad teórica que se podría esperar de hidrocarburos poliaromáticos en ajíes.

En la siguiente sección lo que se pretende ver es la comparación de métodos poseyendo la misma matriz, tomando en consideración el método y análisis que obtuvo una mejor eficiencia y recuperación en cada caso, en otras palabras, no se tomará en cuenta que se está extrayendo, si no lo eficaz del como.

3.1. Resultados extracción de resina

Soluciones de calibración: Estándar de calibración =23,7 mg/10 etanol absoluto.

2,37 mg/ml

Cada punto de la curva de calibración está conformado por un volumen en µL de la solución de estándar de calibración aforado en 10 ml de etanol absoluto.

Tabla 3-1. Volúmenes de inyección y curva de calibración, trabajo de capsaicina

Volumen ul/ml	Concentración ug/ml	Áreas
200	474	61
400	948	153
600	1,422	236
800	1,896	329
1000	2,370	409

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

Los resultados en las tablas contienen los gramos de muestra inicial, resina obtenida y porcentaje de rendimiento en sextuplicado, junto con la estadística descriptiva correspondiente.

Tabla 3-2. Método Soxhlet (4 Horas); Solvente: Etanol [Número de muestras=6]

	Muestra Seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H)	% Rendimiento (B.S)
Promedio	10,004	1,27	11,29	12,25
D. Estándar	0,0005	0,09	0,83	0,91
C.V. %	0,0052	7,40	7,40	7,40

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

Tabla 3-3. Método microondas (20 min; 120W); Solvente: Etanol [Número de muestras=6]

	Muestra Seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H)	% Rendimiento (B.S)
Promedio	1,002	0,12	11,58	11,98
D. Estándar	0,0005	0,01	0,79	0,82
C.V. %	0,0515	6,85	6,84	6,84

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

Tabla 3-4. Método Soxhlet (4 Horas); Solvente: Diclorometano [Número de muestras=6]

	Muestra Seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H)	% Rendimiento (B.S)
Promedio	10,033	0,99	8,95	9,90
D. Estándar	0,0010	0,04	0,38	0,43
C.V. %	0,0103	4,31	4,31	4,31

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

Finalmente se presentan los resultados en comparativa de muestra inicial utilizada en la extracción y la resina obtenida del procedimiento.

Tabla 3-5. Resultados en ají cacho de cabra.

Resultados	Microondas con etanol	Soxhlet con diclorometano	Soxhlet con etanol
Muestra inicial (gr)	6,014	10,200	60,022
Resina obtenida (gr)	0,721	5,959	7,353

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

3.2. Resultados hidrocarburos poliaromáticos en ají

3.2.1. Curvas cromatográficas (test linealidad)

Las siguientes tablas muestran el test de linealidad de cada curva de los HPAs, establecido por el factor de respuesta absoluto, el cual relaciona la respuesta del analito (área) y la concentración de cada muestra.

Tabla 3-6. Curva de calibración de Fenantreno

Concentración ug/L	Área	Factor de respuesta absoluto
500	106680	213,36
1000	219560	219,56
1500	332440	221,626
2000	445320	222,66
2500	558200	223,28
3000	671080	223,693

r= 1 Y = 225,76x-6200

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

Tabla 3-7. Curva de calibración de Fluoranteno

Concentración ug/L	Área	Factor de respuesta
500	67420	134,84
1000	164695	164,695
1500	261970	174,646
2000	359245	179,622
2500	456520	182,608
3000	553795	184,598

r= 1 y = 194,55x – 29855

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

Tabla 3-8. Curva de calibración de Antraceno

Concentración ug/L	Área	Factor de respuesta
500	54156	108,312
1000	170211	170,211
1500	286266	190,844
2000	402321	201,161
2500	518376	207,350
3000	634431	211,477

r= 1 y = 232,11x – 61899

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

Tabla 3-9. Curva de calibración de Pireno

Concentración ug/L	Área	Factor de respuesta
500	72082	144,164
1000	176312	176,312
1500	280542	187,028
2000	384772	192,386
2500	489002	195,601
3000	593232	197,744

r= 1 y = 208,46x – 32148

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

3.2.2. Análisis de hidrocarburos poliaromáticos

En la siguiente tabla se representan las concentraciones teóricas de hidrocarburos poliaromáticos presentes en el aji.

Tabla 3-10. Resultados concentraciones de hidrocarburos poliaromáticos

Hidrocarburos poliaromáticos	Concentraciones (ug/kg)
Fenantreno	2,61
Fluoranteno	0,80
Antraceno	0,54
Pireno	0,69

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

3.2.3. Límite de detección y cuantificación

La siguiente tabla muestra los límites de detección y cuantificación para cada uno de los hidrocarburos poliaromáticos en el estudio.

El método utilizado para la determinación de los cálculos consiste en la confección de una curva de calibración en triplicado con concentraciones menores de analito a la curva original, se obtienen los valores de b, pendiente, e Ybl, concentración cero.

Se prosigue con la determinación de la desviación estándar de la curva anterior, además de utilizar las concentraciones, se confecciona una nueva curva, extrapolando a concentración 0 se obtiene Sbl. Seguido se remplazan los datos en la ecuación original de los límites de detección y cuantificación.

Tabla 3-11. Límites de detección y cuantificación

HPAs	Límite de detección	Límite de cuantificación
Fenantreno	0,63 ug/kg	2,11 ug/kg
Fluoranteno	0, 49 ug/kg	1,63 ug/kg
Antraceno	0,28 ug/kg	0,94 ug/kg
Pireno	0, 15 ug/kg	0,49 ug/kg

Fuente: M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

CAPITULO 4: DISCUSIÓN

4. Discusión

Lo presentado a continuación es un trabajo y discusión donde se habla de la extracción de resina de ají cacho de cabra con diferentes solventes y los métodos de extracción Soxhlet y extracción asistida por microondas, para una purificación con extracción de fase sólida, esto con el fin de identificar la extracción con más eficiencia a seguir en un trabajo experimental, para su próxima cuantificación e identificación de hidrocarburos poliaromáticos utilizando cromatografía de gases.

En el trabajo de extracción de resina, se evaluarán los datos obtenidos de ambos trabajos según el solvente utilizado en el que fue más eficiente.

Los coeficientes de variación observados y comparados indican que el método de Soxhlet con diclorometano como solvente fue el que presentó un menor coeficiente de variación, de un 4,31%, por el contrario, el que presentó un mayor coeficiente, 7,40%, fue el método de extracción por Soxhlet utilizando etanol como solvente.

Otro factor que influiría en la extracción es el solvente que se utiliza, la tesis presentada de ají cacho de cabra mostraba originalmente una comparativa con diferentes métodos de extracción y diferentes solventes en cada caso; se puede observar de las extracciones realizadas, que el método Soxhlet utilizando etanol como solvente produjo una mayor cantidad de resina, esto muestra que el etanol tiene un mayor poder extractivo en la matriz. Esto es esperado puesto que el etanol es un solvente eficaz en la capsaicina, pero la desventaja de ambos es el tiempo que estos demoran. Ante esto, se puede observar que las diferencias en el rendimiento no son grandes, y la ventaja de microondas de poder analizar más muestras a la vez lo hace más efectivo.

A continuación se discutirá el tema original de este trabajo, la determinación de un método para comprobar su confiabilidad, puesto que de manera experimental no se podrá comprobar, se procede a aclarar variables que pueden afectar en el procedimiento.

Al ser los hidrocarburos poliaromáticos compuestos apolares y poseer una mayor afinidad a disolventes orgánicos se selecciona una solución de hexano/acetona como solvente extractivo, este se espera que dará el mejor rendimiento y eficiencia.

En la extracción por soxhlet, para que el desempeño de este método sea el mejor se debe utilizar un solvente que posea una buena afinidad, que extraiga los analitos deseados y todo compuesto insoluble se mantenga en la matriz original.

La ventaja extracción asistida es poder trabajar con más muestra y un mayor control de variables como: volumen de extractante, potencia y tiempo. Al realizar la filtración se deberá tener cuidado de no provocar una contaminación y asegurar una transferencia total por el filtrado.

Realizado el procedimiento hasta la reconstrucción de resina, esta debe ser inyectada de la manera adecuada para una buena repetitividad y reproducibilidad. Ante esto, se recomienda un sistema de inyección automático, permitiendo el ingreso de la muestra de manera completa y sin el error humano, esto se traduce a tiempos de retención similares en cada inyección, y una subsiguiente construcción de curva de calibración y la linealidad, y así entregar una respuesta proporcional a la curva la cual se espera que presente una mínima dispersión, un aceptable coeficiente de correlación es cercano o igual a 1. Utilizando los factores de respuesta; relación entre la respuesta del equipo (área) y la concentración de cada punto se verifica la linealidad. Con esto se obtienen los coeficientes de variación, un valor sin unidad que indica que tan confiables y precisos los datos son, mientras más baja la sea la variación mejor será la linealidad.

La columna más afín es capilar, Rtx-5, compuesta de difenil dimetil polisiloxano, de carácter apolar, preferible para la retención de hidrocarburos poliaromáticos, esto con el motivo de mejorar los resultados de linealidad. El diámetro, el largo de la columna como el del tamaño de la fase estacionaria influirán en la eficiencia de la cromatografía, lo que se entiende como una menor altura de platos equivalentes que implicaría una mejor resolución y eficiencia entre los picos cromatográficos. Además de ello la temperatura en el horno influenciara dependiendo de las particularidades del analito, como se explica, el sistema de temperatura programada es el equivalente al sistema de gradientes en cromatografía líquida, donde a una mayor temperatura el analito pasará de manera más rápida, pero de todos modos no tan veloz. La temperatura debe estar en el rango donde los analitos se encuentren termoestables, donde no se sufre desnaturalización logrando así una retención, eficiencia y resolución lo más óptima posible.

El detector recomendado para los hidrocarburos poliaromáticos es el de ionización por llama, el cual es sensible a los compuestos orgánicos. Con el detector indicado viene la determinación de los límites de detección y cuantificación. Para no caer en falsos positivos se debe saber la cantidad mínima de concentración que puede ser detectado bajo las mismas condiciones experimentales del método a utilizar, el resultado se presenta en la tabla 3-11.

A continuación se toma en cuenta los resultados teóricos de cada muestra problema, las cuales clasifican como la cantidad que debería haber en los ajíes, como se muestra en la tabla 3-10.

Puesto que para determinar la cantidad de concentración en un ají se utilizó una muestra única no se puede verificar niveles de reproducibilidad ni repetitividad, por lo tanto tampoco se puede discutir que tan precisos son estos datos, por lo que sería más acertado decir que estos son valores esperados en un análisis.

Los límites de detección y cuantificación de este análisis se pueden observar como valores bajos, esto es comprensible considerando que las concentraciones esperadas de los hidrocarburos poliaromáticos son en ug/kg, además se debe comprender que estos valores teóricos no están sujetos a variaciones de analistas o equipos que podrían provocar pérdidas, por lo que obtener valores tan bajos de ambos límites son un escenario perfecto.

Tomando en cuenta lo discutido de los resultados, ahora se debe discutir si estos son resultados aceptados según normas sanitarias.

"En los aceites y grasas no se aceptará más de 2 ppb de benzopirenos ni más de 5 ppb de la suma de los 8 hidrocarburos aromáticos policíclicos volátiles." Reglamento sanitario de los alimentos de chile, DTO. N° 977/96, artículo 249. [6]

Por otra parte, la Comisión de regulación de la Unión Europea No 1881/2006 para luego su modificación en la Comisión de regulación de la Unión Europea 2015/1933, declara:

Los niveles máximos para ciertos contaminantes en alimentos. Esta provee una lista más extensa de alimentos donde declara, en hierbas secas se no se aceptará más de un máximo de 10 ppb de Benzo(a)pireno ni más de 50 ppb en la suma de Benzo(a)pireno, Benzo(a)antraceno, Benzo(b)fluoranteno y criseno. [7]

Bajo ambas regulaciones, las concentraciones teóricas del ají están dentro de las permitidas por el gobierno Chileno y la Unión Europea, no se consideran un riesgo.

La posible contaminación de los alimentos para que adquirieran los hidrocarburos poliaromáticos depende principalmente del proceso de producción, la concentración de los compuestos va en aumento por el tipo de ahumado que se hace y cómo este se lleva a cabo. Afectará donde se realiza el ahumado, a que temperatura y tiempo este se realice. Los espacios cerrados tienen la ventaja de mantener el calor por más tiempo pero no hay una ventilación adecuada, por lo que la acumulación de partículas será mayor, permitiendo que la absorción de los HPA sea mayor, un espacio abierto donde se haga el ahumado tardara más o incluso será ineficiente para el proceso pero disminuiría la cantidad adquirida de hidrocarburos en el ají. La temperatura y el tiempo en lo ahumado radican mucho en cuanto el ají va a absorber, generalmente lo ahumado en caliente se produce a una temperatura de alrededor de 60 a 80 °C por alrededor de 24 a 48 horas, donde a mayor temperatura, se produce una mayor quema de leña y gracias a esto, una mayor cantidad de humo, y mientras más tiempo se mantiene un alimento en el proceso más posibilidad tiene de adquirir contaminantes.

Es verdad que de manera secundaria hay otras formas para que un alimento adquiera HPA, sea por dispersión mediante vía aérea o también puede ser depositada por lluvia o riego.

Según un trabajo de investigación escrito por R. Ortiz-Salinas, S. Cram, I. Sommer, declararon en sus estudios sobre presencia de HPA sobre suelos de la planicie aluvial de Tabasco:

La primera fuente es de origen biológico que se ubicó en los sitios con vegetación natural (manglar-popal) al detectar hidrocarburos propios de los vegetales, y el cual se ha descrito que la misma vegetación tiene un aporte de hidrocarburos aromáticos en el ambiente así como en algunos casos la presencia en algunos insectos. [23]

CONCLUSIONES

Este trabajo no pudo realizar en su totalidad los objetivos planteados inicialmente, el estudio buscó dar un planteamiento seguido de un procedimiento para la determinación de hidrocarburos poliaromáticos. Bajo las condiciones imperantes en el país y al no poder realizar procedimientos experimentales, se puede concluir:

No se pudo identificar de forma experimental el analito en cuestión, puesto que las condiciones (Cuarentenas debido al COVID-19) actuales no lo permiten.

Según los datos entregados y comparados del trabajo de extracción de capsaicinoides, de los métodos de extracción comparados, donde se usó el mismo solvente y misma muestra, el método Soxhlet con diclorometano se identificó como el que presenta mejores resultados, pero utilizar el método de extracción asistida con microondas presenta una mejor eficiencia, considerando que puede trabajar con más muestras en una menor cantidad de tiempo, siendo que sus resultados no son muy diferentes.

Los resultados dados en el estudio de reacción del disolvente dieron como resultado cantidades de hidrocarburos poliaromáticos dentro de las normas alimenticias según la Ley Chilena, pero un resultado experimental daría un resultado más exacto.

BIBLIOGRAFÍA

1. Air Quality Guidelines. Capítulo 5.9 Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). WHO Oficina regional de Europa, Copenhagen, Denmark, 2000.

2. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria. Validación de métodos analíticos, A.E.F.I. España, 2001.

3. Capsicum annuum, Wikipedia, la enciclopedia libre. Fecha de consulta: 20 de abril de 2020, de https://en.wikipedia.org/wiki/Capsicum_annuum

4. Cela R., Lorenzo R.A., Del Carmen Casais M., Técnicas de Separación en Química Analítica, Ed. Síntesis, Madrid, 2001.

5. Di Pillo F., Martinez N. Perfil de Riesgo/ACHIPIA N.°02/2018, Ocratoxina A en aji y merken, Chile, Ministerio de agricultores.

6. DTO. N° 977/96, Reglamento sanitario de los alimentos de Chile, 13 de mayo de 1997.

7. DTO. N° 1881/2006, Comisión de regulación de la Unión Europea, 19 de diciembre de 2006

8. Escalante J. L. (22 de enero de 2019). Ají: propiedades, beneficios y valor nutricional, La vanguardia. Fecha de consulta: 30 de abril de 2020, de https://www.lavanguardia.com/comer/materia-prima/20181102/452669986733/aji-propiedades-beneficios-valor-nutricional.html

9. Franco Tobón Y., Ramírez Botero C., El benzo(a)pireno en los alimentos y su relación con el cáncer, Universidad y Ciencia, Vol. 15 no.1

10. Los Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAP) Acercamiento a su problemática como riesgo laboral. Metal, Construcción y Afines de UGT (MCA-UGT), Federación de Industria, España.

11. Macek M. Sección de comida, Los ajíes, pimientos, chiles o morrones, Zona diet. Fecha de consulta: 29 de abril de 2020, de https://www.zonadiet.com/comida/aji.php

12. McNair H. M., Miller J. M. Basic gas chromatography

13. M. E. A. da Silva. Arduim, I. R. S. Dutra, G.S.Vieira, P. J. Sanches Filho, C. S. Huber, Optimization Of Chromatographic Methods For Deternation Of Pahs In Peppers.

14. Merken, Wikipedia, la enciclopedia libre. Fecha de consulta: 20 de abril de 2020, de https://en.wikipedia.org/wiki/Merk%C3%A9n

15. Ministerio de Agricultura, Chile. Resultados y Lecciones en Ají Merkén con Alto Valor Agregado: Proyecto de Innovación en la Región de la Araucanía: Hortalizas y Tubérculos.

16. Ministerio de Consumo, Gobierno de España (21 de Diciembre de 2020). Seguridad Alimentaria, Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos (HAPs). Fecha de consulta: 02 de Enero de 2021, de https://www.aesan.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/haps.htm#:~:text=Los%20hidrocarburos%20arom%C3%A1ticos%20polic%C3%ADclicos%20(HAPs)%20son%20un%20grupo%20de%20m%C3%A1s,la%20parrilla%2C%20etc.)

17. Ortiz-Salinas R., Cram S., Sommer I., Hidrocarburos aromáticos policiclicos (HAPs) en suelos de la llanura aluvial baja del estado de tabasco, Universidad y Ciencia, Vol. 28 no.2.

18. Peppers, sweet, green, raw, nutrients, U.S. Department of agriculture. Fecha de consulta: 30 de abril de 2020, de https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170427/nutrients

19. Pérez-Morales G., Morales, P. y Haza A. Hidrocarburos aromáticos policiclicos (HAPs) (I): Toxicidad, exposición de la población y alimentos implicados. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.

Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid, España.

20. Polycyclic aromatic hydrocarbon, Wikipedia, la enciclopedia libre. Fecha de consulta: 13 de Diciembre de 2020 https://en.wikipedia.org/wiki/Polycyclic_aromatic_hydrocarbon

21. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, comité del codex sobre aditivos alimentarios y contaminantes de los alimentos, Organización mundial de la salud, organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación, Comisión del Codex Alimentarius, CX/FAC 05/37/34, Octubre 2004

22. Quattrocchi O. A., de Andrizzi S. A. &. Laba R. F., Introducción a la HPLC Aplicación y Práctica, Artes Gráficas Farro SA, California, 1992.

23. Quiroga Olmos P., Zapata Muños J., Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes. Trabajo de título, Universidad Santa maría, Chile.

24. Reglamento (CE). N° 2015/1933, Comisión de regulación de la Unión Europea , 27 de octubre de 2015

25. Sanchez-Uria J., Castillo Busto E., Analytical performance of microwave-assisted solvent extraction (MASE) for the routine determination of PAHs in polluted soils by Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS). Departamento de Química Física y Analítica, Universidad de Oviedo, España. Département Biomédical et Chimie Inorganique, Laboratoire National de Métrologie et d´Essais, France

26. Smoking (cooking), Wikipedia, la enciclopedia libre. Fecha de consulta: 20 de Diciembre de 2020, https://en.wikipedia.org/wiki/Smoking_(cooking)

27. Tirado A. L. G., González A. O. J., García G. R. S., Durán D. de B. C. Hidrocarburos Aromáticos policíclicos: una amenaza potencial para la salud. Investigación Científica, Ciudad Universitaria, Delegación Coyoacán, México

28. Vives I., Grimalt J.O., Guitart R. Los hidrocarburos aromáticos policíclicos y la salud humana. Apuntes de Ciencia y Tecnología, N°3, septiembre de 2001,

Asociación para el Avance de la Ciencia y la Tecnología en España (AACTE), España.

29. Wade L.G. Química organica Vol 2, Séptima edición, Pearson Educación de Mexico, S.A. de C.V. 2013

ANEXO

Anexo A: Tablas de comparativa de métodos, extracción de ají cacho de cabra

Tabla A. 1-1 Método Extracción microondas (20 minutos, 120W); Solvente Etanol

Muestra	Muestra seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H.)	% Rendimiento (B.S)
1	1,002	0,119	11,47	11,88
2	1,002	0,106	10,22	10,58
3	1,003	0,117	11,27	11,67
4	1,003	0,129	12,42	12,86
5	1,002	0,126	12,15	12,57
6	1,002	0,124	11,95	12,38
Promedio	1,002	0,120	11,58	11,99
D. Estándar	0,0005	0,01	0,79	0,82
C.V. %	0,0515	6,85	6,84	6,84
LC 95%	0,001	0,01	0,83	0,86
T. student (GL5)	2,571	2,571	2,571	2,571

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer "Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes"

Tabla A. 1-2 Metodo Soxhlet (4 horas); Solvente: Etanol

Muestra	Muestra seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H)	% Rendimiento (B.S)
1	10,034	1,012	9,12	10,09
2	10,032	1,034	9,32	10,31
3	10,034	0,945	8,51	4,42
4	10,032	0,969	8,73	9,66
5	10,034	0,954	8,59	9,51
6	10,034	1,045	9,41	10,41
Promedio	10,033	0,99	8,95	9,90
D. Estándar	0,0010	0,04	0,38	0,43
C.V. %	0,0102	4,31	4,31	4,31
LC 95%	0,001	0,04	0,41	0,45
T.student (GL5)	2,571	2,571	2,571	2,571

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer “Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes”

Tabla A. 1-3 Metodo Soxhlet (4 horas); Solvente: Diclorometano

Muestra	Muestra seca (g)	Resina obtenida (g)	% Rendimiento (B.H)	% Rendimiento (B.S)
1	10,034	1,012	9,12	10,09
2	10,032	1,034	9,32	10,31
3	10,034	0,945	8,51	4,42
4	10,032	0,969	8,73	9,66
5	10,034	0,954	8,59	9,51
6	10,034	1,045	9,41	10,41
Promedio	10,033	0,99	8,95	9,90
D. Estándar	0,0010	0,04	0,38	0,43
C.V. %	0,0102	4,31	4,31	4,31
LC 95%	0,001	0,04	0,41	0,45
T. student GL5	2,571	2,571	2,571	2,571

Fuente: Trabajo de título, Q. O. Paulina, Z. M. Jennifer “Extracción de capsaicinoides en ajíes utilizando diferentes solventes”

Anexo B: Gráficos

Anexo B.1. Gráficos de linealidad teóricos

Gráfico B.1.1. Gráfico linealidad: Fenantreno

y = 225,76x-6200

r = 1

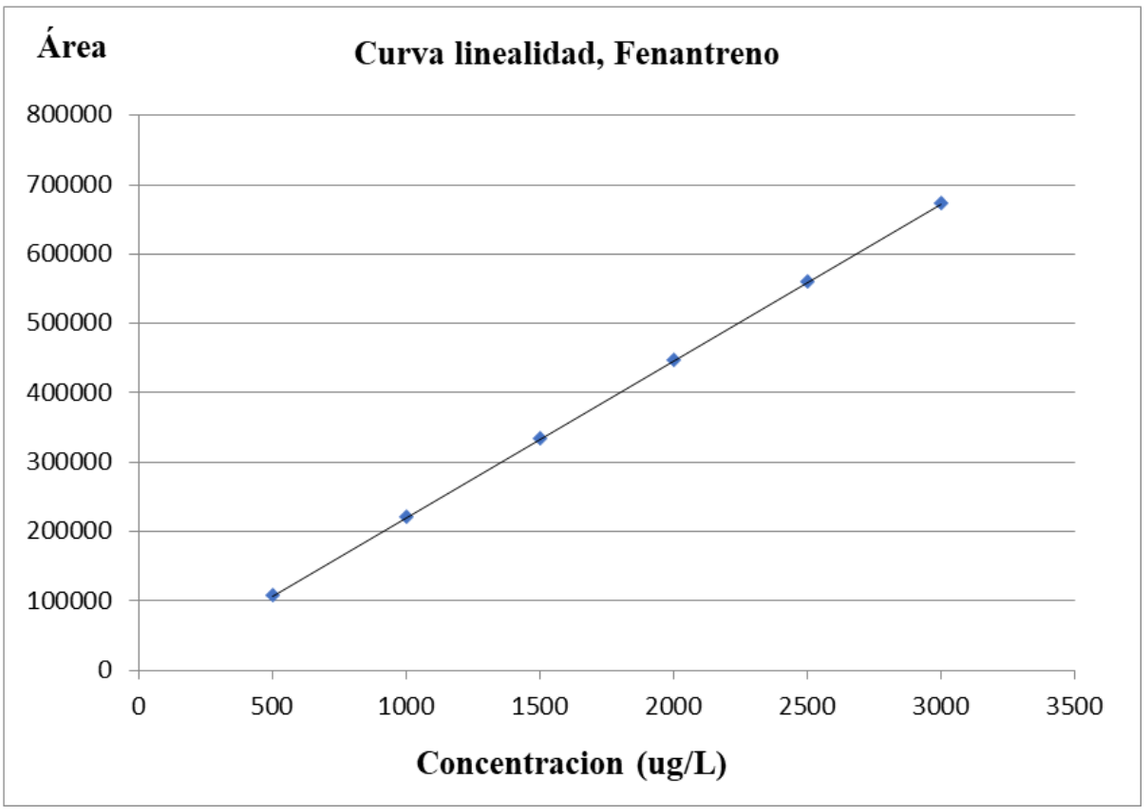


Gráfico B.1.2. Gráfico linealidad: Fluoranteno

y = 194,55x – 29855

r = 1

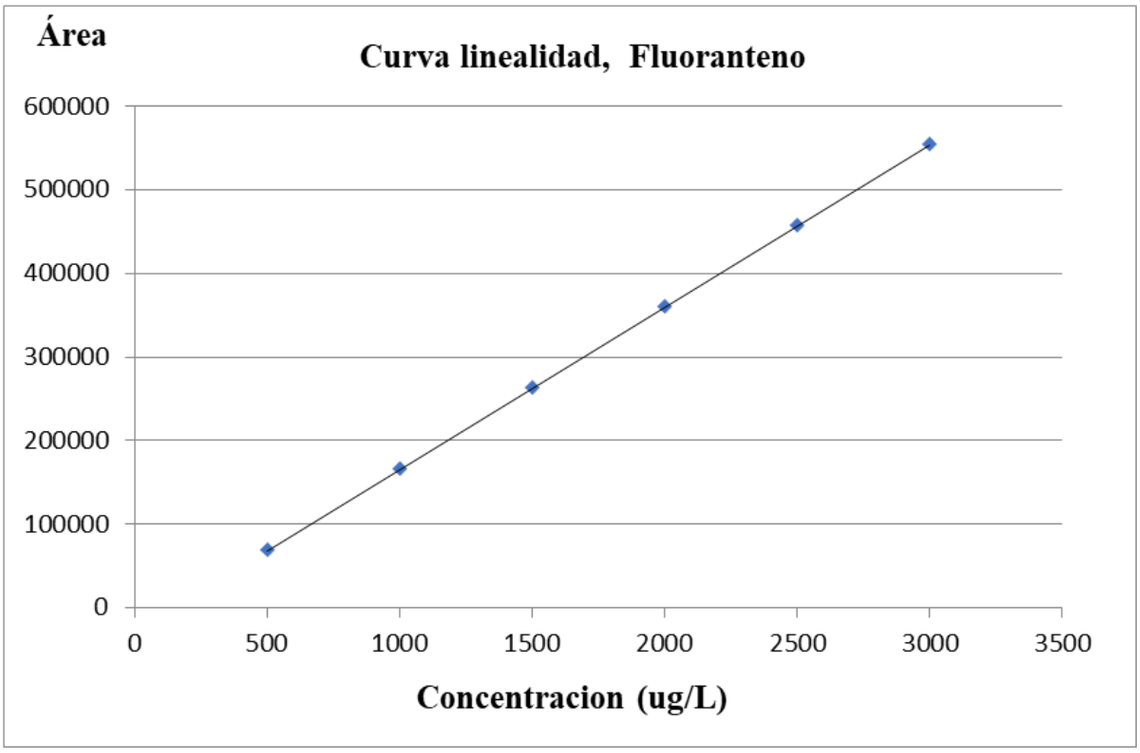


Gráfico B.1.3. Gráfico linealidad: Antraceno

y = 232,11x – 61899

r = 1

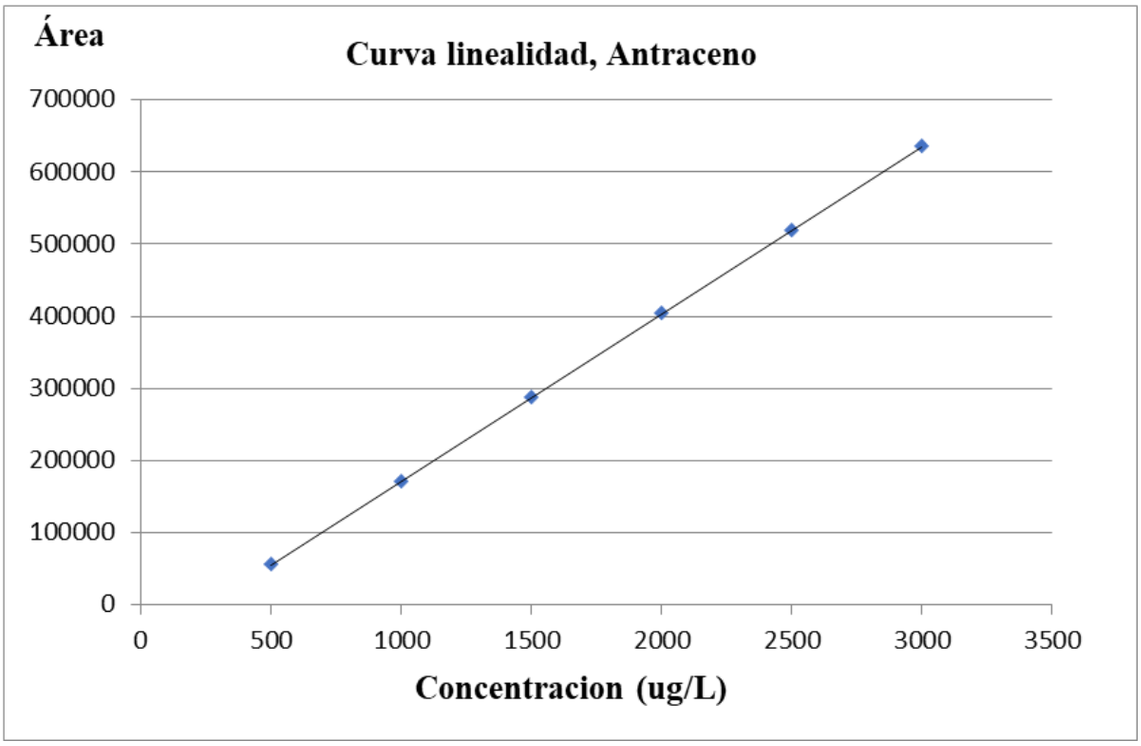
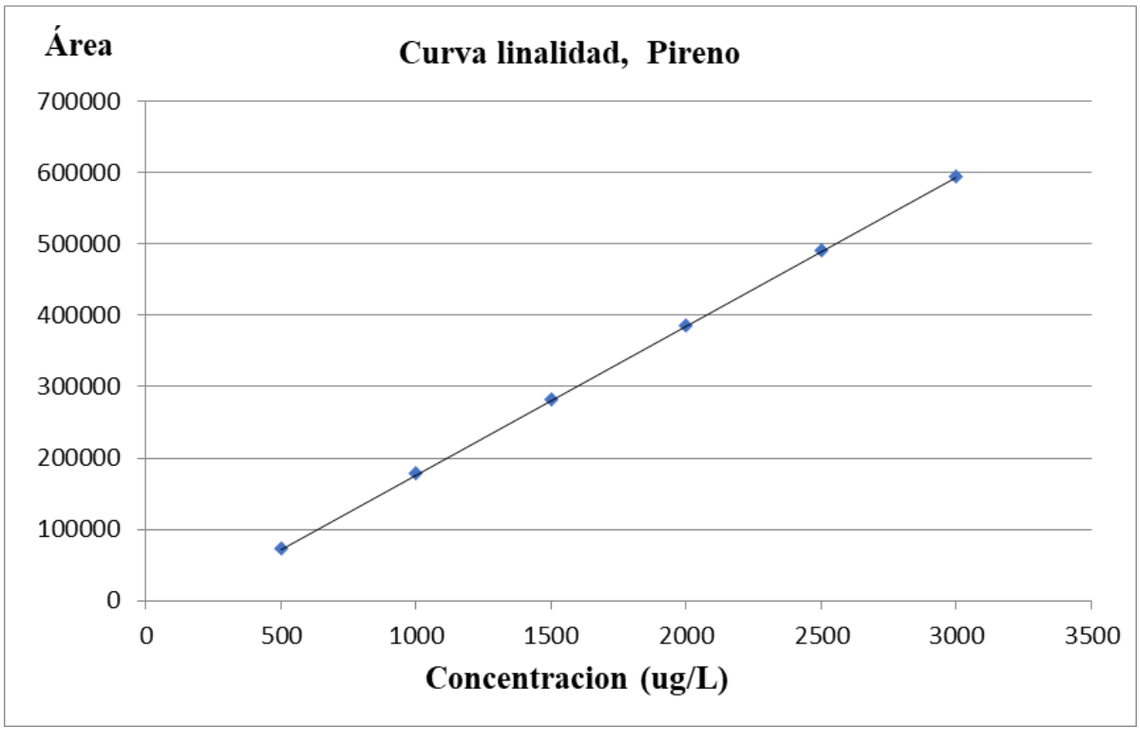


Gráfico B.1.4. Gráfico linealidad: Pireno

y = 232,11x – 61899

r = 1



Anexo B.2. Gráficos de rango inferior teóricos

Gráfico B.2.1. Gráfico de rango inferior: Fenantreno

y = 224,77x – 6096,7

r = 0,9999

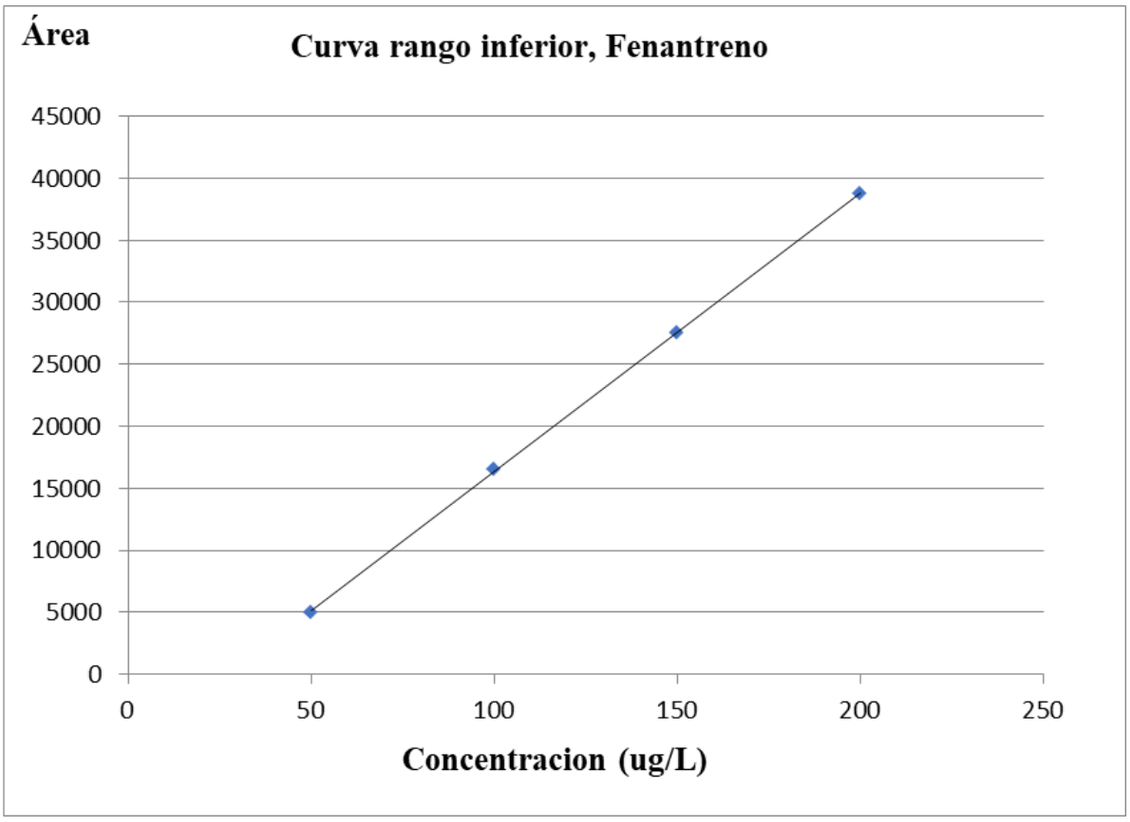


Gráfico B.2.2. Gráfico de rango inferior: Fluoranteno

y = 197,82x – 29945

r = 0,9986

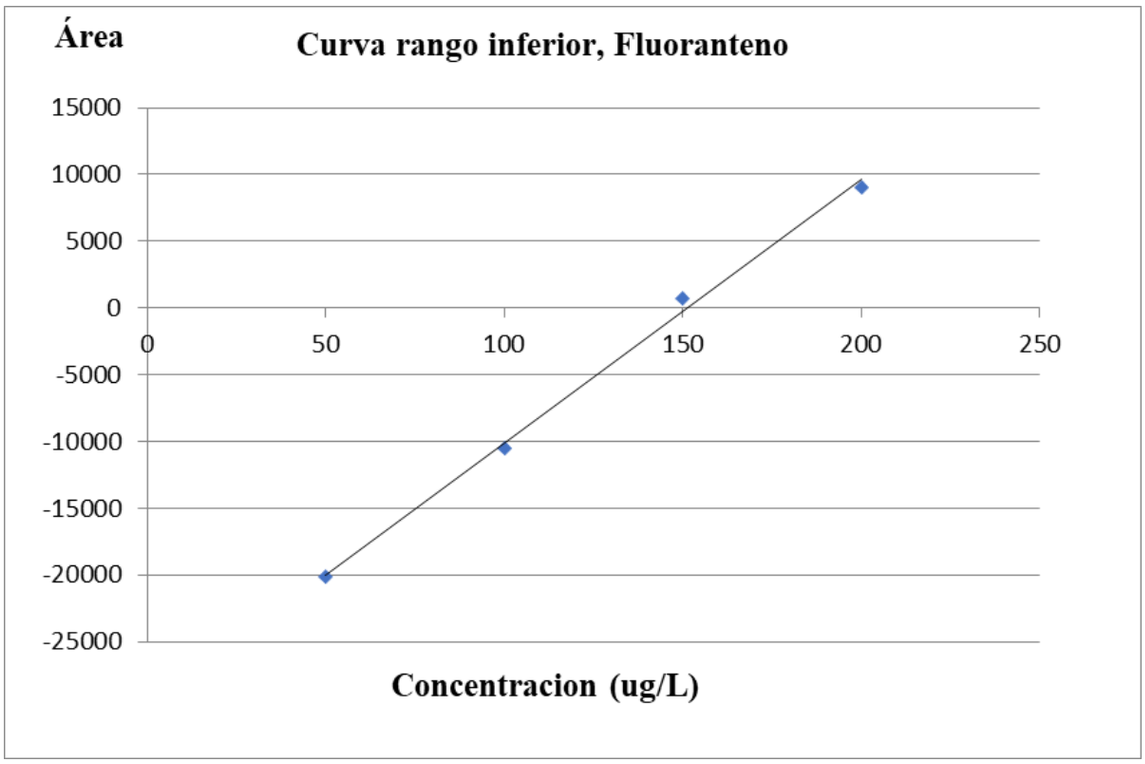


Gráfico B.2.3. Gráfico de rango inferior: Antraceno

y = 417,74x - 77425

r = 0,9409

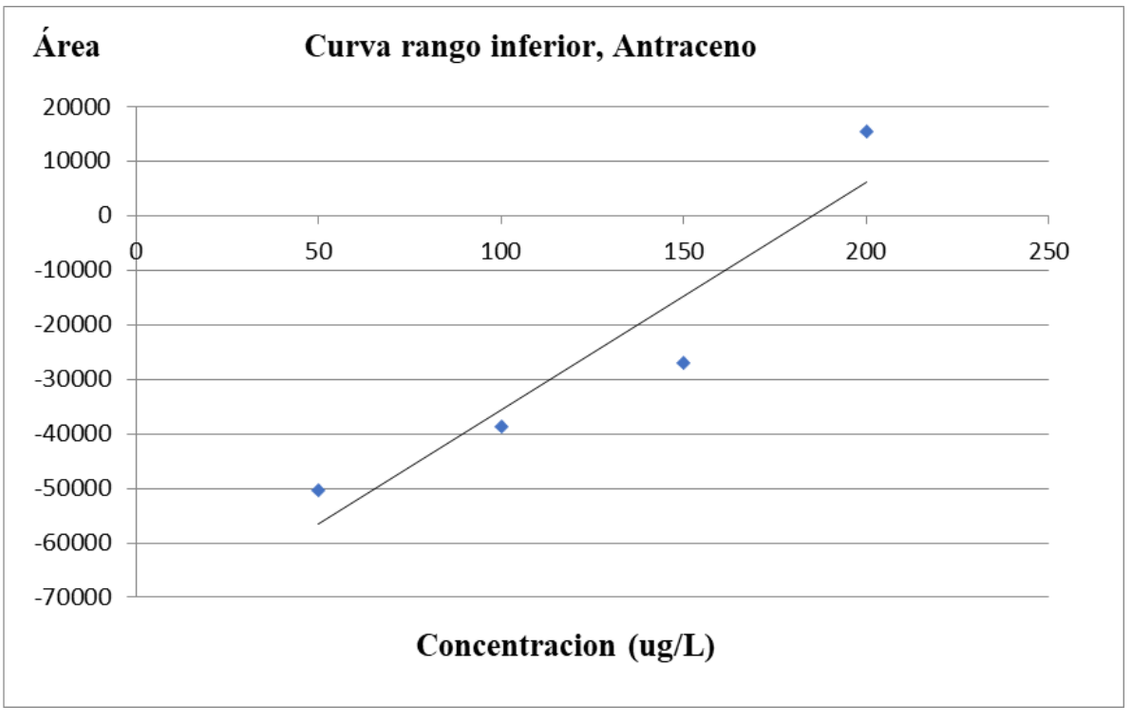
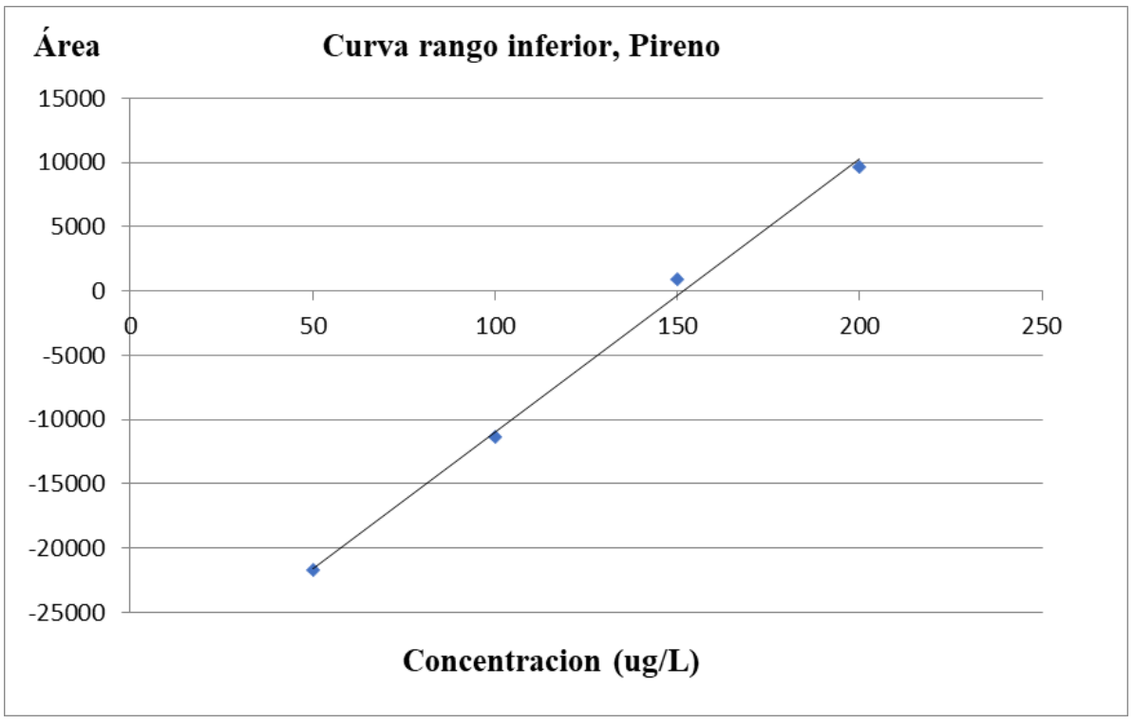


Gráfico B.2.4. Gráfico de rango inferior: Pireno

y = 212,38x - 32188

r= 0,9981



Anexo B.3. Gráficos bajo la curva

Gráfico B.3.1. Gráfico bajo la curva: Fenantreno

y = 2,064x + 15

r = 0,9793

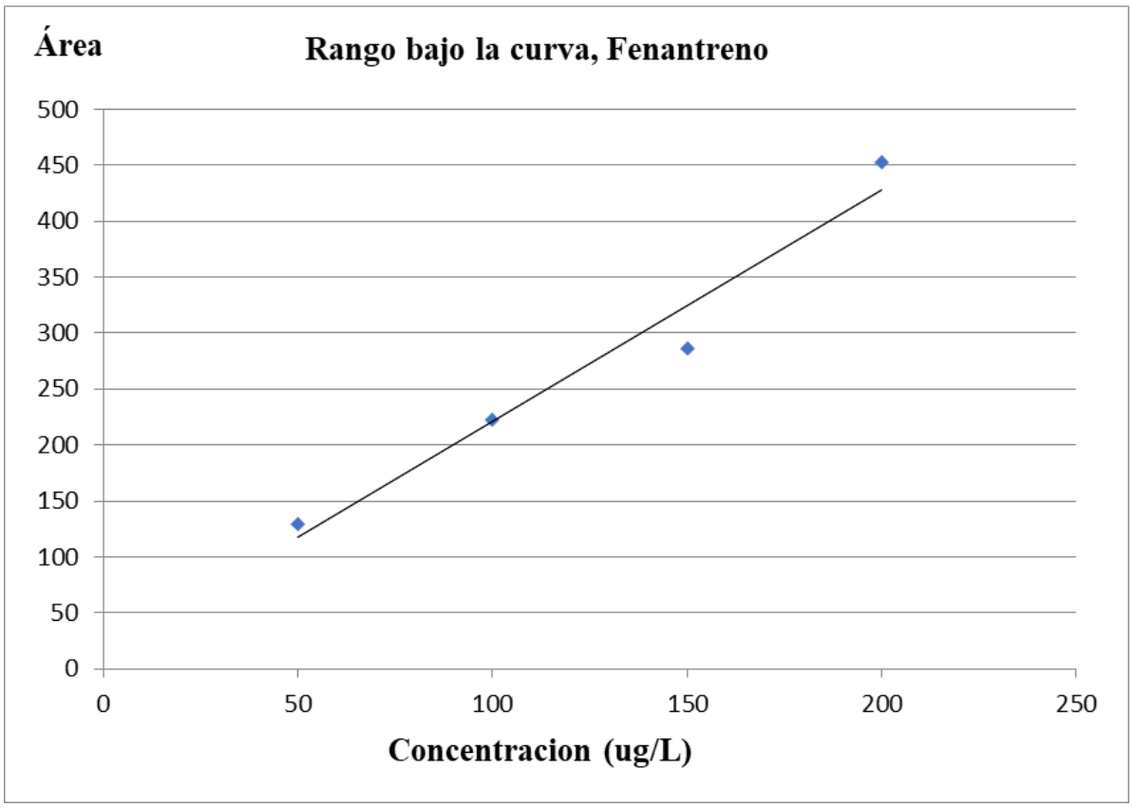


Gráfico B.3.2. Gráfico bajo la curva: Fluoranteno

y = 0,4385x + 32,323

r = 0,9942

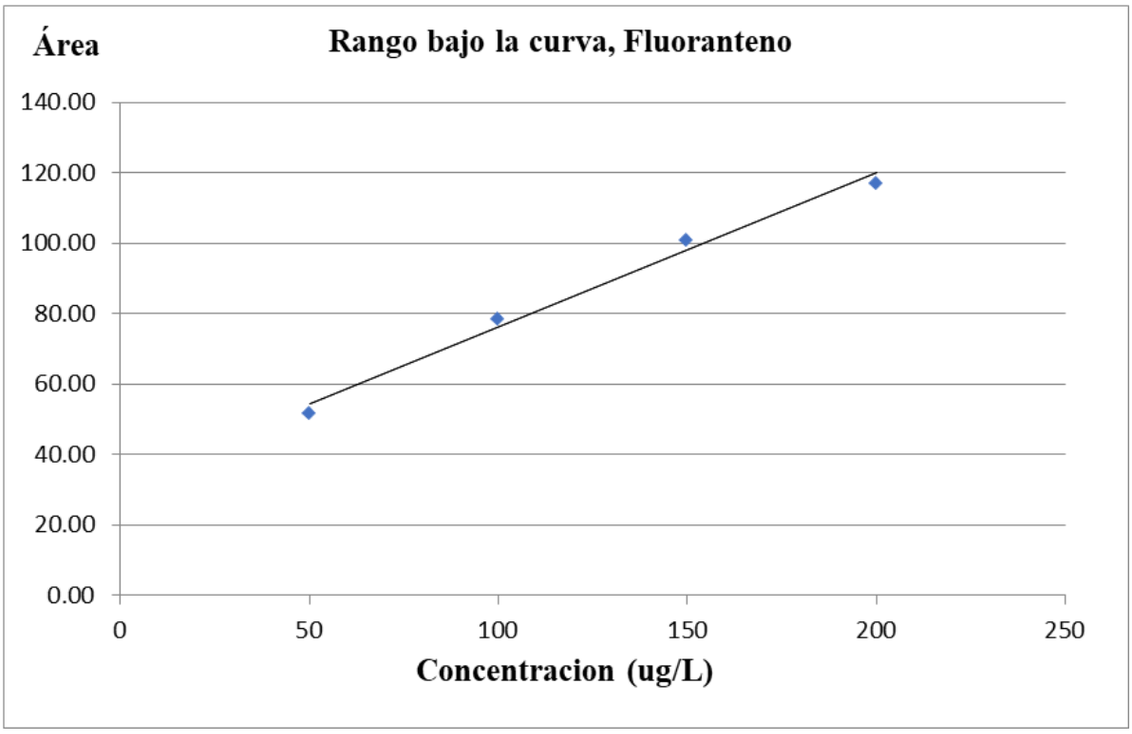


Gráfico B.3.3. Gráfico bajo la curva: Antraceno

y = 1,1754x + 39,491

r = 0,9943

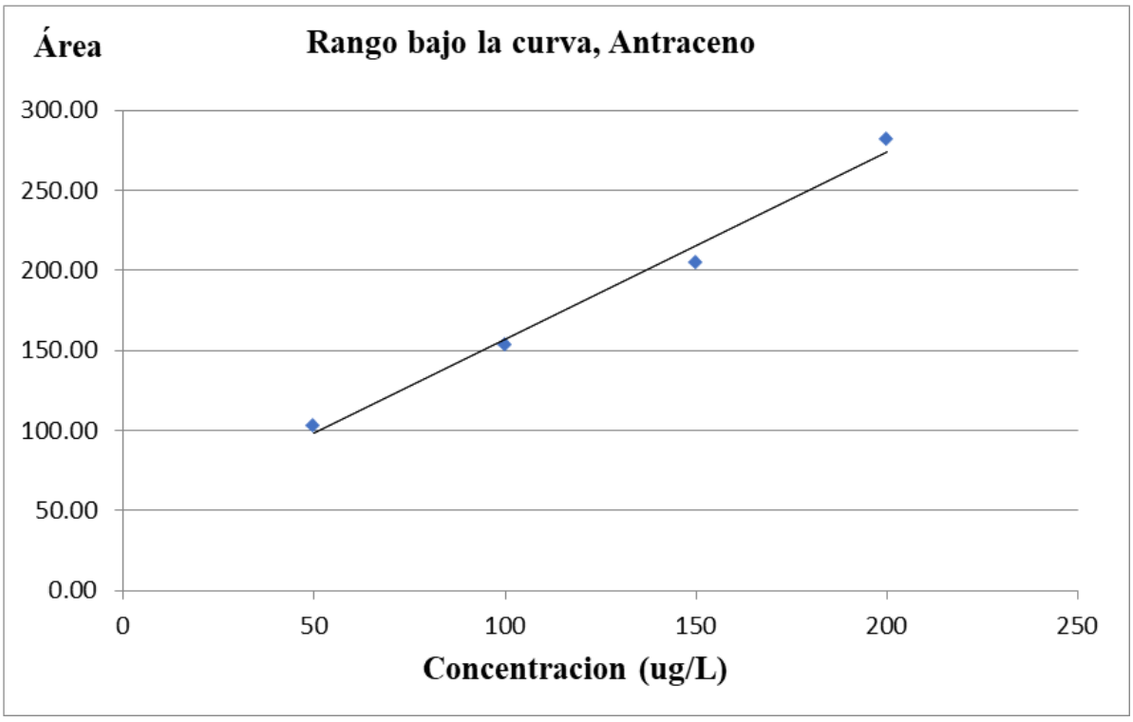
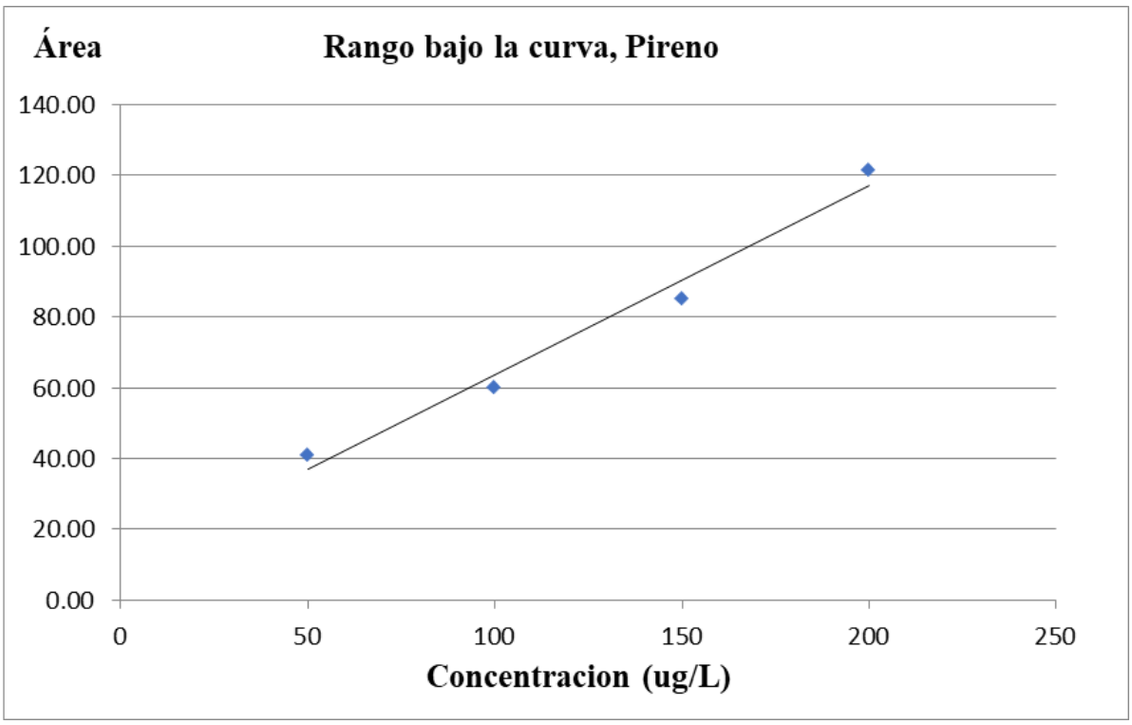


Gráfico B.3.4. Gráfico bajo la curva: Pireno

y = 0,5337x + 10,332

r = 0,9901



Anexo C: Límites de Detección y Cuantificación.

Tabla C. 1-1 Límite de Detección y Cuantificación para Fenantreno

Concentración (ug/L)	Áreas inyección 1	Áreas inyección 2	Áreas inyección 3	Promedio áreas	D. estándar
50	5150	5088	4900	5046	130
100	16800	16376	16470	16549	223
150	27250	27664	27800	27571	286
200	39150	38952	38400	28834	453

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a un promedio de áreas:

r = 0,9999

b = 224,77

a = (– 6096,7)

y = 224,77x – 6096,7

para y = 0; x = -6096,7 ; se toma este dato como estimación de Y_b

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a desviación estándar:

r = 0,9963

b = 1,674

a = 47,5

y = 1,674x + 47,5

para y = 0; x = 47,5 ; se toma este dato como estimación de S_b

x = -6096,7 + 3 * 47,5

= -5954,2

y =224,77x – 6096,7

x = -5954,2 + 6096,7/224,77

= 0,634 ug/kg, como límite de detección.

x = -6096,7 + 10 * 47,5

= -5621,7

y =224,77x – 6096,7

x = -5621,7 + 6096,7/224,77

= 0,634 ug/kg, como límite de cuantificación.

Por lo tanto el Límite de Detección para el Fenantreno es 0,63 ug/kg.

Por lo tanto el Límite de Cuantificación para el Fenantreno es 2,11 ppb.

Tabla C. 1-2 Límite de Detección y Cuantificación para Fluoranteno

Concentración (ug/L)	Áreas inyección 1	Áreas inyección 2	Áreas inyección 3	Promedio áreas	D. estándar
50	-20127	-20200	-20100	-20142	51,73
100	-10485	-10600	-10450	-10512	78,48
150	675	600	800	692	101,04
200	9055	9225	9000	9093	117,30

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a un promedio de áreas:

r = 0,9986

b = 224,77

a = (– 6096,7)

y = 197,82x-29945

para y = 0; x = -29945 ; se toma este dato como estimación de Y_b

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a desviación estándar:

r = 0,9942

b = 0,4385

a = 32,323

y = 0,4385x + 32,323

para y = 0; x = 32,323 ; se toma este dato como estimación de S_b

x = -29945 + 3 * 32,323

= -29848,031

y =197,82x - 29945

x = -29848,031 + 29945/197,82

= 0,4902 ug/kg, como límite de detección.

x = -29945 + 10 * 32,323

= -29621,77

y =197,82x – 29945

x = -29621,77 + 29945/197,82

= 1,6339 ug/kg, como límite de cuantificación.

Por lo tanto el Límite de Detección para el Fluoranteno es 0,49 ug/kg.

Por lo tanto el Límite de Cuantificación para el Fluoranteno es 1,63 ug/kg.

Tabla C. 1-3 Límite de Detección y Cuantificación para Antraceno

Concentración (ug/L)	Áreas inyección 1	Áreas inyección 2	Áreas inyección 3	Promedio áreas	D. estándar
50	-50293	-50500	-50400	-50398	103,52
100	-38688	-38600	-38900	-38729	154,21
150	-27083	-27200	-26800	-27028	205,66
200	15477	15500	15000	15326	282,27

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a un promedio de áreas:

r = 0,9409

b = 417,74

a = -77425

y = 417,74x-77425

para y = 0; x = -77425 ; se toma este dato como estimación de Y_b

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a desviación estándar:

r = 0,9943

b = 1,1754

a = 39,491

y = 1,1754x + 39,491

para y = 0; x = 39,491; se toma este dato como estimación de S_b

x = -77425 + 3 * 39,491

= -77306,527

y = 417,74x - 77425

x = -77306,527 + 77425/417,74

= 0,2836 ug/kg, como límite de detección.

x = -77425 + 10 * 39,491

= -77030,09

y =197,82x – 29945

x = -77030,09 + 77425/417,74

= 0,9453 ug/kg, como límite de cuantificación.

Por lo tanto el Límite de Detección para el Antraceno es 0,28 ppb.

Por lo tanto el Límite de Cuantificación para el Antraceno es 0,94 ppb.

Tabla C. 1-4 Límite de Detección y Cuantificación para Pireno

Concentración (ug/L)	Áreas inyección 1	Áreas inyección 2	Áreas inyección 3	Promedio áreas	D. estándar

50	-21725	-21750	-21670	-21715	40,83
100	-11302	-11400	-11290	-11330,7	60,34
150	879	780	950	869,7	85,38
200	9544	9755	9545	9614,7	121,53

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a un promedio de áreas:

r = 0,9982

b = 212,38

a = -32188

y = 212,38 x -32188

para y = 0; x = -32188 ; se toma este dato como estimación de Y_b

Ecuación de regresión lineal, concentración frente a desviación estándar:

r = 0.9901

b = 0.5337

a = 10,332

y = 0,5337x + 10,332

para y = 0; x = 10,332; se toma este dato como estimación de S_b

x = -32188 + 3 * 10,332

= -32157,004

y = 212,38x - 32188

x = -32157,004 + 32188/212,38

= 0,1459 ug/kg, como límite de detección.

x = -32188 + 10 * 10,332

= -32084,68

y = 212,38x – 32188

x = -32084,68 + 32188/212,38

= 0,4865 ug/kg, como límite de cuantificación.

Por lo tanto el Límite de Detección para el Pireno es 0,15 ppb.

Por lo tanto el Límite de Cuantificación para el Pireno es 0,49 ppb.

Anexo D: Tabla resultados

Cálculos muestras problemas

D.1. Fenantreno

-Regresión lineal

$$Y = 225{,}76x-6200$$
$$582345 = 225{,}76x-6200$$

$$X = 2606{,}949858 \text{ ug}$$

-Cambio de unidad

2606,95 ug /1000 =

2,60695 ug/Kg

2,61 ug/Kg

D.2. Fluoranteno

-Regresión lineal

$$y = 194{,}55x – 29855$$
$$126038 = 194{,}55x – 29855$$

$$X = 801{,}3004369 \text{ ug}$$

-Cambio de unidad

801,30ug / 1000 =

0,8013 ug/Kg

0,80 ug/Kg

D.3. Antraceno

-Regresión lineal

$$y = 232{,}11x - 61899$$
$$63161 = 232{,}11x - 61899$$

$$x = 538{,}7962604 \text{ ug}$$

-Cambio de unidad

538,79 ug /1000 =

0,53879626 ug/Kg

0.54 ug/Kg

D.2. Fluoranteno

-Regresión lineal

$$y = 208{,}46x - 32148$$
$$110751 = 208{,}46x - 32148$$

$$x = 685{,}498417$$

-Cambio de unidad

685,49 ug /1000 =

0,68549 ug/Kg

0.69 ug/Kg