

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA GC-ECD Y GC-MS PARA LA
CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS
PROCESADOS A ALTAS TEMPERATURAS.**

LIGIA MARÍA OCHOA HERRERA

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE QUIMICA
LABORATORIO DE CROMATOGRFÍA
BUCARAMANGA**

2011

**IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA GC-ECD Y GC-MS PARA LA
CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS
PROCESADOS A ALTAS TEMPERATURAS.**

LIGIA MARÍA OCHOA HERRERA

Trabajo de grado entregado como requisito para optar el título de Químico,
dirigido por:

ELENA E. STASHENKO, Química, Ph D.

JAIRO RENÉ MARTÍNEZ, Químico, Ph D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA DE QUIMICA

LABORATORIO DE CROMATOGRAFÍA

BUCARAMANGA

2011

*Esto es fruto de tus esfuerzos,
gracias por brindarme la vida y todo tu amor,
te amo mamá.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A Miriam Herrera mi madre por su amor, confianza y apoyo en todas las etapas de mi vida, por ser mi motor y mi guía.

A mi tía Lidia y mi hermanita Angie, por su apoyo incondicional y comprensión.

A la familia Ochoa Rincón por recibirme en su casa y acogerme como un miembro más de la familia, en especial a mi tía Beatriz por su cariño, sus risas, sus consejos y sus enseñanzas.

A mi papá, a Betu, a Varo, a Lois y Pipe por su apoyo y cariño.

A mi tía Isi y mi tío Jose, por su comprensión y apoyo incondicional.

A Jaimito, por ser el hermano mayor que nunca tuve.

A Leidy y Elunith por ser mis mejores amigas, mis primas, mis hermanas.

A toda la familia Ochoa por acogerme y hacerme sentir parte de la familia.

A toda la familia Herrera, por ser tíos, papás, primos, hermanos, y ser todo para mí.

Al Laboratorio de Cromatografía, la doctora Elena Stashenko, el doctor Jairo Martínez, por brindarme la oportunidad de aprender a hacer química.

A William y Deyanira por ser guías de este proyecto.

A Vanessa, Eva, Laura, Diego, Cesar y Piru, por todas las tardes de estudio.

A Mónica, Alejandra, Katherine, Alexandra y Andrés por aguantarme en el laboratorio.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	16
1. ESTADO DEL ARTE	18
1.1. Acrilamida	18
1.1.1. Mecanismos de producción de acrilamida en los alimentos.	19
1.1.2. Rutas para la metabolización de la acrilamida	23
1.1.3. Efectos toxicológicos	24
1.2. Alimentos en donde se produce acrilamida	26
1.2.1. La papa	27
1.2.2. La yuca	27
1.2.3. El plátano	28
1.3. Metodologías reportadas para el análisis de acrilamida	28
1.3.1. Método US EPA	28
1.3.2. Sistemas de detección empleados con cromatografía de gases para el análisis de acrilamida.	29
1.3.3. Otras técnicas	30
1.4. Antecedentes	30
2. DESARROLLO EXPERIMENTAL	34
2.1. Preparación del derivado 2,3-dibromopropionamida.	34
2.1.1. Reactivos, solventes y material de referencia certificado.	34
2.1.2. Muestras de alimentos.	34
2.1.3. Metodología de síntesis.	34
2.2. Conversión de 2,3-dibromopropionamida a 2-bromopropenamida.	36
2.3. Ajuste de los parámetros cromatográficos.	36
2.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría	36

	de masas.	
	2.3.2. Cromatografía de gases con detector de micro-captura de electrones.	36
2.4.	Extracción del analito de la matriz de las muestras de alimentos.	38
	2.4.1. Diseño de experimentos 2 ³ .	38
2.5.	Determinación de las figuras de mérito del método.	39
	2.5.1. Determinación del nivel mínimo de detección y de cuantificación.	40
	2.5.2. Determinación del rango dinámico lineal.	41
	2.5.3. Precisión.	41
	2.5.4. Exactitud.	41
3.	ANÁLISIS DE RESULTADOS	42
3.1.	Obtención del derivado 2,3-dibromopropionamida.	42
	3.1.1. Determinación de la relación molar.	42
	3.1.2. Caracterización de la 2,3-dibromopropionamida.	43
	3.1.3. Inestabilidad de la 2,3-DBPA.	46
3.2.	Obtención del producto de eliminación 2-bromopropenamida.	47
	3.2.1. Determinación de la relación molar y del tiempo de reacción.	48
	3.2.2. Caracterización de la 2-bromopropenamida.	50
3.3.	Determinación de las mejores condiciones para la extracción del analito de la matriz de las muestras.	53
3.4.	Determinación de las figuras analíticas de merito.	56
	3.4.1. Determinación del nivel mínimo de detección y de cuantificación.	57
	3.4.2. Determinación del rango dinámico lineal.	57
	3.4.3. Evaluación de la precisión como repetibilidad de áreas.	58

3.4.4. Evaluación de la exactitud como porcentaje de recuperación	59
3.5. Determinación de acrilamida en muestras reales.	59
4. CONCLUSIONES	62
5. RECOMENDACIONES	64
BIBLIOGRAFIA	65
ANEXOS	68
Anexo A. Propiedades físico- químicas de la AA.	68
Anexo B. Análisis cuantitativo, usando la Base de Datos <i>Web of Science</i> (<i>ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0</i>) Periodo de observación: 2001-2011.	69
Anexo C. Relación de fabricantes y lotes de los solventes, los reactivos y el material de referencia utilizados en el presente trabajo.	70
Anexo D. Propiedades físicas del compuesto 2,3-dibromopropionamida.	70

ABREVIATURAS

AA	<i>Acilamida</i>
ANOVA	<i>Análisis de varianza</i>
2-BPA	<i>2-Bromopropenamida</i>
CIP/FAO	<i>Comité internacional de planeación para la organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación</i>
DAD	<i>Detector de arreglo de diodos</i>
2,3-DBPA	<i>2,3-Dibromopropionamida</i>
U.S. EPA	<i>U.S. Environmental Protection Agency</i>
GC-ECD	<i>Cromatografía de gases con detector de captura de electrones</i>
GC-MS	<i>Cromatografía de gases con detector selectivo de masas</i>
IARC	<i>Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer</i>
IR	<i>Infrarrojo</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LC-MS	<i>Cromatografía líquida con detector selectivo de masas</i>
LC-MS/MS	<i>Cromatografía líquida con detector selectivo de masa tandem</i>
LD₅₀	<i>Dosis letal media</i>
NAOEL	<i>Límite de no presencia de efectos adversos</i>
NMC	<i>Nivel mínimo de cuantificación</i>
NMD	<i>Nivel mínimo de detección</i>
OMS	<i>Organización mundial de la salud</i>
SNC	<i>Sistema nervioso central</i>
SNFA	<i>Swedish National Food Administration</i>
SPE/HPLC/UV	<i>Extracción en fase sólida, cromatografía líquida de altas presiones con detector de ultravioleta</i>
TEA	<i>Trietilamina</i>
TLC	<i>Cromatografía en capa fina</i>
UV	<i>Ultravioleta</i>

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.	Estructura de la acrilamida.	18
Figura 2.	Posibles mecanismos de la formación de la acrilamida en los alimentos	21
Figura 3.	Mecanismo de formación de acrilamida propuesto por David V. Zyzak y colaboradores, a partir de asparagina y un grupo carbonilo (carbohidrato en forma de hemiacetal).	22
Figura 4.	Rutas metabólicas de la acrilamida, según evidencias encontradas en orina humana y en ratas por Kopp y Dekant.	23
Figura 5.	Publicaciones registradas por año en la base de datos <i>Web of Science</i> . (Ecuación 1: <i>topic=determination and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 2: <i>topic=quantification and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 3: <i>topic=gas chromatography and topic=acrylamide; topic=food and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 4: <i>topic=food and topic=acrylamide</i>), fecha de consulta: Junio-17 de 2011, período de observación: 2001-2011.	31
Figura 6.	Publicaciones registradas por países en la base de datos <i>Web of Science</i> . (Ecuación 1: <i>topic=determination and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 2: <i>topic=quantification and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 3: <i>topic=gas chromatography and topic=acrylamide; topic=food and topic=acrylamide</i> ; Ecuación 4: <i>topic=food and topic=acrylamide</i>), período de observación: 2001-2011, fecha de consulta: Junio 17 de 2011.	32
Figura 7.	Montaje utilizado en la síntesis del derivado 2,3-dibromopropionamida.	35
Figura 8.	Representación gráfica del diseño factorial 2^3 .	39

Figura 9.	Mecanismo de la doble adición de bromo al doble enlace de la acrilamida.	42
Figura 10.	Gráfica de la relación molar <i>versus</i> área de pico cromatográfico, para la formación de la 2,3-DBPA.	43
Figura 11.	Espectros IR de: A. 2,3-Dibromopropionamida, B. Acrilamida.	44
Figura 12.	Espectro de masas del 2,3-dibromopropionamida.	45
Figura 13.	Posibles rutas de formación de iones fragmento en el espectro de masas del compuesto 2,3-DBPA.	46
Figura 14.	Cromatograma del compuesto 2,3-DBPA que muestra su inestabilidad en el sistema cromatográfico. <u>1.</u> 2-BPA y <u>2.</u> 2,3-DBPA.	47
Figura 15.	Mecanismo de la eliminación de bromo de la molécula 2,3-DBPA.	48
Figura 16.	Relación molar <i>versus</i> área de pico cromatográfico, de la molécula 2-BPA.	49
Figura 17.	Tiempo de agitación <i>versus</i> área de pico cromatográfico, del compuesto 2-BPA.	50
Figura 18.	Espectros IR de: A. 2-Bromopropenamida, B. 2,3-Dibromopropionamida.	51
Figura 19.	Espectro de masas de la 2-bromopropenamida.	52
Figura 20.	Posibles rutas de formación de iones fragmento en el espectro de masa del compuesto 2-BPA.	53
Figura 21.	Gráfico de Pareto para el área cromatográfica del compuesto 2-BPA por GC-ECD.	54
Figura 22.	A. Gráfica de efectos principales y B. Gráfica de las interacciones para el área cromatográfica.	55
Figura 23.	Comparación de cromatogramas de (1) una muestra real (azul) y (2) una solución de BPA de referencia (rojo), GC-ECD. Columna DB-WF	60

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.	Niveles permisibles de acrilamida en productos de consumo como alimentos y agua, dosis letal media en ratas y conejos y niveles de no aparición de efectos adversos.	25
Tabla 2.	Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de acrilamida por GC- μ -ECD y GC-MSD.	37
Tabla 3.	Variables y niveles en el diseño de experimentos, 2 ³ .	38
Tabla 4.	Combinaciones de las 3 variables en el diseño de experimentos empleado en este estudio.	39
Tabla 5.	Curva de calibración.	40
Tabla 6.	Análisis de la varianza para el área cromatográfica del compuesto 2-BPA por GC-ECD.	54
Tabla 7.	Mejores condiciones encontradas para la extracción de la acrilamida de la matriz de las muestras de alimentos.	56
Tabla 8.	Nivel mínimo de detección y de cuantificación de la acrilamida (como 2-BPA) por GC-ECD.	57
Tabla 9.	Linealidad del método por GC-ECD, para 2-BPA.	58
Tabla 10.	Repetibilidad de áreas para el 2-BPA por GC-ECD.	58
Tabla 11.	Porcentaje de recuperación del 2-BPA en las muestras de alimentos empacados.	59
Tabla 12.	Concentración estimada de acrilamida en muestras reales.	60

RESUMEN

TÍTULO: IMPLEMENTACIÓN DE UNA METODOLOGÍA GC-ECD Y GC-MS PARA LA CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS PROCESADOS A ALTAS TEMPERATURAS*.

Autor: OCHOA HERRERA, Ligia María**

Palabras claves: acrilamida, adición de bromo, papas fritas, yucas fritas, plátanos fritos, GC-ECD, GC-MS.

La acrilamida es un bioproducto del procesamiento de los alimentos ricos en carbohidratos y pobres en proteínas a temperaturas mayores a 120°C, la reacción de formación de la acrilamida en los alimentos es conocida como reacción de *Maillard*; su metabolito principal glicidamida es un epóxido con acción genotóxica conocida. A la acrilamida la IARC la clasifica como probablemente cancerígena para humanos en la categoría 2A, y su formación en alimentos es conocida desde el 2002, así como su acción neurotóxica y genotóxica.

Las metodologías analíticas utilizadas incluyen la formación del producto de adición de bromo 2,3-dibromopropionamida para el análisis por GC-ECD (EPA, Método 8032A); En este trabajo se implementó la metodología analítica por GC-ECD y GC-MS para el análisis de acrilamida en alimentos fritos empacados procedentes del mercado local. Para ello, se realizó la bromación de la acrilamida a pH entre 0-3, con agua saturada de bromo y KBr en exceso, el producto de reacción, 2,3-dibromopropionamida, se caracterizó y se indujo la eliminación de un bromo con trietilamina, para obtener el compuesto monobromado, 2-bromopropenamida.

Además, se determinaron las condiciones de extracción en las muestras con un diseño de experimentos 2³, obteniendo que la extracción fuera sin adición de sal, ni utilización de ultrasonido y con agua a 60°C. Por último, se calcularon las figuras analíticas de mérito, como los niveles mínimos de cuantificación y de detección (4,6 y 9,2 µg/kg respectivamente), el rango dinámico lineal (25-1000 µg/mL), la precisión (RSD 7% para las áreas) y la exactitud del método (porcentaje de recuperación de 64%), teniéndose como resultados valores aceptables por las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Para finalizar, se evaluaron cuatro muestras de alimentos fritos empacados de papa, yuca y plátano, encontrándose valores entre 12 y 22 µg/kg, con una SD <1. El valor mayor fue encontrado en papas caseras empacadas.

* Proyecto de grado

**Facultad de ciencias. Escuela de Química. Directores: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez

ABSTRACT

TITLE: IMPLEMENTATION OF A METHODOLOGY GC-ECD AND GC-MS FOR QUANTIFICATION AND DETERMINATION OF ACRYLAMIDE IN FOODS PROCESSED AT HIGH TEMPERATURES*.

Author: OCHOA HERRERA, Ligia María**

Keywords: acrylamide, addition of bromine, chips, cassava chips, fried bananas, GC-ECD, GC-MS.

Acrylamide is a bio-product of processing of food rich in carbohydrates and low in protein to temperatures above 120°C, the reaction of acrylamide formation in food is known as the *Maillard* reaction; its major metabolite is an epoxide glycidamide with known genotoxic. the acrylamide is classified by the IARC, as probably carcinogenic for humans in category 2A, and its formation in food is known since 2002, and its neurotoxic and genotoxic action.

The analytical methodology used include the formation of bromine addition product of 2,3-dibromopropionamide for analysis by GC-ECD (EPA Method8032A); considering this, with this work, was implemented analytical methodology by GC-ECD and GC-MS for the analysis of acrylamide in fried foods packaged from the local market. For this, we performed the bromination of acrylamide at pH between 0-3, with water saturated with bromine and KBr in excess, the reaction product, 2,3-dibromopropionamide, was characterized and induced the elimination of a bromine with triethylamine to obtain compound monobrominated, 2-bromopropenamide.

Also, were determined the conditions of extraction in the samples with a design of experiments 2³, the extraction was obtained without added salt, without ultrasound and with water at 60 ° C. Ultimately, were calculated the analytical figures of merit such as minimum levels of detection and quantification (4.6 and 9.2 µg / kg respectively), the linear dynamic range (25-1000 µg / mL), the precision (7% RSD for areas) and the accuracy of the method (recovery rate of 64%.), taking as a result acceptable values for Good Laboratory Practice.

Finally, were tested four samples of packaged foods fried potatoes, cassava and banana, finding values between 12 and 22 µg / kg, with an SD of duplicate samples <1. The higher value was found in packed home fries, while packaged products recorded lower values of this compound.

* Graduation Project

**Science Faculty. School of Chemistry. Directors: Elena E. Stashenko y Jairo R. Martínez

INTRODUCCIÓN

La química analítica en sus avances incluye la implementación de metodologías sofisticadas para la determinación y análisis de compuestos que pueden ser perjudiciales para el ambiente y para la salud humana, los cuales aparecen como producto de contaminación y fuentes externas en matrices como alimentos, aguas, aceites, entre otras.

Como parte de los compuestos que se producen en el proceso de cocción de los alimentos y que pueden ser perjudiciales para la salud, se encuentra la acrilamida. Es una amida de bajo peso molecular y se produce durante la cocción a temperaturas mayores de 120°C de alimentos ricos en carbohidratos. Según la *Organización Mundial de la Salud* (OMS) se presume que esta amida puede afectar el sistema nervioso central y se encuentra categorizada como posible cancerígeno, con una ingesta crónica permitida de 1 µg/kg de peso/día; mientras que estudios en países europeos y asiáticos muestran que la cantidad de acrilamida en alimentos de consumo diario supera, en algunos casos, los 1000 µg/kg [28].

En Colombia, no se registra una metodología analítica implementada para la determinación de acrilamida en alimentos procesados a altas temperaturas en laboratorios de ensayo o calibración, que estén acreditados por la *Superintendencia de Industria y Comercio* [7] o por el *Organismo Nacional de Acreditación*. Por ello, el Laboratorio de Cromatografía de la *Universidad Industrial de Santander*, a través de este trabajo, se propuso implementar una metodología analítica adecuada y reproducible que permitiera la determinación de acrilamida en productos alimenticios empacados nacionales. El método incluye el análisis cuantitativo por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD) y el análisis confirmatorio por cromatografía de gases con detector selectivo de masas (GC-MS), basados en la metodología presentada por U.S.

EPA para la determinación de acrilamida en muestras acuosas y en algunos artículos publicados en revistas científicas en los últimos años.

Para ello, se realizó la síntesis y caracterización, por medios espectroscópicos y espectrométricos, de los productos de la acrilamida, por adición de bromo, i.e., 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA) y 2-bromopropenamida (2-BPA). Este último se utilizó como estándar externo para la cuantificación y la determinación de las figuras analíticas de mérito, para el método por GC-ECD.

Se estudiaron alimentos ricos en carbohidratos, a base de papa, yuca y plátano, y preparados por fritura, empacados y comercializados ampliamente en el país, y producidos por diferentes industrias. Estos productos se caracterizan por su bajo contenido de proteínas.

Para establecer la metodología adecuada para la preparación de las muestras, se utilizó un diseño de experimentos factorial, el cual a través de métodos estadísticos mostró las condiciones óptimas para obtener la mayor recuperación de analito de las muestras; se realizó la evaluación de los efectos de la combinación de tres variables que, según la literatura científica, podrían tener influencia en el proceso de extracción.

También se evaluaron las figuras analíticas de mérito, entre ellas, el nivel mínimo de detección (NMD), el nivel mínimo de cuantificación (NMC), el rango dinámico lineal, la precisión, como repetibilidad de áreas, y la exactitud, como porcentaje de recuperación, mediante la realización de una curva de calibración por el método de estándar externo.

Por último, se aplicó la metodología a las matrices seleccionadas y obtenidas del mercado local, con lo cual se obtuvo un estimado de los niveles de acrilamida en alimentos de alto consumo en el país.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1. Acrilamida

La acrilamida (AA) es un producto químico intermedio que ha estado disponible comercialmente desde mediados de la década de los 50. Industrialmente se han utilizado para su preparación reacciones del acrilonitrilo¹ con ácido sulfúrico, hidrogenación catalítica con cobre e hidratación enzimática empleando biocatalizadores [11]. La AA es utilizada como el monómero principal en la síntesis de poliacrilamidas; este polímero se emplea como floculante en el tratamiento del agua potable, en el procesamiento de la pulpa de papel, como aditivo en cosméticos, como acondicionadores de suelos y en el tratamiento de minerales [26]. Su nombre, según las reglas IUPAC, es 2-propenamida. Su estructura, que se presenta en la **Figura 1**, corresponde a una amida primaria de bajo peso molecular, soluble en agua y estable a temperatura ambiente, pero que se polimeriza a temperaturas cercanas a las del punto de fusión a 84,5°C (véase otras propiedades físicas y químicas en el **Anexo A**).

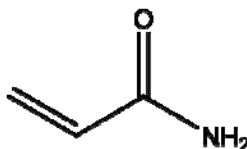


Figura 1. Estructura de la acrilamida.

Esta amida es un producto químico del procesado de los alimentos ricos en carbohidratos, debido a que se genera durante su cocción, cuando éstos se exponen a altas temperaturas (superiores a 120 °C), ya sea por fritura, tostado y horneado [22]. En el 2002, la *Swedish National Food Administration* (SNFA) y la Universidad de Estocolmo, anunciaron que la mayoría de alimentos procesados o cocidos a altas temperaturas contienen altos niveles de AA, luego de encontrar el origen de los aductos entre acrilamida y moléculas *N*-terminales de la

¹ Nitrilo sintético estructuralmente asociado con la acrilamida empleado en la fabricación del plástico, gomas sintéticas y el acrílico.

hemoglobina presentes en personas sin exposición conocida al monómero, sólo por la alimentación [29, 9].

En los experimentos con ratas de laboratorio, la acrilamida mostró una potencia similar a otros agentes cancerígenos conocidos, que se forman al cocinar, como ciertos hidrocarburos que se generan en la carne frita o a la plancha. Por ello, la OMS reconoce que la presencia de la acrilamida en los alimentos es un importante problema que ha sido de gran interés científico, puesto que es necesaria la determinación de sus niveles en los alimentos que se consumen diariamente, por toda la población.

Cabe resaltar, que estudios y observaciones en animales y humanos revelan que la alta reactividad de la acrilamida causa una variedad de efectos nocivos serios que están asociados con su acción neurotóxica [22]. Muchas entidades la clasifican en categorías altas de toxicidad, por ser probablemente cancerígena; como la *Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer* (IARC) que la ubica desde 1994 en el grupo 2A [11] y la Unión Europea en la categoría 2 [22]; esta última también, la ha clasificado por su acción como mutágeno y por tóxica para la reproducción, en la categoría 2 y 3, respectivamente [22].

1.1.1. Mecanismos de producción de acrilamida en los alimentos.

Es probable que el mecanismo de formación de la acrilamida en los alimentos incluya muchas reacciones dependiendo de la composición y las condiciones de procesamiento de los mismos. Sin embargo, éste está determinado por algunos factores importantes como [22, 21, 25, 32]:

- El contenido de agua. Debido a que la evaporación de agua es endotérmica, lo que evita que al interior del alimento se alcancen temperaturas mayores que la temperatura de ebullición del agua, se previene así la formación de acrilamida. Es por ello, que se considera que la acrilamida se forma en la superficie,

puesto que en estas zonas la temperatura se eleva rápidamente debido a la disminución de la humedad [22, 12].

- Contenido de azúcares reductores y aminoácidos libres. Debido a que estos compuestos son los precursores de la acrilamida, principalmente D-fructosa, D-glucosa y asparagina (no se relacionan otros aminoácidos).
- pH. El contenido de acrilamida aumenta con el aumento del pH (matrices neutras o básicas), así la producción de acrilamida disminuye en matrices acidificadas puesto que se acelera su degradación.
- Temperatura de calentamiento y tiempo de calentamiento. El límite inferior para la formación de acrilamida es de 120 °C. Su contenido crece exponencialmente en los primeros minutos de calentamiento a temperatura constante; cuando éste es prolongado, la AA se degrada, reduciéndose así su contenido en el alimento. Entonces, existen dos procesos que compiten y dependen de la temperatura y el tiempo de cocción: a temperaturas por encima de 120 °C y tiempos cortos predomina la formación de AA, mientras que a tiempos prolongados de cocción predomina la degradación de AA.

Cumpliendo los anteriores factores, la acrilamida se puede producir por diferentes mecanismos debido al calentamiento, los cuales incluyen reacciones de carbohidratos, proteínas, aminoácidos libres y lípidos. Las rutas posibles (**Figura 2**) pueden ser: **1.** Vía (a) acroleína o (b) ácido acrílico proveniente de la degradación de lípidos, que reacciona con el amoníaco producido a partir de aminoácidos como la asparagina, por medio de la degradación de Strecker. **2.** Vía la deshidratación/decarboxilación de ciertos ácidos orgánicos como (c) ácido málico, (d) ácido láctico y (e) ácido cítrico. **3.** Formación directa de aminoácidos, que puede ser por calentamiento a 180 °C de la (f) asparagina o de la glutamina (degradación térmica), o por reacción de estos aminoácidos con un azúcar reductor (g, reacción de *Maillard*) [28, 22].

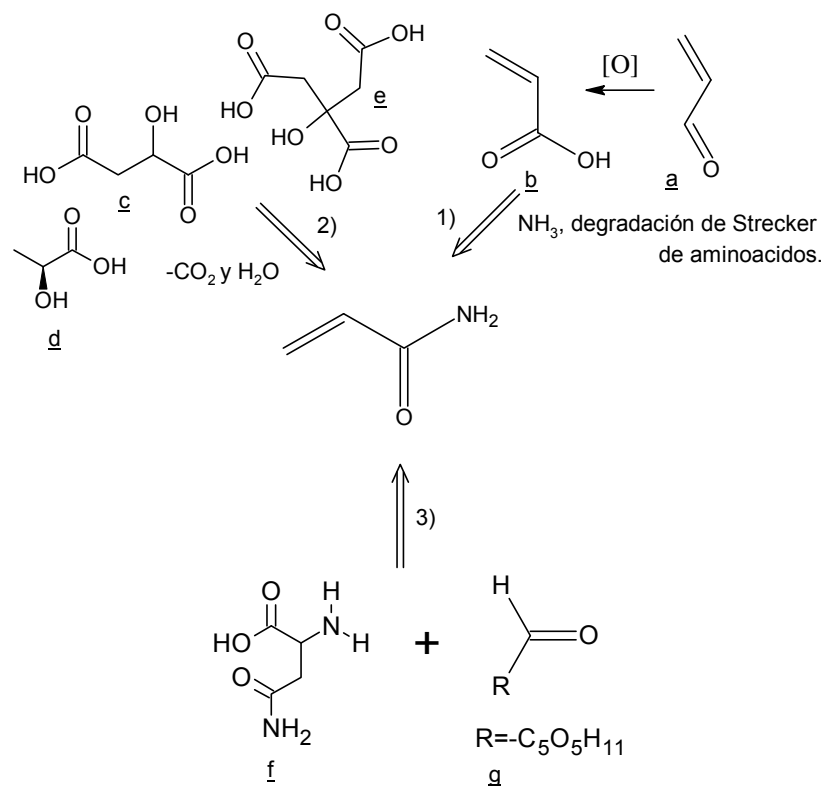


Figura 2. Posibles mecanismos de la formación de la acrilamida en los alimentos [28, 22].

Según *David V. Zyzak* y colaboradores [32], el mecanismo de formación de la acrilamida inicia por la ruta conocida como reacción de *Maillard*² (**Figura 3**), donde el (f) aminoácido asparagina y un compuesto que contenga un grupo carbonilo, generalmente un (g) carbohidrato, ambos presentes de forma natural en la mayoría de alimentos, deben estar expuestos a las temperaturas típicas de cocción; el mecanismo incluye la formación de una (h) base de *Schiff* y su posterior descarboxilación y eliminación de amoníaco o de un sustituyente imino. Los compuestos que proporcionan el grupo carbonilo en el caso de los alimentos son carbohidratos en forma hemiacetal. El primer paso es la formación de la base de *Schiff* por reacción entre el carbonilo y el grupo α -amino de la asparagina; en el proceso se elimina una molécula de agua. El segundo paso es la descarboxilación

² Técnicamente conocida como glicación no enzimática de proteínas; investigación realizada por Louis-Camille Maillard a principios del siglo XX [11].

de la base de *Schiff*, para la formación del equilibrio resonante entre dos (i) estructuras iónicas, una de ellas, con una molécula de agua forma un (j) aldehído y (k) 3-aminopropionamida, la cual, por eliminación de amoniaco, llega a la acrilamida. Por su parte, la otra estructura resonante llega directamente a acrilamida por eliminación de un (l) compuesto imino. Este mecanismo es el más aceptado por la comunidad científica debido a que se ha demostrado que existe una relación directa entre el contenido de acrilamida en los alimentos y la cantidad de azúcares reductores en el mismo [25].

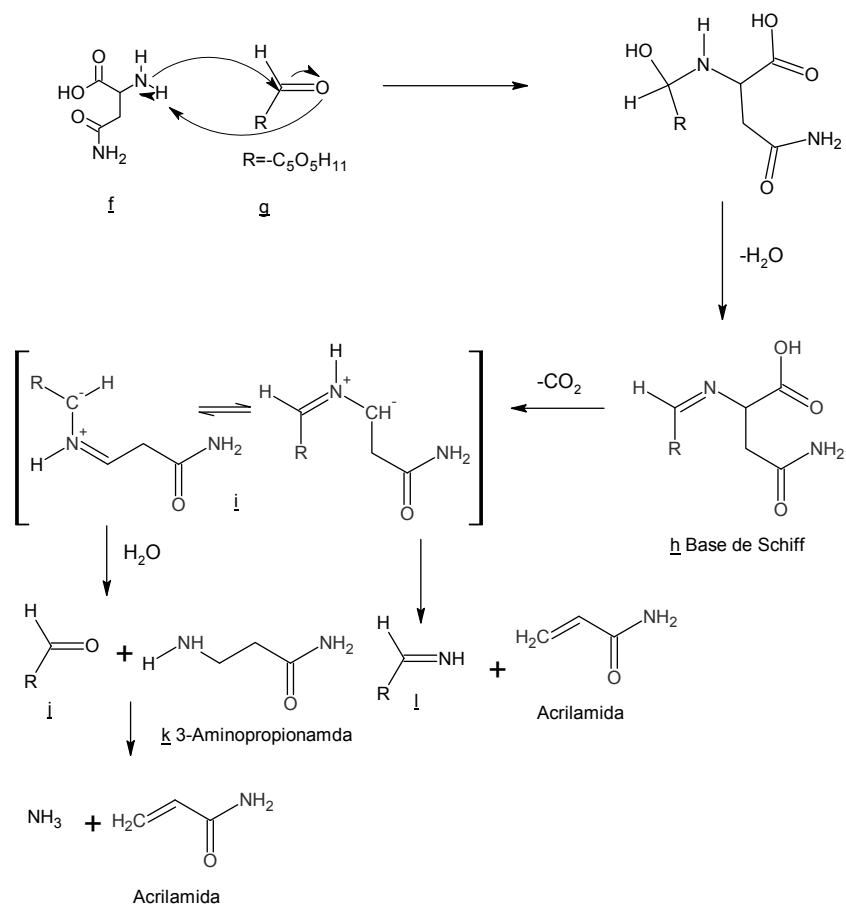


Figura 3. Mecanismo de formación de acrilamida propuesto por David V. Zyzak y colaboradores [32], a partir de asparagina y un grupo carbonilo (carbohidrato en forma de hemiacetal).

1.1.2. Rutas de la metabolización de la acrilamida

La acrilamida, una vez ingresa al organismo, puede ser metabolizada por dos vías diferentes (**Figura 4**) a saber: 1. Oxidación mediada por la enzima CYP2E1 del citocromo P450; 2. Conjugación con glutatión, degradación por transpeptidasas y N-acetilación. En el primer caso, se forma el metabolito principal conocido como glicidamida, al que se le atribuyen propiedades cancerígenas y que reacciona fácilmente con fragmentos de ADN, siendo genotóxico; la glicidamida, por su parte, puede ser metabolizada siguiendo dos rutas: a. Formación del epóxido por acción de la enzima hidrolasa o b. Conjugación con glutatión, degradación por transpeptidasas y N-acetilación para la formación de los dos ácidos mercaptúricos *rac-N-acetil-S-(2-carbamoil-2-hidroxietyl)-L-cisteína* (GAMA) y *rac-N-acetil-S-(1-carbamoil-2-hidroxietyl)-L-cisteína* (iso-GAMA). En el segundo caso, se produce el ácido mercaptúrico *N-acetil-S-(2-carbamoiletyl)-L-cisteína* (AAMA) y su sulfóxido AAMA-SO [19].

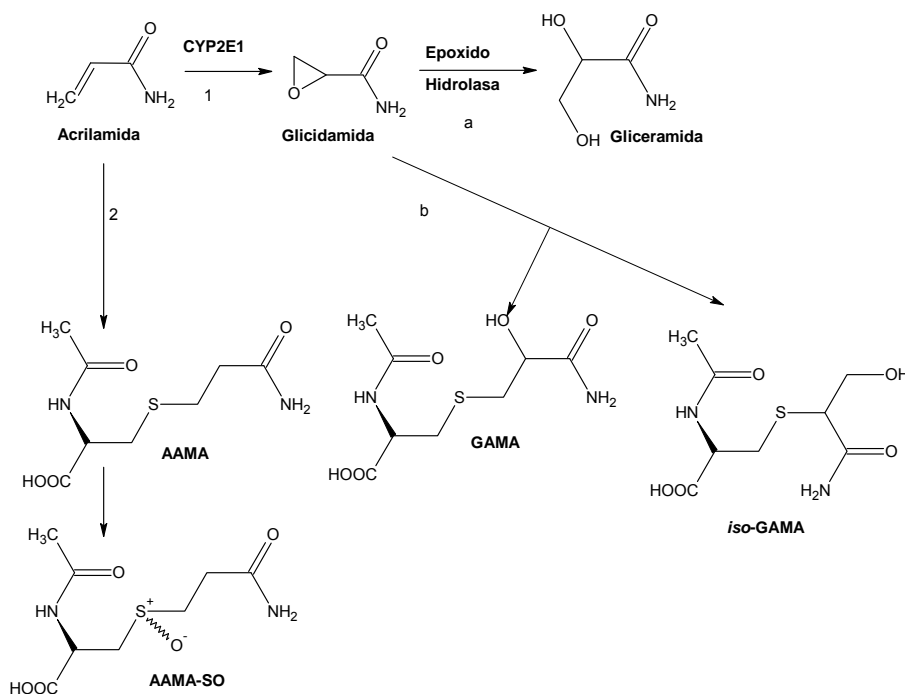


Figura 4. Rutas metabólicas de la acrilamida, según evidencias encontradas en orina humana y en ratas por Kopp y Dekant. [19]

La duración del metabolismo o la vida media de la acrilamida y de su metabolito principal, glicidamida, es corta (unas pocas horas), aunque no es completa, pues un pequeño porcentaje permanece en los tejidos durante algunas semanas. En ratas de laboratorio se ha calculado un tiempo de vida media de aproximadamente dos horas para casos donde la administración es oral (dosis repetida y única); sin embargo, en humanos la estimación del tiempo de vida media de estas moléculas se ha hecho con grupos de personas sanas voluntarias, que fueron expuestos a la acrilamida. Estos estudios han conducido a que este tiempo varía desde dos hasta siete horas; además, se han encontrado aductos de AA con hemoglobina en sangre de mujeres embarazadas y en la de sus fetos, lo que indica que existe paso xenobiótico³ a través de la placenta [22].

1.1.3. Efectos toxicológicos

Experimentalmente, a la acrilamida se le han atribuido propiedades cancerígenas, principalmente, debido a que estudios con ratas de laboratorio han arrojado resultados importantes. Por ejemplo, las ratas tratadas con acrilamida desarrollan tumores en los testículos, glándulas adrenales y mamarias, en la tiroides, en el cerebro, en la medula espinal y en otros tejidos [22]; es por ello que la IARC de la OMS, la ha clasificado como “*probablemente cancerígena para el hombre*” (Grupo 2A) [11]. Sin embargo, no existen datos que permitan extrapolar a los humanos estos descubrimientos hechos en ratas [12].

La acrilamida produce mutaciones genéticas y alteraciones cromosómicas en células somáticas y germinales cultivadas *in vitro*. También ha dado resultados positivos en estudios de genotoxicidad *in vivo*. En estudios llevados a cabo en linfocitos humanos expuestos a acrilamida, se observó que ésta puede ejercer un amplio espectro de efectos adversos sobre el ADN de células normales, como modificaciones en sus bases y apoptosis [22]. Sin embargo, la acción genotóxica

³ Difusión de compuestos de naturaleza externa a la del organismo, como resultado de su proceso metabólico.

está relacionada directamente con su metabolito principal glicidamida que origina aductos con ADN [26].

Por su parte el mayor riesgo en humanos es la neurotoxicidad de la acrilamida puesto que la exposición prolongada a este monómero provoca cambios en el sistema nervioso central (SNC) y neuropatía periférica [12]. Esta acción se le atribuye a la naturaleza hidrofílica de la acrilamida que sugiere la formación de aductos neurotóxicos con grupos nucleofílicos, que posee la guanina o los grupos sulfídricos. Los mecanismos por los que la AA ejercería sus efectos neurotóxicos, son la inhibición del transporte quínésico axonal rápido, por fusión de las membranas afectadas y, por tanto, la inhibición de la neurotransmisión, por acción directa sobre el nervio terminal [22].

En la **Tabla 1** se muestran los niveles permisibles para la ingesta de acrilamida en alimentos, según la OMS, además de los límites permitidos en agua potable de consumo para los Estados Unidos y para la Unión Europea, los cuales son comparables con las dosis letal media (LD_{50}) encontrada para ratas, en forma oral, y para conejos, por contacto con la piel; también los niveles de no aparición de efectos adversos (NAOEL) para neuropatía, para efectos en la fertilidad y para mesoteliomas testiculares y fibroadenomas de las glándulas mamarias [28, 22].

Tabla 1. Niveles permisibles de acrilamida en productos de consumo como alimentos y agua, dosis letal media en ratas y conejos y niveles de no aparición de efectos adversos.

Ítem	Cantidad
Ingesta crónica permitida	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día
Límite en agua potable (EE.UU.)	0,5 $\mu\text{g}/\text{L}$
Límite en agua potable (Unión Europea)	0,1 $\mu\text{g}/\text{L}$
LD_{50} (ratas, en forma oral)	124 mg/kg

LD₅₀ (conejos, por contacto con la piel)	1680 µL/kg
NAOEL (para neuropatía)	0.5-1.0 mg/kg de peso/día
NAOEL (para efectos en la fertilidad)	2 mg/kg de peso/día
NAOEL (para mesoteliomas testiculares y fibroadenomas de las glándulas mamarias)	0.1 mg/kg de peso/día

1.2. Alimentos en donde se produce acrilamida

La acrilamida se ha detectado tanto en alimentos elaborados industrialmente como cocinados en el hogar, que tienen un alto contenido de ambos precursores y son en su mayoría de origen vegetal, como los tubérculos (papas, yucas, entre otros) y los cereales. En todos los casos, el nivel de acrilamida depende del tiempo del procesado, así como de la temperatura y el contenido de agua, y en algunos casos del tiempo de almacenamiento; sin embargo, los niveles más altos (de hasta 1343 µg/kg) se han encontrado en alimentos ricos en carbohidratos y con bajos niveles de proteínas, por ejemplo, en papas fritas, productos de panadería, cereales para el desayuno, maíz, café en polvo, entre otros [28, 26].

Por su parte, los tubérculos presentan cantidades altas de agua, fibra, carbohidratos y calorías y cantidades bajas de grasas y proteínas. El carbohidrato principal de esta clase de vegetales es el almidón, que puede ser hidrolizado hasta sus azúcares individuales, mientras que el contenido de proteínas (alrededor del 1%) lo constituyen aminoácidos libres y sus correspondientes aminas, principalmente, los ácidos aspártico y glutámico [16]. Como ya se ha mencionado, estos compuestos (azúcares provenientes del almidón y amino ácidos) son los precursores de la acrilamida en los alimentos. Es por ello que se escogieron para el estudio tres especies de esta clase de vegetales, conocidas comúnmente como papa, yuca y plátano.

1.2.1. La papa

Perteneciente a la familia Solanaceae y al género *Solanum* [8], la papa es uno de los tubérculos más importantes en la alimentación mundial debido a que constituye una fuente alimenticia rica en proteínas, carbohidratos, potasio, vitamina C, otras vitaminas y minerales en menor proporción.

El cultivo de este tubérculo juega un rol importante en el sistema de alimentación global, puesto que contribuye a los requerimientos energéticos y de nutrientes de millones de personas en el mundo. Un reporte de CIP/FAO, registra que el uso mundial de la papa se está trasladando del consumo de papas frescas y del consumo como alimento para ganado, hacia los productos procesados tales como papas fritas (hojuelas), papas pre-fritas (a la francesa) y deshidratadas [8]. Esto debido al crecimiento de la población urbana y con esto la preferencia de los consumidores por los alimentos pre-listos y de fácil preparación [6].

En Colombia son procesadas anualmente entre 170.000 y 250.000 toneladas de papa, lo que representa cerca del 12% de la producción nacional; de ésta, el 80% se elabora en forma de hojuelas (*chips*) y el 20% en forma de bastones (a la francesa). De las distintas posibilidades de transformación de la papa, la producción de hojuelas es la industria más dinámica, debido a que existe mayor competencia, lo que obliga a un mejoramiento del proceso para asegurar la máxima calidad de las papas fritas [6].

1.2.2. La yuca

De la familia Euphorbiaceae y género *Manihot*, la yuca constituye una de las fuentes de energía más importantes en las regiones tropicales del mundo, puesto que las raíces son una fuente importante de carbohidratos y las hojas, de proteínas, minerales y vitaminas (especialmente vitamina C y carotenos) [5].

La yuca se utiliza por la industria principalmente por su alto contenido de almidón; para ello, el proceso industrial que se realiza con este tubérculo es la producción

de harinas de yuca utilizadas principalmente como alimento para animales; sin embargo, en los últimos años, se ha venido desarrollando el procesamiento en forma de croquetas precocidas y congeladas, que son consumidas fritas [5].

1.2.3. El plátano

El plátano es una fruta tropical originada en el suroeste asiático, perteneciente a la familia de las Musáceas y del género *Musa*, constituye una fuente de carbohidratos, potasio, algunas vitaminas y ácido fólico; el contenido de proteínas es bajo. Estas propiedades hacen de esta fruta un alimento de interés para el estudio del contenido de acrilamida.

El plátano se utiliza en la agroindustria como materia prima para la fabricación de plátanos deshidratados o congelados, pasabocas (*snacks*), harinas y alimentos concentrados para animales [9]. En Colombia, menos del 1% de la producción nacional es consumido por la industria. Sin embargo, este sector cada día avanza sus esfuerzos de forma que se le dé al cultivo del plátano un valor agregado con su procesamiento [9].

1.3. Metodologías reportadas para el análisis de acrilamida

1.3.1. Método US EPA

Debido a que en el proceso de potabilización del agua se utiliza poliacrilamida como floculante, la *U.S. Environmental Protection Agency* (EPA) en 1996 describió una metodología analítica para la determinación de acrilamida libre en el agua potable, utilizando cromatografía de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD), para la cuantificación. El método está basado en la bromación del doble enlace de la acrilamida para producir el compuesto 2,3-dibromopropionamida, el cual se extrae de la mezcla de reacción con acetato de etilo, y se seca luego sobre sulfato de sodio anhidro. El extracto es limpiado en una columna de florisil y llevado al análisis cromatográfico utilizando ftalato de dimetilo, como estándar interno [10].

1.3.2. Sistemas de detección empleados con cromatografía de gases para el análisis de acrilamida.

Los sistemas de detección en cromatografía de gases pueden variar según la aplicación. Sin embargo, es necesario que el detector tenga adecuada sensibilidad, estabilidad, respuesta lineal, tiempos de respuesta cortos y reproducibilidad en los resultados. Uno de los detectores más utilizados es el detector de captura de electrones (ECD), que contiene Ni^{63} , emisor β , que genera una corriente de electrones, que pueden ser capturados por las moléculas de analito que poseen grupos electronegativos; de forma que se mide la disminución de la corriente de electrones de fondo, que es proporcional a la cantidad de grupos electronegativos presentes en la molécula. Este detector es útil para la cuantificación de moléculas halogenadas [15]. De ahí que sea conveniente adicionar halógenos al monómero de acrilamida libre.

El detector selectivo de masas se utiliza también ampliamente, debido a que genera respuesta a una gran variedad de analitos, su función se basa principalmente en la fragmentación de las sustancias en una cámara de ionización y luego en la medición de las corrientes iónicas parciales de las especies químicas separadas previamente en el analizador (cuadrupolo) de acuerdo con su relación masa/carga, se obtiene así el respectivo patrón de fragmentación del analito. Esta técnica es una herramienta de costo relativamente elevado. Sin embargo, su utilización para la determinación de acrilamida en alimentos fritos es amplia y se obtienen excelentes resultados [17].

Artículos publicados en los últimos tres años muestran que la utilización de GC-ECD y GC-MS permite obtener excelentes resultados para el análisis y cuantificación de acrilamida en alimentos [31, 24]. En estos trabajos, se utiliza la bromación de la muestras para obtener el derivado, además de utilizar para la preparación de las muestras procedimientos sencillos que incluyen la técnica de

extracción líquido-líquido por lotes, así como parámetros cromatográficos adecuados para el análisis.

1.3.3. Otras técnicas

La cromatografía de gases no ha sido la técnica analítica única, que ha sido empleada para la determinación de acrilamida. También ha sido muy utilizada la cromatografía líquida de alta eficiencia aplicada en diferentes modalidades, como: LC-MS [13], SPE/HPLC/UV [30], LC-MS/MS [20], entre otras; en estos casos, la determinación es de forma directa y la preparación de la muestras no requiere tratamientos complejos, puesto que la acrilamida es una sustancia no volátil que se solubiliza fácilmente en muchos disolventes, además posee un grupo cromóforo que absorbe en la región del espectro ultravioleta, lo que hace que esta técnica se aplique fácilmente con detectores de arreglo de diodos (DAD) y de ultravioleta (UV).

La técnica de electroforesis capilar ha sido implementada para efectuar la determinación de acrilamida en alimentos. La electroforesis con diferentes modalidades de inyección y pre-concentración ha mostrado buenos resultados en la identificación y cuantificación de acrilamida [2].

1.4. Antecedentes

Al ubicar en el contexto actual el análisis de acrilamida en alimentos procesados a altas temperaturas, se realizó un análisis de la actividad científica (**Anexo B**) en este tema, utilizando la base de datos *Web of Science (ISI Web of Knowledge, Thomson, Versión 3.0)* en los últimos diez años. Se emplearon cuatro ecuaciones de búsqueda, que identifican las publicaciones de orden analítico y las relacionadas con la química y bioquímica, sobre la formación de acrilamida en alimentos, así como las concentraciones en las que se encuentra.

El análisis se realizó para los últimos diez años, encontrándose la tendencia mostrada en la **Figura 5**, para las cuatro ecuaciones de búsqueda respecto al año

de publicación. En general, se muestra que los años, en que se registra el mayor número de publicaciones, fueron 2005 y 2006. Sin embargo, la actividad científica no cesa en el último año, pues en todos los casos se registran publicaciones en este tiempo.

Muchos autores dedican sus trabajos al estudio de la acrilamida, pues este monómero ha controvertido, en cierta forma, la seguridad y la inocuidad de muchos alimentos de consumo común y diario. Entre los autores más relevantes se encuentra *Zhang Y.* quien, en sus publicaciones, describe metodologías de análisis por cromatografía de gases y detalla la preparación de la muestra y los aspectos a tener en cuenta para efectuar este análisis. También se destacan otros autores, como *Törnqvist M.*, quien realizó con sus colaboradores las investigaciones en el 2002 en las que se determinaron aductos entre la hemoglobina y la acrilamida; las publicaciones de esta autora y de su equipo de trabajo prendieron las alarmas en el mundo sobre la presencia de este monómero en los alimentos procesados [29].

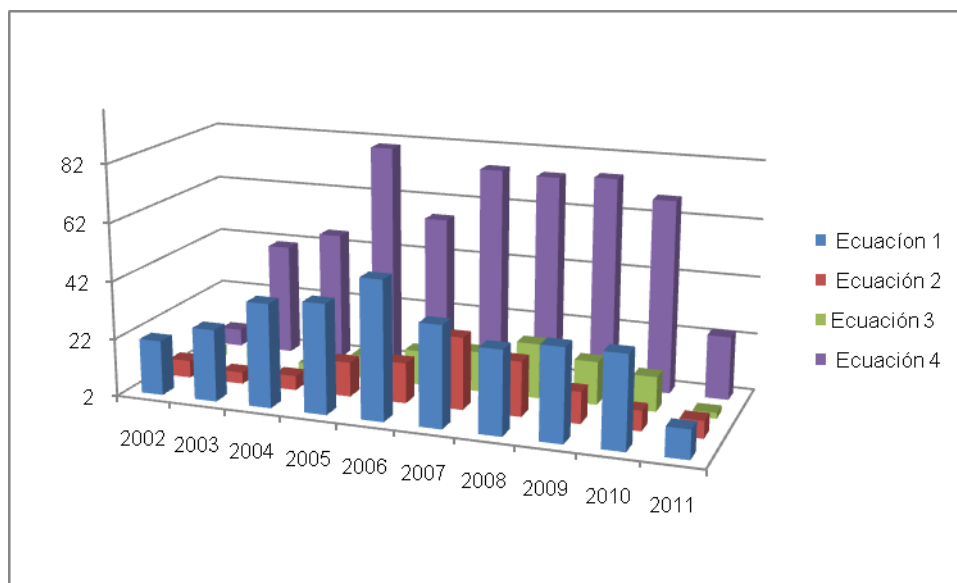


Figura 5. Publicaciones registradas por año en la base de datos *Web of Science*. (Ecuación 1: *topic=determination and topic= acrylamide*; Ecuación 2: *topic=quantification and topic= acrylamide*; Ecuación 3: *topic=gas chromatography*

and topic= acrylamide; Ecuación 4: topic=food and topic= acrylamide), fecha de consulta: Junio-17 de 2011, período de observación: 2001-2011.

Teniendo en cuenta que desde hace ocho años ya se conoce sobre la formación de acrilamida en alimentos, muchas organizaciones de seguridad alimentaria del mundo han puesto sus esfuerzos para determinar su cantidad en los alimentos de consumo diario, y los mecanismos de su formación y control. Las publicaciones sobre este tema aparecen principalmente en países de Europa y Asia, en los cuales, según la **Figura 6**, los más representativos son Alemania, República Popular China y Suecia.

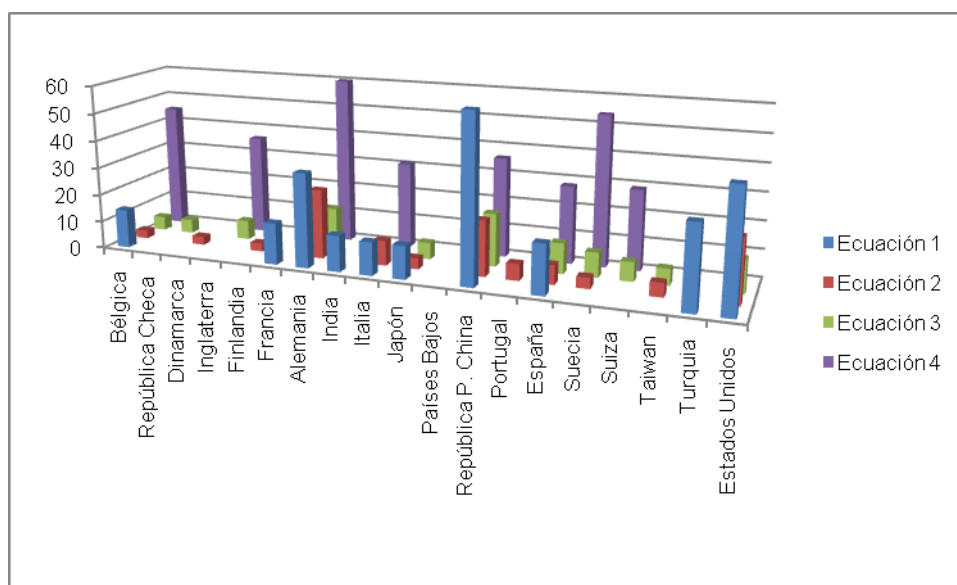


Figura 6. Publicaciones registradas por países en la base de datos *Web of Science*. (Ecuación 1: topic=determination and topic= acrylamide; Ecuación 2: topic=quantification and topic= acrylamide; Ecuación 3: topic=gas chromatography and topic= acrylamide; Ecuación 4: topic=food and topic= acrylamide), período de observación: 2001-2011, fecha de consulta: Junio 17 de 2011.

El conocimiento sobre la acrilamida en alimentos de consumo cotidiano es un tema de actualidad, sobre el cual en América Latina se comienzan a hacer los primeros estudios en alimentos tanto autóctonos, como los de alto consumo, con

el fin de establecer el impacto que este problema genera en la sociedad. En este sentido, la implementación de metodologías analíticas para su estudio constituye uno de los mayores avances en el desarrollo científico y tecnológico en estas regiones.

2. DESARROLLO EXPERIMENTAL

2.1. Preparación del derivado 2,3-dibromopropionamida.

2.1.1. Reactivos, solventes y material de referencia certificado. Todas las marcas y números de lotes correspondientes se muestran en el **Anexo C**. Los reactivos que se usaron en el presente trabajo fueron: bromuro de potasio (KBr), bromo (Br₂) para síntesis, ácido bromhídrico y tiosulfato de sodio. Como solventes se utilizaron agua tipo I obtenida de un sistema purificador de agua marca Millipore (modelo Synergy UV), acetato de etilo, hexano y acetona. Se utilizó el material de referencia certificado de acrilamida del 99,5 % de pureza y para la limpieza del derivado se utilizó florisil.

2.1.2. Muestras de alimentos. Se analizaron cuatro muestras de papas fritas empacadas (hojuelas caseras y tres marcas comerciales), tres muestras de plátanos fritos empacados (rodajas caseras y dos marcas comerciales) y una muestra comercial de yucas fritas empacadas. Todas las muestras fueron obtenidas del mercado local.

2.1.3. Metodología de síntesis. Inicialmente, se preparó una solución de acrilamida (50 mg/mL), la cual se dispuso en un balón de fondo redondo con bromuro de potasio (KBr, 0,9 g) y unas pocas gotas de ácido bromhídrico (HBr), hasta pH entre 0-3. El balón se introdujo en un baño a una temperatura entre 0-4 °C y con agitación constante hasta disolución completa del KBr. Luego, se adicionó lentamente con agitación constante, agua saturada de bromo (90 mL, preparada con bromo 4 g y aforado con agua hasta 200 mL, en relación molar 1:8). La mezcla de reacción se dejó en el baño y aislado de la oscuridad con papel

aluminio por cuatro horas, manteniendo la agitación constante. El montaje de la reacción se puede observar en la **Figura 7**.

A continuación se eliminó el bromo en exceso con adición de unas pocas gotas de solución de tiosulfato de sodio (1 M). La solución se extrajo con acetato de etilo, utilizando tres porciones de 50 mL, con un tiempo de extracción de 3 min. El extracto se rotoevaporó a 249 mbar, 46 °C y 85 rpm. Seguidamente, se realizó la limpieza del extracto en una columna con florisil (3 cm) acondicionado con hexano (10 mL), eluido con la mezcla 10% acetona/hexano (20 mL) y lavado con la mezcla 20% acetona/hexano (30 mL). El efluente de la columna se rotoevaporó a 300 mbar, 30 °C y 40 rpm, luego, se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno. El derivado se reconstituyó en acetato de etilo (2 mL).

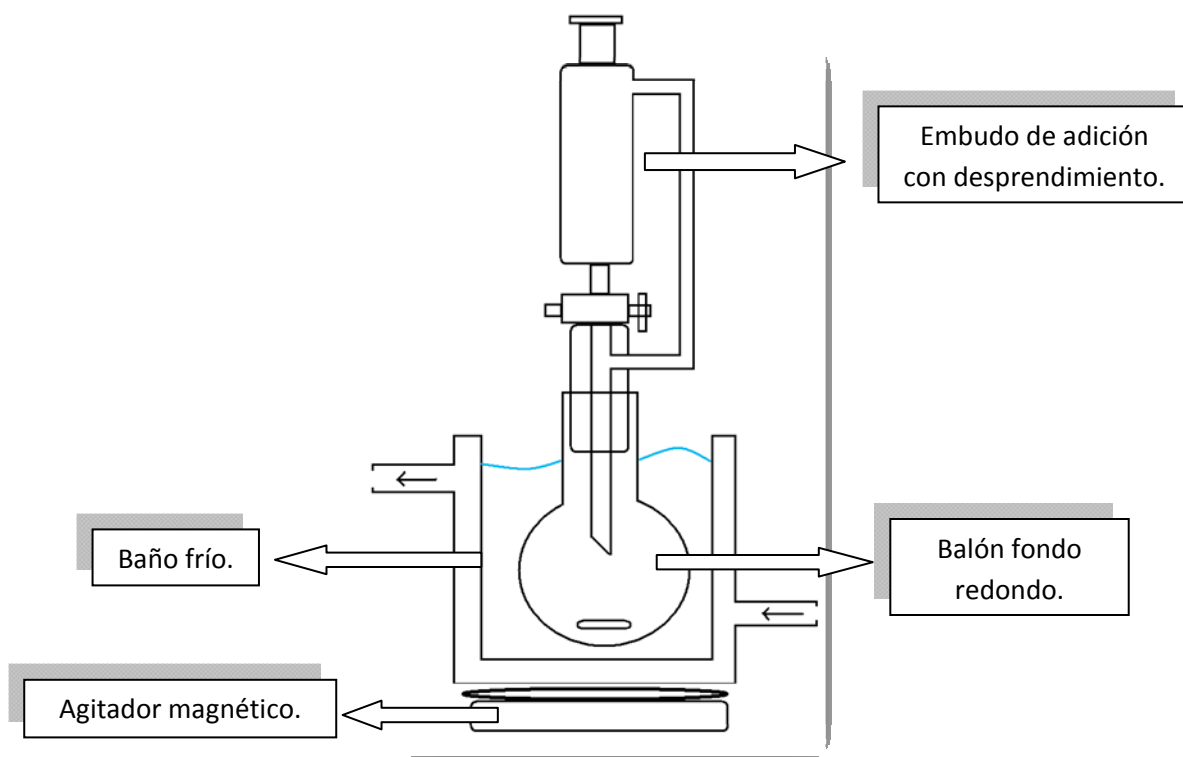


Figura 7. Montaje utilizado en la síntesis del derivado 2,3-dibromopropionamida.

2.2. Conversión del 2,3-dibromopropionamida al compuesto 2-bromopropenamida.

Debido a que el derivado dibromado es susceptible a sufrir eliminación de uno de los bromos por la presencia de sitios básicos y a altas temperaturas, fue necesario inducir la eliminación con la adición de trietilamina (180 μL) a la solución en acetato de etilo del sólido obtenido; esta solución se agitó por 7 min. Por último, se filtró y se evaporó el solvente hasta sequedad, con flujo de nitrógeno.

Para la purificación del producto de eliminación se hizo una recristalización con heptano (10 mL); el producto de recristalización se caracterizó utilizando técnicas espectroscópicas y el punto de fusión.

2.3. Ajuste de los parámetros cromatográficos.

Cromatografía de gases acoplada al detector de *micro*-captura de electrones (μ -ECD) se utilizó para el análisis de acrilamida en las muestras, así como detector selectivo de masas (MSD), para la identificación y confirmación del analito.

2.3.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se empleó un cromatógrafo de gases HP-5890A *Series II* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.), acoplado a un detector selectivo de masas HP 5972 (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.); con puerto de inyección *split/ splitless*. Se utilizó un sistema de datos MS *ChemStation Rev. D. 02.00.275* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.) para adquisición y procesamiento de datos.

2.3.2. Cromatografía de gases con detector de *micro*-captura de electrones. Se empleó un cromatógrafo de gases HP-6890 *Series Plus* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.), con programación electrónica de temperatura y control electrónico de presión de gases, equipado con un detector de *micro*-captura de electrones, con puerto de inyección *split/ splitless* (inyección automática para

soluciones, HP 7683 *Series Inyector*). El sistema de datos fue el *ChemStation Rev B.04.02 [96]* (Hewlett-Packard, Palo Alto, California, EE.UU.).

La **Tabla 2** muestra los parámetros cromatográficos empleados en el análisis de acrilamida por ambos detectores, de captura de electrones y selectivo de masas, estos parámetros se obtuvieron después experimentos preliminares, en los cuales se analizaron productos de la reacción de derivatización en diferentes columnas (apolar y polar), con diferentes programaciones de temperatura y modos de inyección (*split* y *splitless*).

Tabla 2. Parámetros cromatográficos empleados para el análisis de acrilamida por GC- μ -ECD y GC-MSD.

Parámetro	Descripción
Columna cromatográfica	Columna capilar de sílice fundida con fase estacionaria de poli(etilenglicol), DB-WAX de 60 m x 250 μ m (<i>d.i.</i>) x 0,25 μ m.
Temperatura del detector	300 °C
Temperatura del inyector	250 °C
Temperatura y tiempo inicial	45°C (10 min)
Velocidad de calentamiento	3 °C/ min
Temperatura y tiempo final	220 °C (30 min)
Gas de arrastre (<i>carrier gas</i>)	Helio, 99.995% (<i>Linde</i>)
Velocidad del gas de arrastre	Flujo constante, 1 mL/min
Gas auxiliar (<i>make up gas</i>)	Ar-CH ₄ ,(<i>Linde</i>)
Flujo volumétrico	30 mL/min
Presión del gas de arrastre en la cabeza de la columna	19.79 psi
Modo de inyección	<i>Splitless</i>

2.4. Extracción del analito de la matriz de las muestras de alimentos.

2.4.1. Diseño de experimentos.

Para determinar los parámetros de extracción del analito, se elaboró un diseño de experimentos factorial 2^3 , es decir, tres variables en dos niveles que se consideraron eran influyentes en la extracción de la acrilamida de la matriz de los alimentos; como parámetro de respuesta se tomó el área cromatográfica del derivado de acrilamida en el sistema de detección empleado (ECD).

Las siguientes variables fueron sometidas a estudio, a saber:

- Temperatura del medio de extracción.
- El efecto *salting out*.
- El efecto del ultrasonido.

Tabla 3. Variables y niveles en el diseño de experimentos, 2^3 .

Variables	Niveles	
	Alto	Bajo
(A) Salting out	CON	SIN
(B) Ultrasonido	CON	SIN
(C) Temperatura, °C	60	26

Los valores que toman estas variables o los niveles se muestran en la **Tabla 3**; en ella, se observa que no es posible tener un valor medio. Por ello, la representación grafica del diseño factorial es un cubo (**Figura 8**), donde los vértices indican las combinaciones de las variables en estudio. Los experimentos que se realizaron se muestran en la **Tabla 4**. En todos los casos, se utilizó como matriz papa frita, enriquecida una solución de material de referencia certificado de acrilamida (100 ppb, 10 μ L).

Resultaron 8 combinaciones de las variables en estudio, y se hicieron duplicados para cada punto, para poder evaluar estadísticamente los resultados, así como un blanco, que consistió en la misma cantidad de papa, sin enriquecer con acrilamida, y se sometió al proceso de extracción tomando las variables en una de las 8 combinaciones (elección al azar).

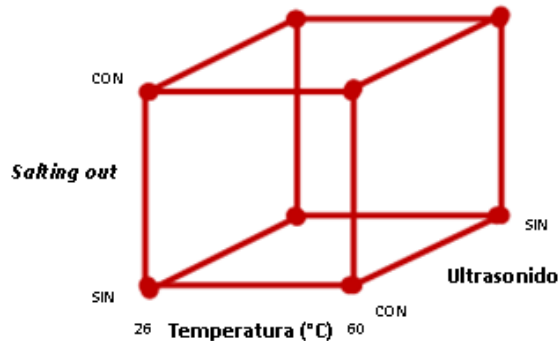


Figura 8. Representación gráfica del diseño factorial 2^3 .

El análisis de los resultados del diseño experimental se realizó utilizando la metodología de superficie de respuesta con ayuda del *software* estadístico *Statgraphics Centurion XV* (Licencia de prueba de 30 días).

Tabla 4. Combinaciones de las 3 variables en el diseño de experimentos empleado en este estudio.

Exp. N°	SO	UL	TH
1	sin	sin	26
2	con	sin	26
3	sin	con	26
4	con	con	26
5	sin	sin	60
6	con	sin	60
7	sin	con	60
8	con	con	60

SO: *salting out*, UL: ultrasonido, TH: temperatura del agua, °C

2.5. Determinación de las figuras de mérito del método.

Sabiendo que el procedimiento de extracción incluye etapas en donde pueden existir pérdidas de analito y, por tanto, se disminuye la eficiencia del método, se determinaron las figuras analíticas de mérito como un evidencia de la eficiencia de

la metodología, se calcularon el nivel mínimo de detección, el nivel mínimo de cuantificación, el rango dinámico lineal, la precisión (expresada como repetibilidad) y la exactitud (expresada como porcentaje de recuperación).

Para ello, se utilizó una curva de calibración preparada por el método de estándar externo en el rango de 10-1000 ng/mL, utilizando 2-bromopropenamida preparado en el laboratorio a partir de material de referencia certificado de acrilamida; así, cada punto se preparó por dilución de una solución *stock* de 2-BPA (5 µg/mL); los volúmenes de *stock* y las concentraciones se presentan en la **Tabla 5**. Todas las soluciones se prepararon aforando con acetato de etilo a un volumen de 1 mL.

Al graficar el área cromatográfica obtenida por GC-ECD, bajo las condiciones experimentales mostradas en la **Tabla 2**, *versus* la concentración, se obtuvo la ecuación lineal que tuvo mayor ajuste a la curva es de la forma:

$$y = mx + b \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde el término *m* es el factor de respuesta del equipo a las concentraciones evaluadas y *b* es el punto de corte. La calibración se mide con el valor de R² de la curva y evaluando el error de la concentración calculada con la ecuación de la curva y la concentración preparada; este error debe ser menor del 15%.

Tabla 5. Curva de calibración.

Punto	Concentración, ng/mL	Volumen, de solución stock (5 µg/mL), µL
p1	10	2
p2	25	5
p3	50	10
p4	75	15
p5	100	20
p6	250	50
p7	500	100
p8	750	150
p9	1000	200

2.5.1. Determinación de los niveles mínimo de detección y de cuantificación.

El nivel mínimo de detección (NMD) es la concentración mínima, que genera una señal analítica diferenciable del ruido. Se calcula como el producto de la desviación estándar de las áreas obtenidas de varias inyecciones de un punto bajo de la curva de calibración (**Tabla 5**) y la t estadística para los grados de libertad al 95% de confianza; la concentración se obtiene al evaluar el valor obtenido de la **Ecuación 2** en la ecuación de la curva de calibración, así:

$$NMD \left(\frac{ng}{mL} \right) = SD * t_{95\%,n-1} \quad (\text{Ecuación 2})$$

El nivel mínimo de cuantificación es la concentración mínima que es posible cuantificar, se calcula como dos veces el nivel mínimo de detección.

$$NMC \left(\frac{ng}{mL} \right) = 2 * NMD \left(\frac{ng}{mL} \right) \quad (\text{Ecuación 3})$$

2.5.2. Determinación del rango dinámico lineal. Se refiere al intervalo de concentraciones en donde la respuesta es lineal y directamente proporcional a la concentración, se considera el valor de la pendiente en cada punto de la calibración, es decir, el factor de respuesta y se mide la desviación estándar relativa de estos valores, la cual deberá ser menor del 20%.

$$Rf = \frac{\text{Área (cuentas)}}{\text{concentración} \left(\frac{ng}{mL} \right)} \quad (\text{Ecuación 4})$$

2.5.3. Precisión. La precisión fue medida como repetibilidad en áreas del quintuplicado de inyección de un punto de la curva de calibración. Para ello, se determinó la desviación estándar relativa de las áreas; este porcentaje debería ser menor del 10%.

2.5.4. Exactitud. La exactitud fue medida como el porcentaje de recuperación de una muestra enriquecida con acrilamida (10 ppm, 10 μ L), y preparada con las mejores condiciones de extracción, resultados del diseño de experimentos; el cálculo se realizó mediante la **Ecuación 5**:

$$\text{Porcentaje de recuperación} = \frac{C_c}{C_r} * 100 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Donde C_c es la concentración de BPA determinada experimentalmente y C_r es la concentración de la solución de BPA utilizada de referencia. Esta última, se determina teniendo en cuenta el rendimiento total de la reacción (conversión de AA a BPA) y la concentración de la solución de AA con la que se enriquece.

3. ANÁLISIS DE RESULTADOS

3.1. Obtención del derivado 2,3-dibromopropionamida.

Para la obtención del compuesto dibromo-acrilamida se llevó a cabo una reacción de adición de halógenos, sobre el doble enlace (**Figura 9**), se presume, que el mecanismo comprende la formación de un intermedio catiónico cíclico como es el ion bromonio. Es por ello, que es necesario inducir la ruptura heterolítica del enlace bromo-bromo del agente derivatizante (agua saturada de bromo). Para ello, fue necesario que en el medio de reacción hubiese exceso de bromuros, aportados por el bromuro de potasio; por su parte, la formación del intermedio cíclico propuesto fue facilitada por la acidez del medio pues se manejó un pH ente 0 y 3 con ácido bromhídrico [23, 3].

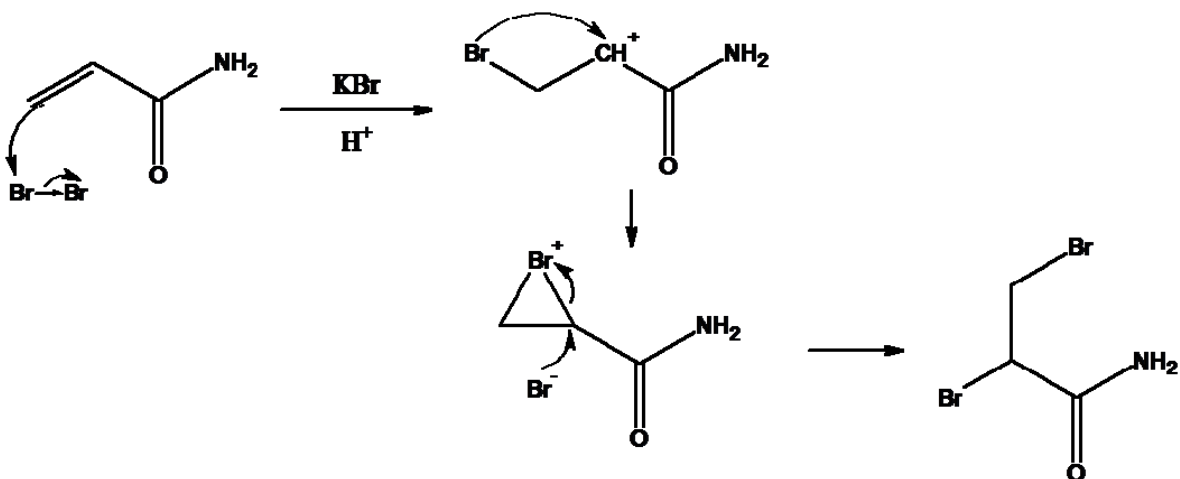


Figura 9. Mecanismo de la doble adición de bromo al doble enlace de la acrilamida [23].

3.1.1. Determinación de la relación molar.

Se determinó la relación molar adecuada para obtener una mayor conversión de la acrilamida a su producto de adición, medida como área de pico cromatográfico, mediante la evaluación del efecto del exceso de agente derivatizante con cinco relaciones diferentes, obteniéndose que la relación, que mayor área de pico cromatográfico mostró, fue 1:8 (**Figura 10**), con un rendimiento de reacción del 75%.

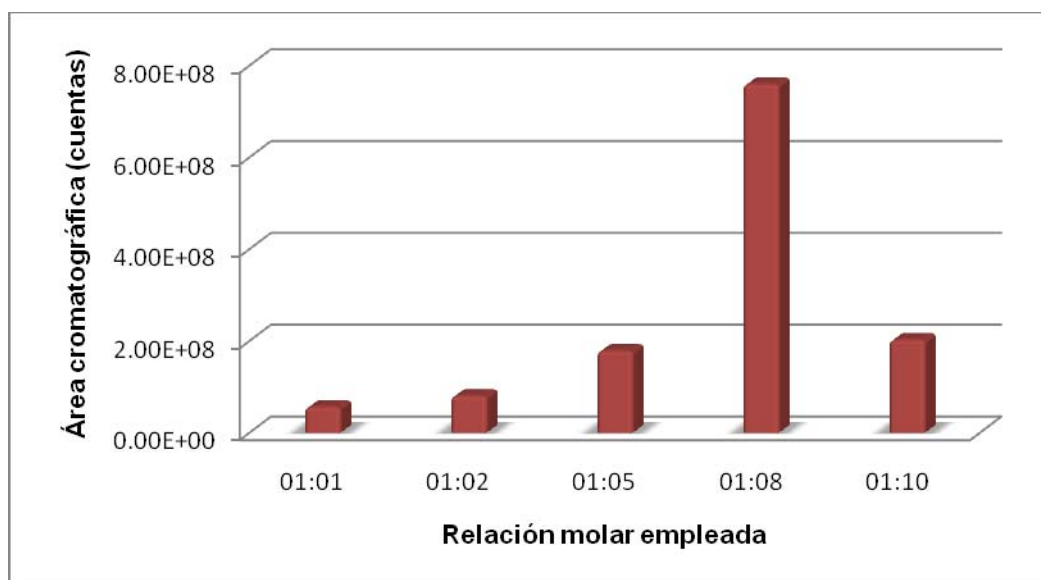


Figura 10. Gráfica de la relación molar *versus* área de pico cromatográfico, para la formación de la 2,3-DBPA.

3.1.2. Caracterización de la 2,3-dibromopropionamida.

La 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA) (véase sus propiedades en el **Anexo D**) se obtuvo como un sólido blanco en forma de agujas con punto de fusión 129-130 °C (medido en un fusiómetro *Fischer Johns*), caracterizado mediante espectroscopia infrarroja (IR) en un equipo Alumex INFRALUM FT-02 sobre disco de KBr y espectrometría de masas en un equipo GC *Hewlett-Packard 5890 Series II* con un detector selectivo de masas *Hewlett-Packard 5972 Series*, en columna apolar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

El espectro IR del sólido obtenido (**Figura 11**), mostró las bandas características de las vibraciones de los enlaces de una amida primaria. Se pueden identificar las tres bandas típicas correspondientes a la del grupo carbonilo C=O (1684 cm^{-1}), la banda de flexión del grupo N-H (1600 cm^{-1}) y la banda de vibración de los enlaces C-N-H (1421 cm^{-1}).

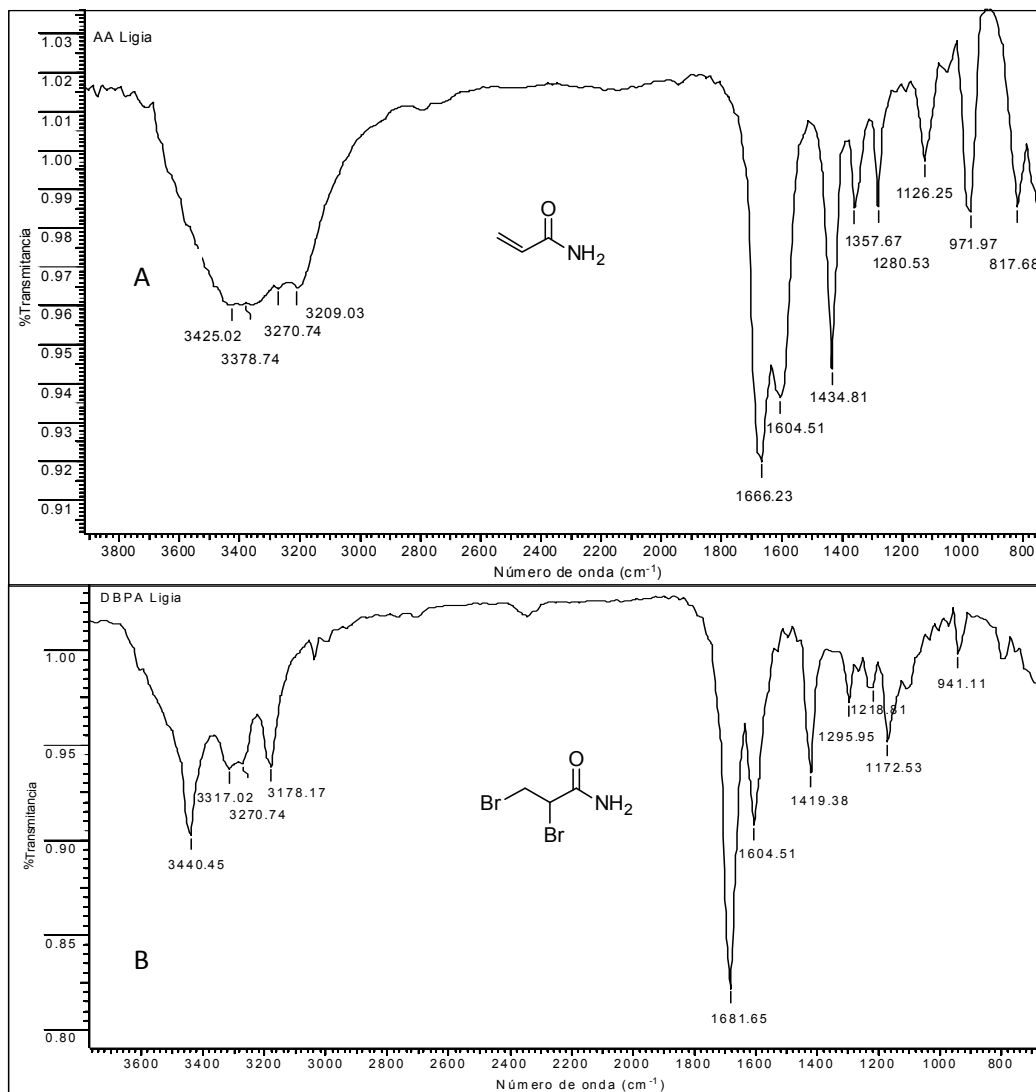


Figura 11. Espectros IR de: A. 2,3-Dibromopropionamida, B. Acrilamida.

Además, se identificaron las bandas de estiramiento asimétrico, simétrico y debido a los puentes de hidrógeno, del enlace N-H en la región de 3000 y 3444 cm^{-1} . Sin embargo, es significativo el cambio presentado en la región de 1100-900 cm^{-1} respecto al espectro de la acrilamida, debido a que en el proceso hubo un cambio de carbonos sp^2 rígidos a carbonos sp^3 con mayor posibilidad de vibrar a través de su enlace sencillo C-C [4].

Por su parte, el espectro de masas obtenido para este compuesto, adquirido por impacto con electrones (70 eV), se muestra en la **Figura 12**; este espectro no registra el ion molecular en m/z 231. Sin embargo, evidencia primeramente ruptura del enlace β al bromo del carbono dos, desprendiéndose el radical CH_2NO y registrándose el catión dibromado de relación m/z 187. También, se evidencia la ruptura simple de un radical Br, que da lugar al catión con relación m/z 150, lo que demuestra que la molécula tiene un átomo de bromo terminal y en consecuencia que en la molécula existen dos átomos de bromo, debido a que la relación isotópica del bromo se mantiene [18].

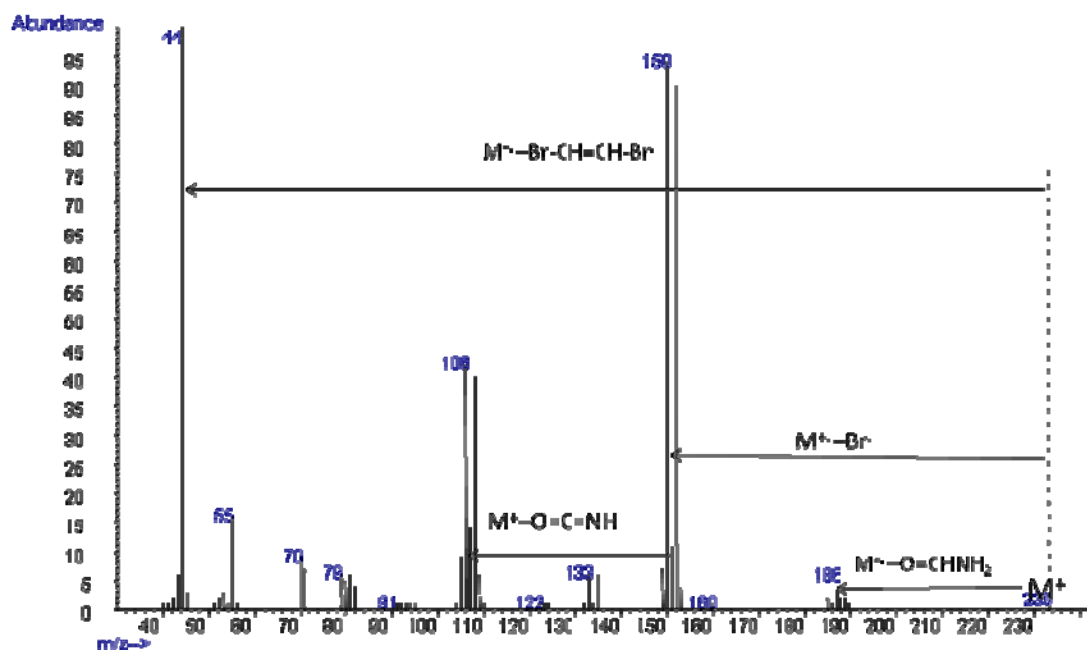


Figura 12. Espectro de masas del 2,3-dibromopropionamida.

Se evidencia luego una ruptura del enlace α al grupo carbonilo del catión con relación masa carga 150, eliminándose el radical CONH_2 . En esta señal se nota que se mantiene la relación isotópica de átomos de bromo en el catión que se registra. Por último, el pico de base se forma luego de la ruptura del enlace α al carbonilo perdiéndose el radical $\text{C}_2\text{H}_3\text{Br}_2$ dando el catión con relación masa/carga 44 que es estable debido a que el oxígeno puede soportar la carga positiva luego de la ruptura del enlace [4]. El esquema de fragmentación propuesto se muestra en la **Figura 13**.

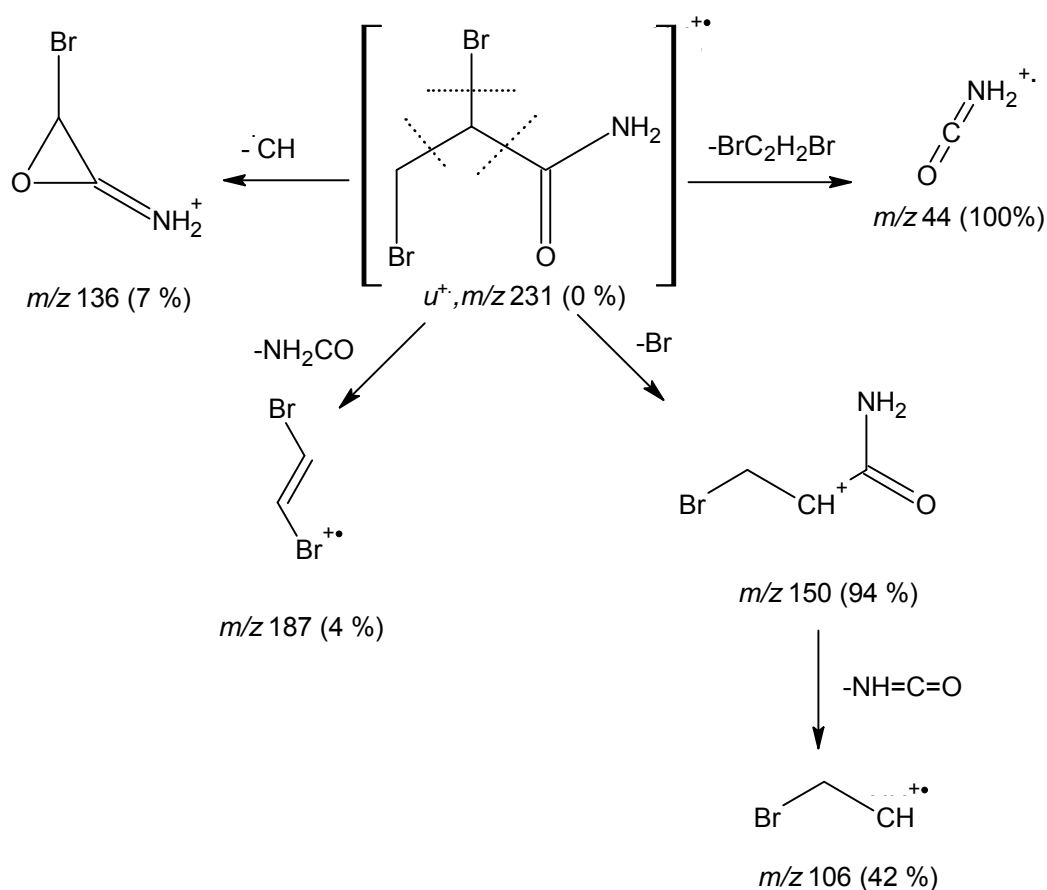


Figura 13. Posibles rutas de formación de iones fragmento en el espectro de masas del compuesto 2,3-DBPA.

3.1.3. Inestabilidad del 2,3-DBPA.

La molécula de 2,3-DPA es inestable en presencia de bases, pues el hidrógeno ubicado en el carbono α , tiene carácter ácido marcado, debido al efecto inductivo que ejerce el bromo y el grupo carbonilo; entonces, a cualquier contacto con un sitio básico, este compuesto forma su producto de eliminación i.e., el compuesto 2-bromopropionamida (2-BPA).

Esto se evidencia en el cromatograma (**Figura 14**), obtenido por GC-MS, que corresponde a una solución de 2,3-DBPA preparada en el laboratorio. Se observa la formación del producto de eliminación 2-BPA, lo que se confirma a través de su espectro de masas. Esto es posible debido a que en el puerto de inyección o en la misma columna, existen sitios básicos, en estas condiciones el proceso de eliminación de bromo puede ocurrir; además las temperaturas altas del puerto de inyección y de la columna pueden generar la descomposición la molécula en el cromatógrafo [1].

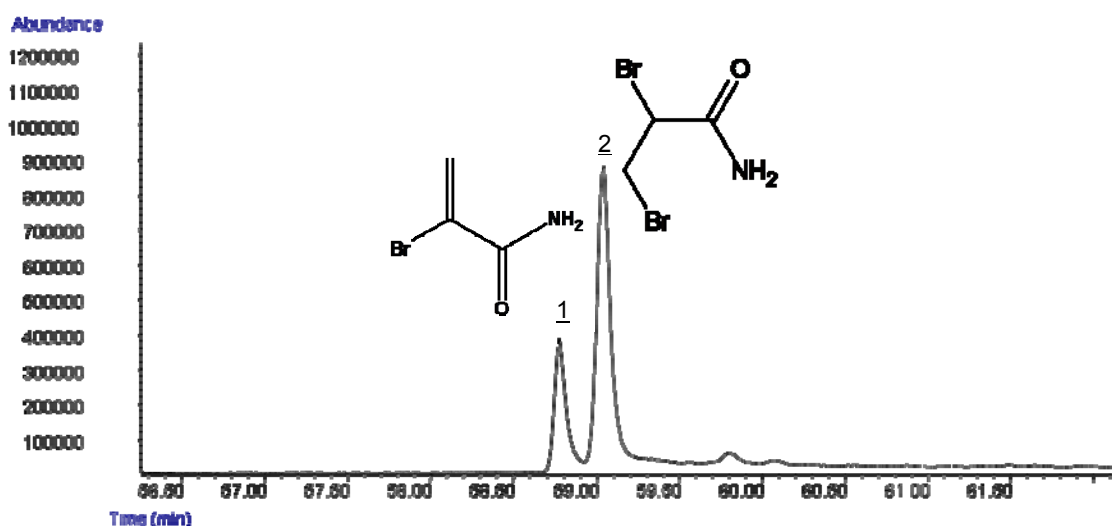


Figura 14. Cromatograma del compuesto 2,3-DBPA que muestra su inestabilidad en el sistema cromatográfico. 1. 2-BPA y 2. 2,3-DBPA.

3.2. Obtención del producto de eliminación de bromo para la formación de la 2-bromopropenamida.

Como segunda etapa de la reacción de derivatización, se realizó una eliminación de uno de los bromos inducida por una base orgánica, i.e., la trietilamina (TEA). La reacción sucede a temperatura ambiente y con agitación; el producto es el compuesto 2-bromopropenamida. Este compuesto tiene una masa molecular de 149,9 g/mol y no posee el número de CAS.

El mecanismo propuesto para la eliminación del bromo a partir de la 2,3-DBPA y TEA, se muestra en la **Figura 15**, y consiste en una eliminación de segundo orden (E2), es decir, es un proceso concertado en donde la trietilamina (base fuerte) induce la eliminación del hidrógeno ácido, acompañado de la formación del doble enlace y la eliminación del bromo terminal, se forma luego el alqueno sustituido siguiendo la regla de Zaitsev⁴ [23, 3].

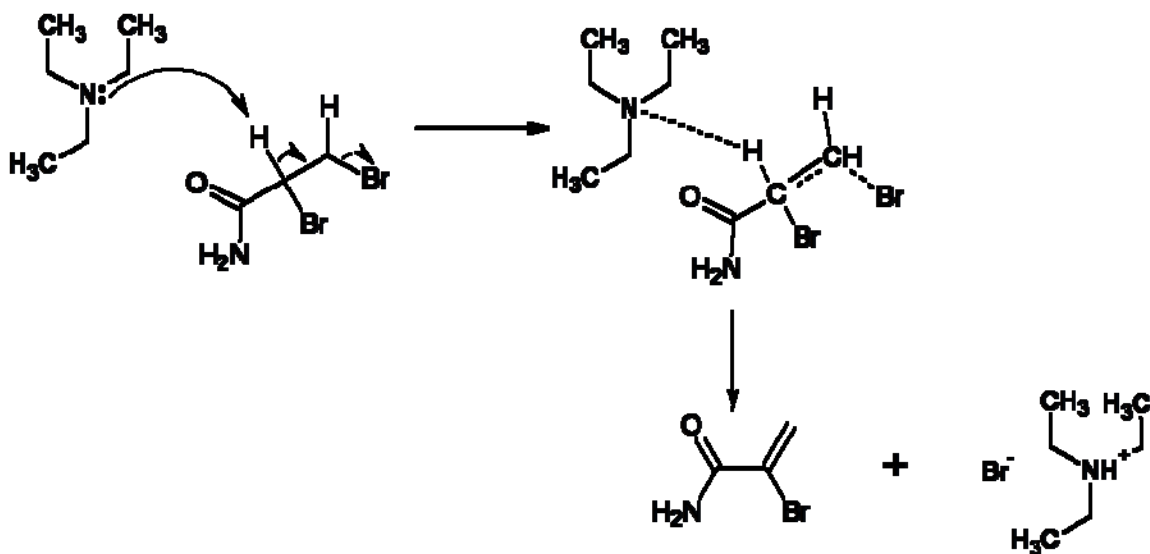


Figura 15. Mecanismo de la eliminación de bromo de la molécula 2,3-DBPA.

⁴ En 1875, Alexander M. Zaitsev de la Universidad de Kazán (Russia), formuló la regla que guía la regioselectividad de la β eliminación, para la formación de alquenos, que afirma que el alqueno formado en mayor cantidad es el que corresponde al aquel en donde la extracción del hidrógeno es del carbono que tiene el menor número de hidrógenos, es decir, el alqueno con mayor número de sustituyentes [3].

3.2.1. Determinación de la relación molar y del tiempo de reacción.

Se determinó la relación molar entre el producto intermedio 2,3-DBPA y la base TEA, para obtener mayor área del pico cromatográfico. En este caso, se evaluaron cuatro relaciones molares, en las que se revisó el exceso y el defecto de base; en esta parte de la reacción, la conversión no fue completa. Sin embargo, se estableció, que la relación molar adecuada sería 1:3 (**Figura 16**). Cabe señalar, que al evaluar relaciones molares mayores, la cantidad de acrilamida sin convertir aumentaba, lo que puede indicar que la eliminación no es completa o que, por el contrario, se eliminan los dos bromos de la 2,3-DBPA, quedando nuevamente la AA de partida. Esto fue constatado utilizando cromatografía de capa fina (TLC), en placas de sílice soportadas en láminas de aluminio, eluidas con una mezcla acetato de etilo: éter de petróleo (2:1).

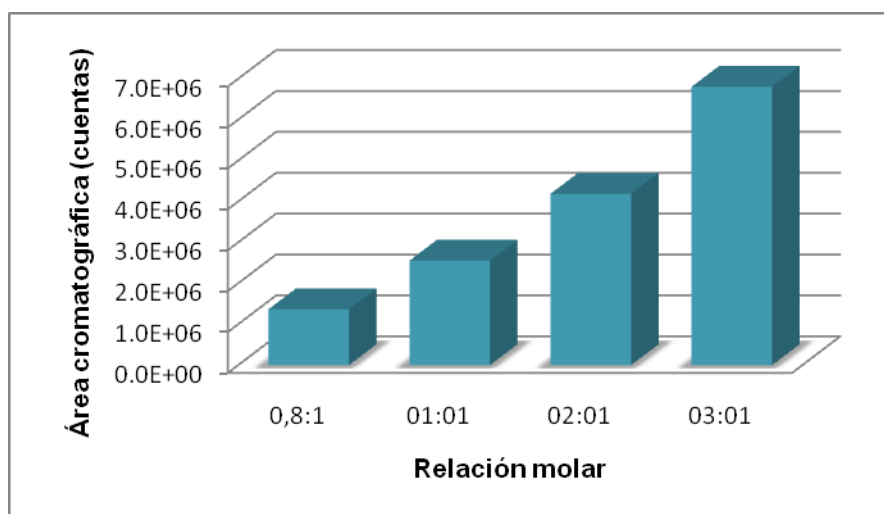


Figura 16. Relación molar *versus* área de pico cromatográfico, de la molécula 2-BPA.

También, se determinó el tiempo de agitación para esta etapa de la reacción. Se evaluaron cuatro tiempos y se relacionaron con las áreas cromatográficas en el análisis del compuesto 2-BPA. En la **Figura 17**, se observa que con el tiempo de

reacción de 7 min, se logra una mayor área del pico de la 2-BPA. Este tiempo se utilizó para las reacciones posteriores.

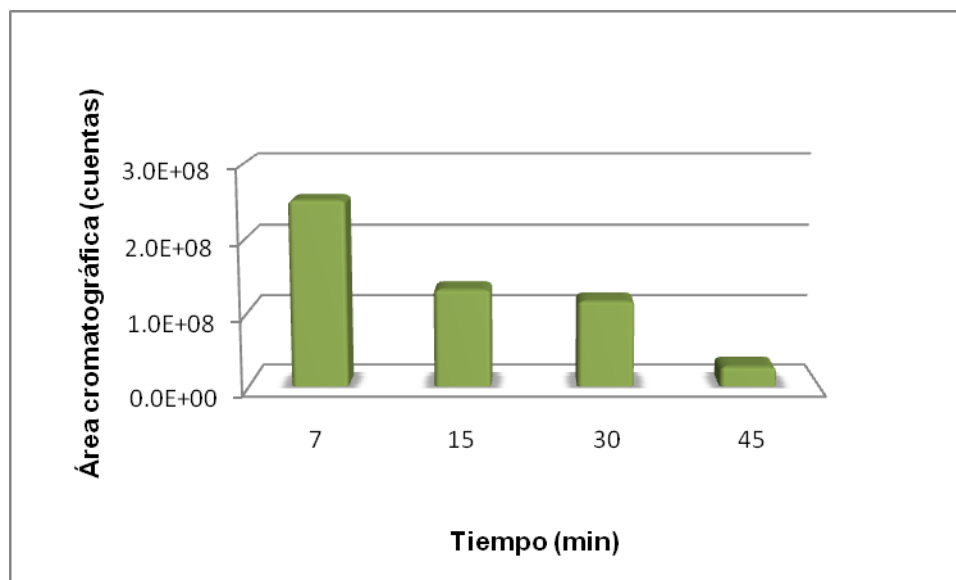


Figura 17. Tiempo de agitación *versus* área de pico cromatográfico, del compuesto 2-BPA.

3.2.2. Caracterización de la 2-bromopropenamida.

La 2-bromopropenamida (2-BPA) se obtuvo como un sólido blanco, en forma de láminas, al que no se le pudo determinar el punto de fusión, debido a que este compuesto se descompone a los ca. 100°C. Sin embargo, la sustancia se caracterizó mediante espectroscopia infrarroja (IR) en un equipo Lumex INFRALUM FT-02, sobre disco de KBr, y por espectrometría de masas, en un equipo GC *Hewlett-Packard 5890 Series II* con un detector selectivo de masas *Hewlett-Packard 5972*, en columna apolar DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm); usando electrones de 70eV de energía, para ionizar y fragmentar la molécula.

El espectro A que corresponde al del sólido obtenido (**Figura 18**), mostró las bandas características de las vibraciones de los enlaces de una amida primaria. Es así como se pueden identificar las tres bandas típicas correspondientes a la del

grupo carbonilo C=O (1684 cm^{-1}), la banda de flexión del grupo N-H (1600 cm^{-1}) y la banda de vibración de los enlaces C-N-H (1421 cm^{-1}).

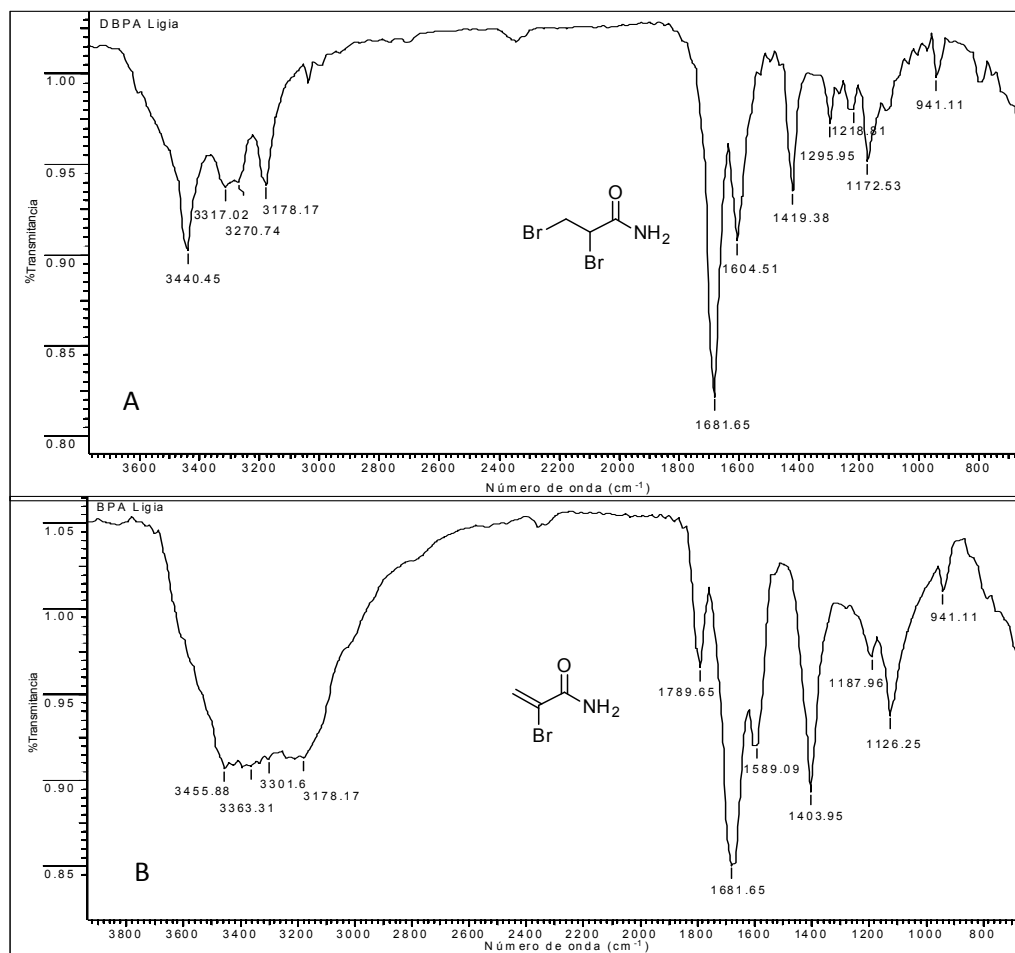


Figura 18. Espectros IR de: A. 2-Bromopropenamida, B. 2,3-Dibromopropionamida.

Se identificaron las bandas de estiramiento asimétrico, simétrico y debido a los puentes de hidrógeno, del enlace N-H en la región de 3000 y 3444 cm^{-1} . Sin embargo, es significativo el cambio presentado en la región de 1100 - 900 cm^{-1} respecto al espectro IR de la 2,3-DBPA. Este cambio en las señales se le atribuye

al cambio en la hibridación de los carbonos involucrados en el proceso, de sp^3 a sp^2 , estos últimos con menor posibilidad de vibrar [4].

Por su parte, el espectro de masas (**Figura 19**) para este compuesto registra el ion molecular y el ion molecular del isotopo del bromo (M y $M+2$). Las pérdidas corresponden a una ruptura del enlace α , con respecto al grupo carbonilo, que se puede ver en dos pasos: la salida del radical amino produciéndose el catión en m/z 134 (que contiene bromo) y la salida del grupo CO, que genera el catión radical en m/z 106 (%), que mantiene la relación isotópica del bromo [18].

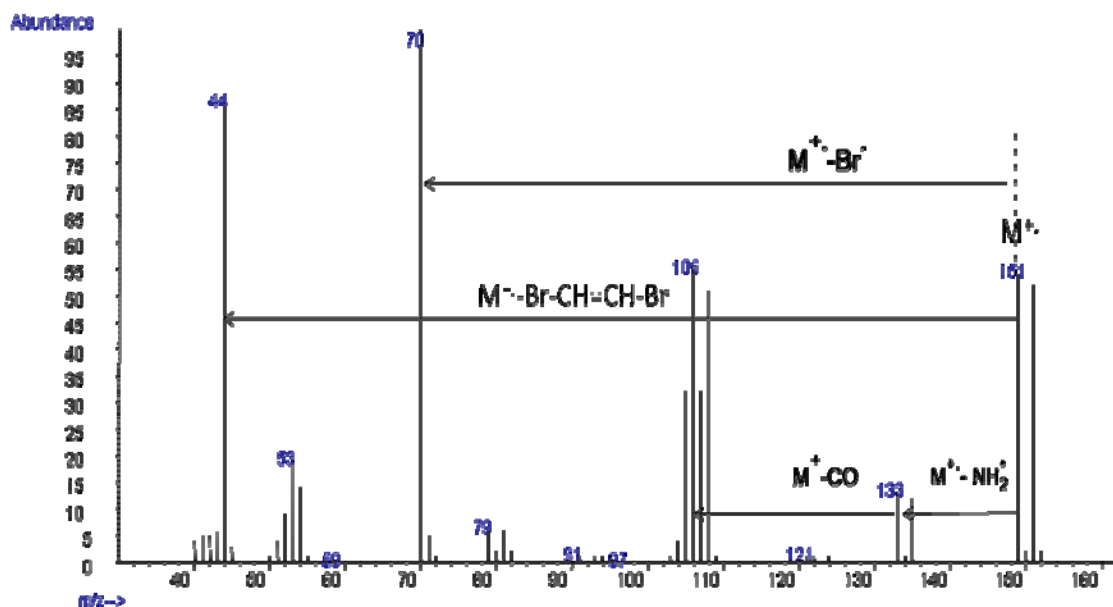


Figura 19. Espectro de masas de la 2-bromopropenamida.

Además, si por ruptura simple en la molécula se fragmenta el enlace carbono bromo, se genera el pico de base en m/z 70 que es un catión estable, debido a que la estructura tiene dos enlaces conjugados que deslocalizan eficientemente la carga positiva. Por último, se evidencia la ruptura del enlace α con respecto al grupo carbonilo y generación del catión en m/z 44. El esquema de fragmentación propuesto se muestra en la **Figura 20**.

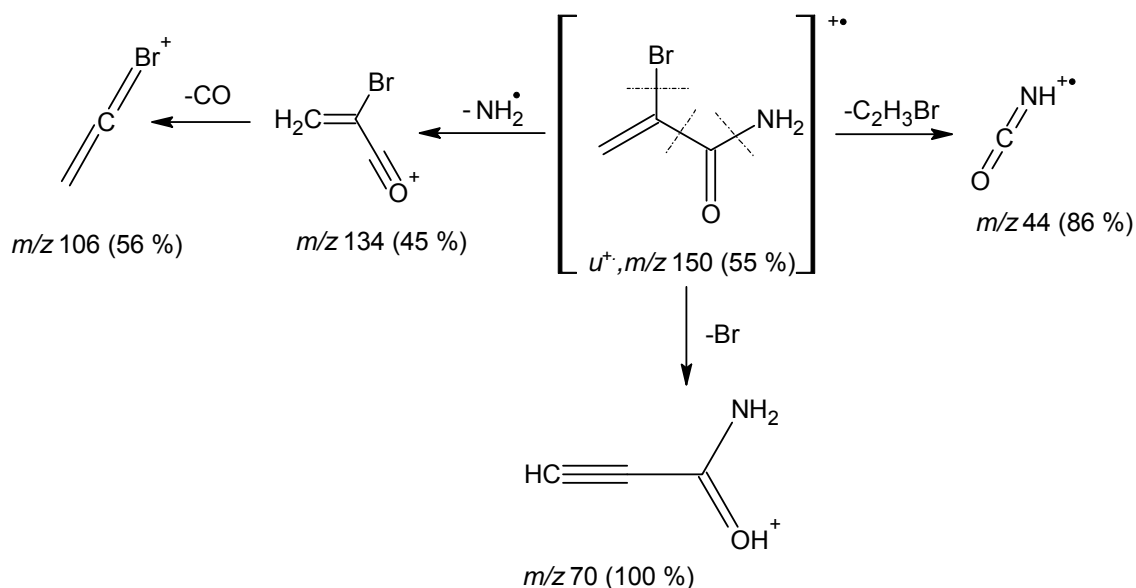


Figura 20. Posibles rutas de formación de iones fragmento en el espectro de masa del compuesto 2-BPA.

3.3. Determinación de las mejores condiciones para la extracción del analito de la matriz de las muestras.

En un diseño 2^3 , se pueden estudiar siete efectos, tres principales (A, B y C), tres interacciones dobles (AB, AC y BC) y una interacción triple (ABC). Sin embargo, esta última se considera que tiene un efecto despreciable y el estudio se enfocó en los efectos principales y de las interacciones dobles [14]. En este caso, se estudian los efectos de la adición de sal, el uso de ultrasonido y el cambio de temperatura en el proceso de extracción (**Tabla 3**), y sus interacciones binarias. Para ello, se realizó el análisis de varianza ANOVA con ayuda del *software Statgraphics Centurion XVI*, con el cual se determina cuáles interacciones tienen efectos sobre la respuesta, puesto que serán aquellos en donde el valor de p sea menor de 0,05. Los resultados se muestran en la **Tabla 6**.

Tabla 6. Análisis de la varianza para el área cromatográfica del compuesto 2-BPA por GC-ECD.

ANOVA	Efectos principales			Interacciones			
	A:SO	B:UL	C:TH	AB	AC	BC	ABC
Razón-F	65,20	3,69	98,41	0,12	52,98	9,51	1,93
Valor-p	0,0000	0,0911	0,0000	0,7392	0,0001	0,0150	0,2023

En la **Tabla 6** se puede observar que para este caso, cuatro de los efectos tienen valores de p menores de 0,05, lo que indica que son significativamente diferentes de cero, con más de 95,0% de confianza. Para establecer si este efecto es positivo o negativo, se construyó la gráfica de Pareto (**Figura 21**). En ésta, se muestra que el único efecto que contribuye positivamente, es la temperatura, los demás influyen negativamente.

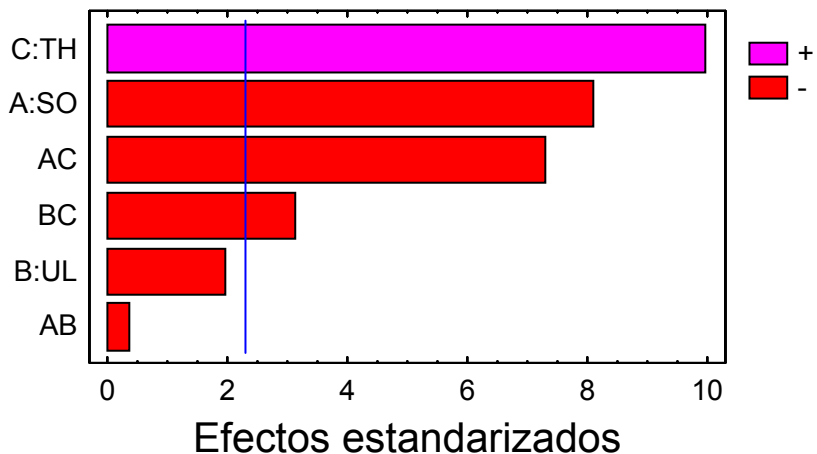


Figura 21. Gráfico de Pareto para el área cromatográfica del compuesto 2-BPA por GC-ECD.

Con base en la gráfica de efectos principales e interacciones, mostradas en la **Figura 22**, es posible determinar en qué sentido contribuye cada una de las variables, o sus combinaciones, en la respuesta. En ellas, se muestra que el valor

bajo de las variables A (SO) y B (UL), no favorece la respuesta del detector; por el contrario el valor alto de la variable C (TH) beneficia la respuesta. Esto se confirma en la gráfica b de la **Figura 22**, pues en ella, se nota que las interacciones que contribuyen al área son las que incluyen a la variable C en su punto alto, indicando que probablemente las mejores condiciones serán aquellas que incluyan calentamiento, pero sin adición de sal y ultrasonido.

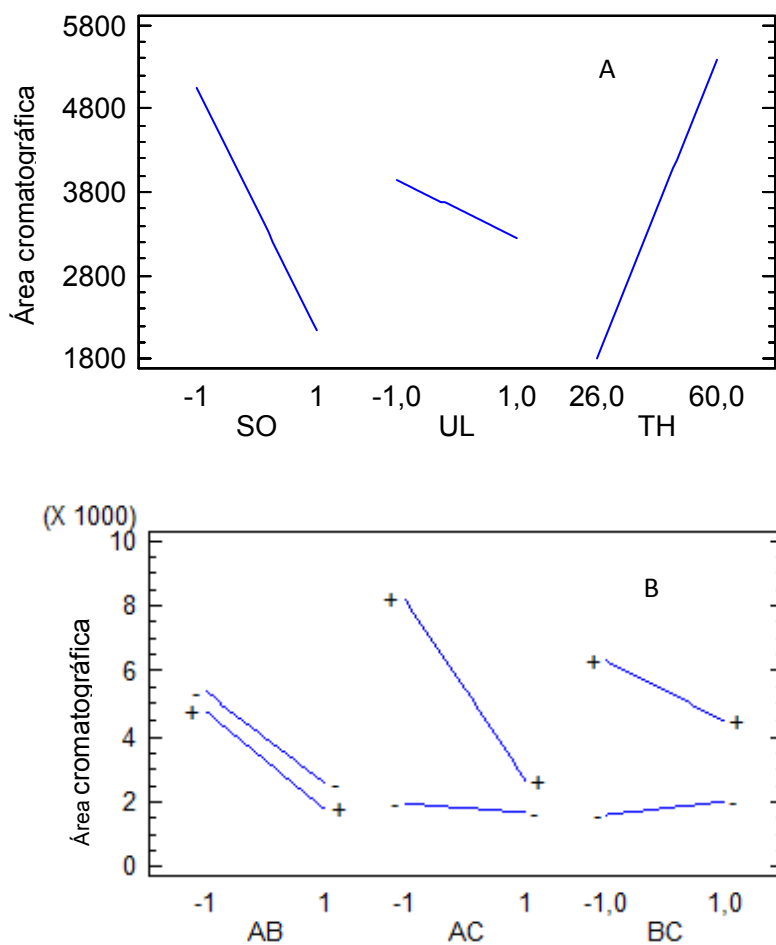


Figura 22. A. Gráfica de efectos principales y B. Gráfica de las interacciones para el área cromatográfica.

Teniendo en cuenta el análisis anterior, se encontró que las mejores condiciones de extracción del analito de las muestras son aquellas, que se presentan en la

Tabla 7. Entonces para las muestras reales el procedimiento de extracción que se realizó fue: 1 g de muestra homogeneizada previamente se extrajo con 10 mL de agua por 1 hora, luego se desengrasó con *n*-hexano (extracción líquido-líquido 2 x 8 mL x 2 min), la fase acuosa se derivatizó con 3 µL de agua saturada de bromo (2% p/v), pH 0-3 (una pocas gotas de HBr concentrado) y exceso de KBr por 4 horas en agitación constante a 0 °C.

Tabla 7. Mejores condiciones encontradas para la extracción de la acrilamida de la matriz de las muestras de alimentos.

Factor	Valor
SO	Sin
UL	Sin
TH	60°C

La mezcla de reacción se extrajo con acetato de etilo (extracción líquido-líquido, 3 x 5 mL x 3 min), se concentró con flujo de nitrógeno y se realizó luego la limpieza del extracto en columnas de florisil de 3 cm (usando una pipeta *Pasteur*) y acondicionado con de *n*-hexano (2 mL), eluido con una mezcla de 10% acetona:hexano (4 mL) y lavado con una solución de 20% acetona:hexano (4 mL). Por último, todo el efluente de la columna de limpieza, se llevó a sequedad con flujo de nitrógeno, se reconstituyó con acetato de etilo, se adicionó trietilamina (2 µL), se agitó por 7 min y se aforó a 1 mL.

3.4. Determinación de las figuras analíticas de mérito.

El procedimiento para la determinación de las figuras de merito se describió en el **Numeral 2.5.**

3.4.1. Determinación de los niveles mínimos de detección y de cuantificación.

Para el cálculo de los niveles mínimos de detección y de cuantificación se siguieron las pautas descritas en el **Numeral 2.5.1**. En la **Tabla 8**, se muestran los niveles mínimos de detección y de cuantificación para el 2-bromopropenamida (derivado monobromado de la acrilamida).

Tabla 8. Nivel mínimo de detección y de cuantificación de la acrilamida (como 2-BPA) por GC-ECD.

Compuesto	NMD, µg/kg	NMC, µg/kg
2-BPA	4,6	9,2

El nivel mínimo de detección alcanzado está en el orden de magnitud de los niveles reportados en la literatura [28, 26] para este análisis.

3.4.2. Determinación del rango dinámico lineal.

El rango dinámico lineal se determinó con los valores obtenidos para la curva de calibración. En la **Tabla 9**, se muestran la pendiente de la curva (factor de respuesta, R_f), que mide la sensibilidad del método, y su desviación (S_{Rf}). El coeficiente de determinación R^2 mide el ajuste de la curva para el intervalo de concentraciones evaluado (10 – 1000 µg/L).

La **Tabla 9** muestra que el intervalo de concentraciones, que tienen una respuesta lineal, es el de 25-1000 µg/L, pues en este rango la desviación estándar relativa de los R_f calculados para cada punto es menor del 20%, además el R^2 indica que los puntos de la curva tienen buen ajuste a la tendencia lineal.

Tabla 9. Linealidad del método por GC-ECD, para 2-BPA.

Concentración, µg/mL	Área, cuentas	R _f
25	1.19E+04	474,20
50	1.95E+04	390,52
75	2.43E+04	323,91
100	3.31E+04	331,49
250	9.16E+04	366,30
500	1.99E+05	397,26
750	2.59E+05	344,69
1000	3.74E+05	374,49
Promedio		375,36
S_{Rf}		48
RSD		13%
R²		0.999
R_f curva completa		368.08

3.4.3. Evaluación de la precisión como repetibilidad de áreas cromatográficas.

En la **Tabla 10**, se muestra la desviación estándar relativa para las áreas obtenidas del quintuplicado de inyección del punto siete de la curva de calibración.

Tabla 10. Repetibilidad de áreas para el 2-BPA por GC-ECD.

P7	Áreas, cuentas					Promedio	RSD, %
	1	2	3	4	5		
500 µg/mL	1,99E+05	2,05E+05	2,02E+05	2,00E+05	1,73E+05	1,96E+05	7

El valor de la desviación estándar relativa muestra, que el método tiene buena precisión, tras cinco inyecciones sucesivas.

3.4.4. Evaluación de la exactitud como porcentaje de recuperación.

En la **Tabla 11** se muestran los porcentajes de recuperación de tres controles de muestras enriquecidas con solución de AA (10 ppm), comparados con la solución de BPA (60 ppb, concentración esperada en la muestra luego de la derivatización, debido a que el rendimiento global de la reacción es del 60%). Los porcentajes de recuperación se encuentran entre 60 y 69%, lo que indica que la recuperación del analito de la matriz de las muestras es buena y está dentro de los valores que exigen las Buenas Prácticas de Laboratorio.

Tabla 11. Porcentaje de recuperación del 2-BPA en las muestras de alimentos empacados.

Área BPA (60 ppb), cuentas	Área BPA en muestras control, cuentas	Porcentajes de recuperación, %	
2,15E+04	1	1,39E+04	64
	2	1,50E+04	69
	3	1,29E+04	60
	Promedio, %		64

3.5 Determinación de acrilamida en muestras reales.

Se analizaron cuatro muestras de alimentos, entre papas, yucas y plátanos fritos empacados. En los extractos obtenidos de 1 g de muestra, se pudo cuantificar acrilamida en concentraciones de 12,0 y 22,0 µg/kg, encontrándose la mayor cantidad en la muestra de hojuelas caseras de papa. Los resultados se muestran en la **Tabla 12**, que registra el promedio de las cantidades obtenidas en cada uno de los duplicados de las muestras y la desviación estándar, para estos duplicados.

Tabla 12. Concentración estimada de acrilamida en muestras reales.

Muestra	Concentración AA, µg/kg	SD (n=2)
Papa empacada comercial	17,1	0,7
Hojuelas de papa caseras	22,0	0,3
Plátanos empacados comercial	16,1	0,7
Yuca empacada comercial	12,0	0,5

Por su parte, la **Figura 23** muestra la comparación del cromatograma de una de las muestras y la solución de referencia de derivado BPA. Se observa, que en el cromatograma del extracto de la muestra aparece una señal, su tiempo coincide con el tiempo de retención del derivado monobromado de la acrilamida. El derivado fue cuantificado utilizando la curva de calibración presentada en el **Numeral 3.4.2**, a los valores encontrados se les aplicó el porcentaje de recuperación de 64%, y como resultado se tuvieron las cantidades presentadas en la **Tabla 12**.

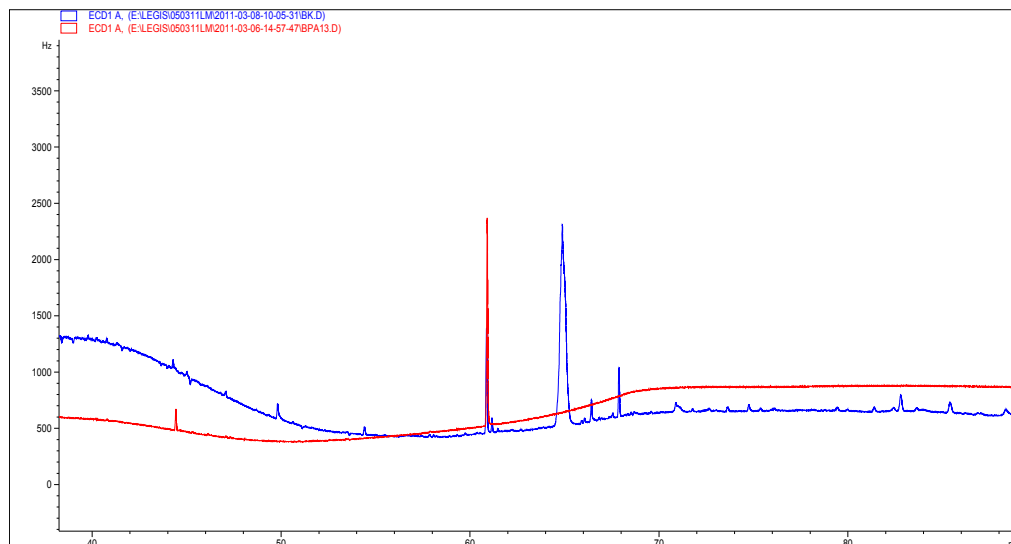


Figura 23. Comparación de cromatogramas de (1) una muestra real (azul) y (2) una solución de BPA de referencia (rojo), GC-ECD. Columna DB-WAX (60 m).

Comparando las concentraciones obtenidas de acrilamida, en los alimentos analizados, con los reportados en la literatura para productos a base de papa, se encuentran que estos últimos superan $1000\mu\text{g}/\text{kg}$ [28, 31], valores mayores que las concentraciones obtenidos con la metodología presentada, sin embargo, la tendencia de que en papa la concentración es más alta comparado con otras matrices (café, cereales, entre otros), se mantiene, pues aunque no hay reportes de concentración de acrilamida en yuca o en plátano, las concentraciones encontradas en estos alimentos son menores que los encontrados en papa.

4. CONCLUSIONES

- ✓ Se establecieron las condiciones de síntesis para la obtención del derivado dibromado de la acrilamida 2,3-DBPA y su producto de eliminación del bromo, 2-BPA. La estructura química de la 2,3-DBPA y de la 2-BPA se confirmó por espectroscopia infrarroja, espectrometría de masas y con base en el punto de fusión. Se encontró, que la relación molar 1:8 de acrilamida:bromo es la adecuada, para obtener producto 2,3-DBPA en mayor proporción. Para la reacción de eliminación que conduce a la formación de 2-BPA, la relación molar adecuada es 1:3 para 2,3-DBPA:triethylamina y el mejor tiempo de reacción es de 7 min.
- ✓ Mediante un diseño de experimentos 2³, se pudo establecer que el efecto *salting out* y el tratamiento con ultrasonido no favorecieron el proceso de extracción de acrilamida de la matriz de las muestras de alimentos, mientras que temperaturas mayores a 26°C si beneficiaron el proceso. Así se determinó que las mejores condiciones de preparación de las muestras, con las cuales se obtuvo mayor respuesta por GC-ECD, fueron: temperatura de 60°C, sin adición de sal, ni utilización de ultrasonido.
- ✓ Se implementó el método cromatográfico y se establecieron niveles mínimos de detección y cuantificación en el orden de partes por billón, 4,9 y 9,2 µg/kg, respectivamente, la respuesta lineal se observa en el rango de concentraciones 25-1000 µg/L y el coeficiente de variación para la repetibilidad de las áreas cromatográficas para el BPA fue 7%. El método implementado tiene una buena precisión, y alta sensibilidad para determinar el analito en la muestra presente en concentraciones bajas.

- ✓ Se obtuvieron porcentajes de recuperación de 60-69%, lo que muestra que el método de extracción fue aceptable para la extracción de acrilamida de las muestras de alimentos; además, estos porcentajes están de acuerdo con los exigidas por las Buenas Prácticas de Laboratorio.
- ✓ Las concentraciones obtenidas de acrilamida en las papas fritas, fue de 22,0 y 17,1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, valores menores a los reportados en la literatura para productos elaborados a base de papa (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Sin embargo, con ellos se pudo calcular que una persona de 70 kg de peso puede comer hasta 212 paquetes de papas de 15 g para alcanzar el valor de la ingesta crónica permitida.
- ✓ Se encontró que la concentración de acrilamida en yuca y en plátano, fue de 12 y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, para estas matrices no se encuentra reportes en la literatura de la concentración de acrilamida, con la cual se pueda comparar, sin embargo aunque los valores encontrados son bajos la ingesta sucesiva de estos productos contribuyen a la acción nociva de la acrilamida presente en ellos.

5. RECOMENDACIONES

- ✓ La bromación de la acrilamida constituye una ruta de derivatización sencilla y que conduce a un compuesto que presenta alta respuesta en el detector de captura de electrones. Sin embargo, el bromo es un compuesto altamente corrosivo y tóxico por inhalación, por lo que se recomienda buscar nuevos mecanismos de bromación, en donde el bromo se forme *in situ*, i.e., así como otras rutas de derivatización, donde se aproveche el grupo amida de la acrilamida.
- ✓ Sabiendo que la extracción de la acrilamida de la matriz de las muestras se beneficia con el aumento de la temperatura, se recomienda hacer un estudio donde se varíe la temperatura de extracción para encontrar el valor que conduzca a un porcentaje de recuperación del analito mayor.
- ✓ Se recomienda hacer el estudio utilizando otras matrices, tales como cereales, café y pan, en las cuales, según la literatura científica también se reportan cantidades significativas de acrilamida, en el orden de 200-500 µg/kg.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] ANDRAWES F., GREENHOUSE S., DRANEY D. Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. 1987, 399, p 269-275.
- [2] BERMUDO Elisabet, et al. Analysis of acrylamide in food products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis. Spain. J. Chromatogr. A. 2006. 1129. p 129–134.
- [3] CAREY, Francis A. Organic Chemistry. Fourth edition. McGraw-Hill Higher Education. United States. 2000, p 181-187.
- [4] CALDERON, Carlos E. Manual para la interpretación de espectros infrarrojos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá. 1985, p 26-30.
- [5] CEBALLOS H. y De La CRUZ G. La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción, procesamiento, utilización y comercialización. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Colombia. ISBN: 958-694-043-8. 2002. Capítulos 1 y 2.
- [6] COLOMBIA. Ministerio de Agricultura. Agrocadenas. La industria procesadora de papa, plátano y yuca: El mercado de pasabocas (snacks) y congelados en Colombia. Abril 2008. p 259-262.
- [7] COLOMBIA. Superintendencia de industria y comercio. Ministerio de Comercio, Industria y Turismo. Directorio de acreditados. Laboratorios de ensayo. Fecha de revisión: Enero 2010. Tomado de: www.sic.gov.co. Fecha de consulta: 20 de enero 2010.
- [8] ESPINAL CF., MARTÍNEZ HJ., PINZÓ N., BARRIOS CA. La cadena de la papa en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Observatorio Agrocadenas Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. Marzo 2005, p 11-15.
- [9] ESPINAL CF., MARTÍNEZ HJ., PEÑA Y. La cadena del plátano en Colombia. Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Observatorio

Agrocadenas Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Bogotá. Marzo 2005, p 4-8.

[10] ESTADOS UNIDOS. Environmental Protection Agency. Method 8032A. Acrylamide by Gas Chromatography. Tomado de: www.epa.gov. Fecha de consulta: 24 de noviembre 2009.

[11] FRANCIA. International Agency for Research on Cancer IARC. IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. Acrylamide. 1994, 60, p 389-433.

[12] GARCIA A. y ALFARO MP. Acrilamida en alimentos para consumos humano. Rev. Sanid. Milit. Mex. 2007, 61(6), p 384-388.

[13] GÖKMEN V., ŞENYUVA H. A generic method for the determination of acrylamide in thermally processed foods. Turkey. J. Chromatogr. A. 2006, 1120, p 194–198.

[14] GUTIÉRREZ H., De La VARA R. Análisis y diseño de experimentos. Mc Graw Hill. México. 2008, p 183-191.

[15] JENNINGS, Walter. Analytical Gas Chromatography. Second edition. Academic Press. England, 1997, p 1-28.

[16] KAIRUZ de C, Luz A. Introducción al estudio de la composición de los alimentos. Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Colección Julio Carrozo Valenzuela. N 10. Colombia. 2002. p 89, 95, 97.

[17] KITSON, Fulton G. Gas Chromatography and Mass Spectrometry. Academic Press. United States, 1996, p 3-5.

[18] KITSON F., LARSEN B., McEWEN C., Gas chromatography and Mass spectrometry: A practical guide. Academic Press. United States. 1996, p 69.

[19] KOPP E. y DEKANT W. Toxicokinetics of acrylamide in rats and humans following single oral administration of low doses. Germany. Toxicol. Appl. Pharm. 2009, 235, p 135–142.

[20] LIU J., ZHAO G., YUAN Y., CHEN F., HU X. Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. PR China. Food Chem. 2008, 108, p 760–767.

- [21] MASSON L., MUÑOZ JR., ROMERO N., CONRADO C., ENCINA C., HERNÁNDEZ L., CASTRO J., ROBERT P. Acrilamida en patatas fritas: Revisión actualizada. Chile. *Grasas y aceites*. ISSN: 0017-3495. 2007, 58 (2), p 185-193.
- [22] MORENO N. IM, RUBIO A. C, GUTIERREZ F. AJ, CAMEÁN F. AM, HARDISSON T. A. La acrilamida, contaminante químico de procesado. Revisión área de toxicología de la Universidad de Sevilla. España. *Rev. Toxicol.* 2007, 24, p 1-9.
- [23] MORRISON, Robert. *Química Orgánica*. Quinta edición. Pearson Addison Wesley. Mexico 1998, p 295-99.
- [24] PITTET A., PÉRISSET A., OBERSON JM. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography–mass spectrometry. Switzerland. *J. Chromatogr. A*. 2004. 1035. p 123–130.
- [25] RYDBERG P., ERIKSSON S., TAREKE E., KARLSSON P., EHRENBORG L., TÖRNQVIST M. Factors that influence the acrylamide content of heated foods. Sweden. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. 2005, p 317-328.
- [26] ROTTERDAM. Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos. Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias. Documento de debate sobre la acrilamida. 22 – 26 de marzo de 2004. Tomado de: www.codexalimentarius.net. Fecha de consulta: 28 de Octubre 2010.
- [27] SUECIA. National Food Administration SNFA. Analytical methodology and survey results of acrylamide in foods. April 26, 2002. Tomado de: <http://www.slv.se/en-gb>. Fecha de consulta: 9 de Diciembre 2009.
- [28] SUIZA. World Health Organization. Health Implications of Acrylamide in Food. Report of a Joint FAO/WHO Consultation WHO Headquarters. 25-27 June **2002**. Tomado de: www.who.int. Fecha de consulta: 15 de noviembre 2009.
- [29] TAREKE E., RYDBERG P., KARLSSON P., ERIKSSON S., TÖRNQVIST M. Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. Sweden. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50, p 4998-5006.
- [30] WANG H., LEE A., SHUANG S., CHOI M. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. PR China. *Microchem. J.* 2008, 89, p 90–97.

[31] ZHANG Y., DONG Y., REN Y., ZHANG Y. Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. PR China. *J. Chromatogr.* **2006**, 1116, p 209-216.

[32] ZYZAK D., SANDERS R., STOJANOVIC M., TALLMADGE D., EBERHART B., EWALD D., GRUBER D., MORSCH T., et al. Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. United States. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51, p 4782-4787.

ANEXOS

Anexo A. Propiedades físico- químicas de la AA.

Propiedad	Valor
Sinónimo	2-Propenamida
N° CAS	79-06-1
Peso molecular	71,08 g/mol
Peso específico	1,1222
Punto de ebullición	125°C
Punto de fusión	84,5°C
Densidad de los vapores (respecto al aire=1)	2,4
Presión de vapor a 20°C	0,007 mmHg
Productos de descomposición	NH ₃ , CO, CO ₂ , NO, H ₂
Incompatibilidad	Ácidos, Agentes oxidantes y bases

Anexo B. Análisis cuantitativo, usando la Base de Datos *Web of Science* (ISI *Web of Knowledge*, Thomson, Versión 3.0) Periodo de observación: 2001-2011.

<i>Web of Science</i>				
N° de registros	Ec. 1 (331)	Ec. 2 (121)	Ec. 3 (118)	Ec. 4 (557)
AÑO	2005 (40)	2008 (21)	2008 (21)	2005 (80)
	2006 (50)	2007 (17)	2009 (17)	2009 (75)
AUTOR	Zhang Y (10)	Ren Yp (6)	Hidalgo Fj (6)	Tornqvist M (13)
	Wenzl T (9)	Zhang Y (7)	Zamora R (6)	Wenzl T (12)
PAÍS	Peoples R. China (73)	Germany (25)	Peoples R. China (19)	Germany (60)
	USA (43)	USA (23)	Germany (15)	USA (90)
FUENTE DE PUBLICACIÓN	J. Chromatogr. A (23)	J. Chromatogr. A (8)	J. Agric. Food Chem. (16)	J. Agric. Food Chem. (37)
	J. Applied Polymer Science (18)	Anal. Chim. Acta (6)	Food Chem. (12)	Food Chem. Toxicol. (21)
ÁREA	Chemistry, Analytical (120)	Chemistry, Analytical (47)	Food Science & Technology (60)	Food Science & Technology (240)
	Food Science & Technology (65)	Biochemical Research Methods (34)	Chemistry, Analytical (36)	Chemistry, Applied (100)
Fecha de búsqueda	Jun -17-2011			
Periodo de observación	2001-2011			
Ecuación 1	topic=determination and topic= acrylamide			
Ecuación 2	topic=quantification and topic= acrylamide			
Ecuación 3	topic=gas chromatography and topic= acrylamide			
Ecuación 4	topic=food and topic= acrylamide			

Anexo C. Relación de fabricantes y lotes de los solventes, los reactivos y el material de referencia utilizados en el presente trabajo.

	Fabricante	No de lote
Bromuro de potasio	Honeywell Riedel-De Haën	02110
Bromo para síntesis	Merck	S5474471
Ácido bromhídrico	Merck	
Acetato de etilo	Mallinckrodt	UN1173
Hexano	Merck	UN1208
Acetona	Merck	UN1090
Acrilamida	Dr. Ehrenstofer	70926
Florisil	J.T. Baker	J28592
Trietilamina	Merck	S6068952

Anexo D. Propiedades físicas de la 2,3-dibromopropionamida.

N° CAS	15102-42-8
Masa molecular	230.89 g/mol
Punto de fusión	132-133°C

