



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DEL ESTADO DE HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS
E INGENIERÍA**



ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

DISEÑO DE UNA METODOLOGÍA DE PRECONCENTRACIÓN Y ANÁLISIS DE
ACRILAMIDA EN BOTANAS BASADA EN LA COMBINACIÓN DE INTERCAMBIO
ANIÓNICO Y HPLC.

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIADO EN QUÍMICA

PRESENTA:

LORENA CAMARGO MEDRANO

DIRECTORES:

DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ

DR. ISRAEL SAMUEL IBARRA ORTEGA

MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO

OCTUBRE, 2016



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Institute of Basic Sciences and Engineering
Área Académica de Química
Chemistry Department

M. en A. JULIO CÉSAR LEINES MEDÉCIGO,
DIRECTOR DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DE LA U.A.E.H.,
Presente:

Por este medio le comunico que el Jurado asignado a la Pasante de Licenciatura en Química **Lorena Camargo Medrano**, quien presenta el trabajo de titulación "**Diseño de una metodología de preconcentración y análisis de acrilamida en botanas basada en la combinación de intercambio aniónico y HPLC**" después de revisar el trabajo en reunión de Sinodales ha decidido autorizar la impresión del mismo, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación firman de conformidad los integrantes del Jurado:

PRESIDENTE: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal
PRIMER VOCAL: Dra. Eva María Santos López
SEGUNDO VOCAL: Dr. José Antonio Rodríguez Ávila
TERCER VOCAL: L. Q. A. Andrés García Guerrero
SECRETARIO: Dra. María Elena Páez Hernández
PRIMER SUPLENTE: Dra. Esmeralda Rangel Vargas
SEGUNDO SUPLENTE: Dr. Israel Samuel Ibarra Ortega

Sin otro particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

ATENTAMENTE
"Amor, Orden y Progreso"
Mineral de la Reforma, Hidalgo a 16 de agosto de 2016.

Dra. Myriam Meléndez Rodríguez
Coordinadora Adjunta de la Lic. en Química



Instituto de Ciencias Básicas e Ingeniería
Área Académica de Química

Ciudad del Conocimiento
Carretera Pachuca - Tulancingo km. 4.5
Colonia Carboneras
Mineral de la Reforma, Hidalgo, México, C.P. 42184
Tel. +52 771 7172000 exts. 2200 y 2201, Fax 6502
aaq_icbi@uaeh.edu.mx

www.uaeh.edu.mx





Esta investigación fue apoyada por el Programa de Estímulos a la Investigación, Desarrollo e Innovación Tecnológica del CONACYT, convocatoria 2016, en la modalidad INNOVATEC, Proyecto número 232271, de la Empresa FRITOS TOTIS, S.A. de C.V.

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada quiero agradecer a mi familia que me ha brindado su apoyo incondicional. Agradezco todo lo que has hecho por mí papá, porque sin ser tu obligación me has apoyado e impulsado a llegar hasta donde hoy estoy, motivándome a no darme por vencida y a siempre querer más. A ti mamá te debo todo lo que soy, eres una mujer excepcional: fuerte e inteligente, tengo muchas cosas que aprender de ti, gracias por no tirar la toalla conmigo y por ser mi mamá, te amo. A mis pollos (Mara y José), que sin ellos la vida no sería tan divertida, interesante y por qué no estresante, los amo hermanos.

Me gustaría agradecer de manera muy especial al Dr. José Antonio y al Dr. Israel por confiar en mí y en mi trabajo, por enseñarme a pensar como químico y por tener la paciencia suficiente que requirió ese proceso, por ser más allá de asesores, un apoyo siempre que lo necesité. De igual manera agradezco el apoyo brindado a la Dra. Eva durante la revisión y realización de este proyecto, así como a los sinodales que con sus aportaciones hicieron de este un mejor trabajo.

Gracias a todas aquellas personas (doctores, compañeros y amigos) que hicieron de mi paso por la universidad una experiencia inolvidable. Lewis gracias amigo por las largas jornadas de asesoría que me brindaste. A mis queridos amigos orgánicos por tratarme como un miembro más del laboratorio: Naye, Clau, Eve y Beto. También agradezco a mis compañeros de laboratorio 1 y 2 por integrarme al grupo de trabajo y ayudarme cuando fue necesario.

Jorge que más que mi amigo has sido mi cómplice haciendo de cada momento a tu lado único, espero que nuestra amistad perdure, te adoro. Erick gracias por las largas charlas y la confianza brindada. Finalmente gracias a ti Eric por cada momento compartido.

*La vida es como una bicicleta. Para
mantener el equilibrio tienes que
seguir adelante.*

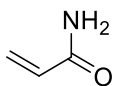
Albert Einstein.

Resumen

La acrilamida es un compuesto secundario derivado del tratamiento térmico de alimentos ricos en carbohidratos y proteínas, estudiado debido a su elevado efecto tóxico en la salud. Dentro de los alimentos que contienen mayor cantidad de acrilamida se encuentran aquellos derivados de papa, como papas fritas o papas a la francesa.

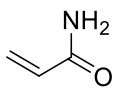
Las técnicas instrumentales para el análisis de acrilamida son muy variadas, sin embargo, la cromatografía líquida de alta resolución resulta ser de las más utilizadas debido a su alta reproducibilidad y sensibilidad. No obstante, para el análisis de este compuesto se requiere de un pre-tratamiento de la muestra que conlleva la derivatización del analito para que pueda ser detectable en el equipo cromatográfico.

En el presente trabajo evalúa un método de extracción por intercambio iónico en la determinación de acrilamida empleando el ácido 4-mercaptobenzoico como agente derivatizante en muestras de botanas por cromatografía de líquidos de alta resolución. La metodología propuesta se llevó a cabo en tres etapas A) Optimización del proceso de derivatización de acrilamida, B) Condiciones de análisis por HPLC-DAD y C) Optimización del pretratamiento de la matriz analítica mediante intercambio iónico. Partiendo de diversos estudios se obtuvieron las condiciones óptimas: Separación por HPLC (flujo $0.800 \text{ ml min}^{-1}$, 290 nm , ACN:HAc (1%) 20:80, tiempo de análisis 29 min), reacción de derivatización, temperatura de $80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 min , empleando 1 g de resina de intercambio aniónico en el sistema de extracción, 5 ml de extracto acuoso de papas con un tiempo de contacto de 30 min y una solución de metanol acidificada con $\text{HCl } 1 \times 10^{-3} \text{ M}$ como solución eluyente en la reextracción de la acrilamida. Bajo las condiciones óptimas de análisis se obtuvo un límite de detección de $0.482 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$ y límite de cuantificación de $1.445 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$ con una repetitividad y reproducibilidad menores al 10% en términos de desviación estándar relativa durante todos los experimentos realizados.



CAMARGO MEDRANO LORENA

El método desarrollado en el proceso de derivatización es una alternativa robusta en el análisis de acrilamida por cromatografía de líquidos de alta resolución en muestras de papa, esta metodología puede ser acoplada a diversas técnicas analíticas de extracción y cuantificación de acrilamida.



Índice General

	Índice de figuras	i
	Índice de tablas	iii
1	Introducción	2
1.1	Contaminantes químicos de procesado en alimentos	3
1.1.1	Clasificación estándar de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)	3
1.1.2	Hidrocarburos aromáticos policíclicos	5
1.1.3	Cloropropanos y cloroésteres	6
1.1.4	Aminas heterocíclicas	7
1.1.5	Furano	9
1.2	Acrilamida (AA)	10
1.2.1	Acrilamida en alimentos	10
1.2.2	Mecanismo de formación de acrilamida en alimentos	12
1.2.3	Metabolismo y biotransformación	15
1.2.4	Toxicidad	16
1.2.5	Vías de exposición	19
1.2.6	Determinación de acrilamida y métodos analíticos	20
1.2.7	Métodos no cromatográficos	21
1.2.8	Métodos cromatográficos	24
1.2.9	Derivatización	32
2	Objetivos	37
2.1	Objetivo general	37
2.2	Objetivos específicos	37
3	Metodología experimental	39
3.1	Reactivos	39

3.2	Material y equipo	39
3.3	Desarrollo experimental HPLC-DAD	40
3.4	Optimización del sistema	41
3.4.1	Procedimiento cromatográfico	42
3.4.2	Optimización del proceso de derivatización	42
3.4.3	Optimización del pretratamiento de la muestra	42
4	Resultados y discusión	45
4.1	Derivatización	45
4.1.1	Temperatura para la reacción de derivatización	47
4.1.2	Tiempo de reacción	48
4.2	Optimización del sistema de extracción	50
4.2.1	Cantidad de resina	51
4.2.2	Tiempo de intercambio iónico	53
4.2.3	Optimización del volumen de extracción	54
4.3	Elución del compuesto derivatizado	55
4.4	Determinación de los parámetros analíticos	57
5	Conclusiones	59
6	Referencias	61

Índice de figuras

Figura 1	Hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor toxicidad	6
Figura 2	Cloropropanos y cloroésteres más comunes	7
Figura 3	Aminas heterocíclicas de mayor toxicidad	8
Figura 4	Estructura química del furano	9
Figura 5	Estructura química de la acrilamida	11
Figura 6	Esquema de reacción de Maillard	12
Figura 7	Mecanismo de reacción de Maillard	13
Figura 8	Mecanismo de formación de acrilamida por vía general y específica de aminoácidos	14
Figura 9	Diagrama de rutas alternativas para la obtención de acrilamida	15
Figura 10	Metabolismo de la acrilamida en el cuerpo humano	17
Figura 11	Esquema de reacción de bromación de acrilamida	33
Figura 12	Esquema de reacción de la Sililación de acrilamida	34
Figura 13	Reacción de derivatización de acrilamida con ácido 2-mercaptobenzoico.	34
Figura 14	Esquema de reacción de derivatización de acrilamida con ácido 4-mercaptobenzoico	45
Figura 15	Esquema de reacción derivatización de acrilamida con ácido 4-mercaptobenzoico	46
Figura 16	Cromatograma correspondiente al análisis de acrilamida (10 mg l-1), acrilato de metilo (20 mg l-1) y ácido 4-mercaptobenzoico (50 mg l-1).	47
Figura 17	Estudio de la temperatura en la reacción de derivatización	48
Figura 18	Evaluación del tiempo de derivatización, cromatogramas A) 20 min, B) 30 min, C) 40 min y D) 50 min.	49
Figura 19	Esquema de extracción de acrilamida por intercambio iónico	50

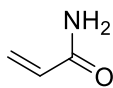
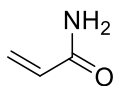
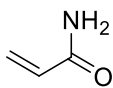


Figura 20	Evaluación de la retención de acrilamida con resina, cromatogramas A) 0 g de resina, muestra derivatizada con 10 ppm de AA; B) 1 g de resina, remanente de la solución en contacto con la resina.	52
Figura 21	Tiempo de contacto en el proceso de extracción por intercambio iónico, A) 15 min, B) 30 min y C) 45 min.	53
Figura 22	Evaluación del volumen óptimo para el intercambio iónico, cromatogramas A) 5 ml, B) 10 ml y C) 15 ml.	55
Figura 23	Elución de acrilamida con MeOH-HCl. Cromatogramas: A) Muestra estándar con 10 ppm AA; B) Solución remanente después de la extracción con resina; C) Elución de AA con MeOH-HCl	56



Índice de tablas

Tabla 1	Clasificación de sustancia según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)	4
Tabla 2	Análisis de acrilamida por métodos no cromatográficos: Electroforesis capilar (CE)	23
Tabla 3	Análisis de acrilamida por métodos cromatográficos: Cromatografía de gases (GC)	26
Tabla 4	Análisis de acrilamida por métodos cromatográficos: Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	31
Tabla 5	Parámetros de regresión de las líneas de calibrado con extracto acuoso de papas	57





INTRODUCCIÓN



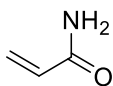
1. Introducción

El procesado de alimentos representa aquellas técnicas (domésticas e industriales) que proveen de diferentes características a los alimentos crudos. Éste proceso se lleva a cabo en diversas fases que van desde la elección del producto o materia prima para su tratamiento, hasta el empaquetamiento y distribución de los alimentos procesados que son comercializados y consumidos.

Uno de los principales objetivos del procesado de alimentos es esencialmente la preservación de éstos, aumentando su vida útil, confiriendo características organolépticas que mejoran la apariencia física y el sabor de los mismos. Con este principio y con la evolución del procesado de alimentos, actualmente existen diversas tecnologías que permite modificar su composición química, para mejorar el valor nutrimental y microbiológico de los productos procesados (Brennan, 2006).

Dentro de las técnicas utilizadas para el procesamiento de los alimentos se incluyen procesos como: selección de la materia prima, secado, salado, congelación, lavado, y tratamientos térmicos, entre otros (Tritscher, 2004; Brennan, 2006; Juárez et al. 2016; Singh et al., 2016). A pesar de todas las contribuciones favorables que derivan del procesado de alimentos, también se ha demostrado que durante este proceso ciertos productos alimenticios pueden adquirir, de forma directa o indirecta, compuestos orgánicos secundarios tóxicos derivados del proceso de cocción o del medio en el que se obtuvieron (Hird et al., 2014).

Una de las técnicas más utilizadas para el procesado de alimentos, es el tratamiento térmico de los mismos, que incluye el calentamiento de los alimentos, cocción, congelamiento, empaquetado y sellado (Brennan, 2006). Este tratamiento es responsable de la formación de algunos contaminantes tóxicos de suma importancia, cuya síntesis depende directamente del proceso de cocción. (Jägerstad y Skog, 2005).



1.1 Contaminantes químicos de procesado en alimentos

Un contaminante químico es aquel elemento o compuesto cuyo estado y características fisicoquímicas le permiten entrar en contacto con los individuos, de forma que pueden originar un efecto contraproducente en la salud.

La vía principal de exposición a contaminantes químicos derivados del procesado de alimentos es la ingesta de productos alimenticios contaminados con diversos compuestos producidos o incorporados durante su elaboración. Estos contaminantes se pueden añadir a los alimentos de forma voluntaria o involuntaria, incluyendo aquellos formados como productos secundarios durante su procesado. Por otro lado, ciertos productos pueden contener toxinas naturales y contaminantes que adquieren de diversas fuentes como: residuos de pesticidas presentes en productos de origen vegetal o antibióticos veterinarios presentes en cárnicos, entre otros (Hird et al., 2014).

1.1.1 Clasificación estándar de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)

La agencia internacional para la investigación del cáncer (IARC) junto con la Organización Mundial de la Salud (OMS), es encargada del estudio y evaluación del riesgo en el desarrollo de cáncer por contacto con sustancias o componentes químicos. Con base a las diversas pruebas que se realizan para evaluar las sustancias, la IARC puede clasificarlas de acuerdo a la Tabla 1, como (IARC, 2016):

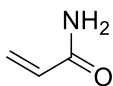
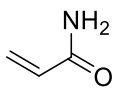


Tabla 1. Clasificación de sustancias según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC)

Grupo	Descripción	Sustancia química	Alimentos
Grupo 1	Carcinógeno para humanos.	Formaldehído	Carne procesada
		Benzo[a]pireno	Tabaco
		Benceno	Bebidas
		Cloruro de vinilo	alcohólicas
		1,2-dicloropropano	
Grupo 2^a	Probablemente carcinógeno para humanos.	Acrilamida	Papas fritas
		Etil carbamato	Carne roja
		Dibenzo[a,h]antraceno	
Grupo 2B	Posiblemente carcinógeno para el ser humano	Benzo[a]antraceno	Café
		Cloroformo	
		1-amino-2-metilntraquinona	
		1,3-dicloro-2-propanol	
		Furano	
Grupo 3	No puede ser clasificado respecto a su carcinogenicidad para el ser humano.	Cloroacetnitrilo	No Reportado
		Melamina	
		Tolueno	
		Fenol	
		Antraceno	
Grupo 4	Probablemente no carcinógeno para el ser humano.	Caprolactama	No Reportado

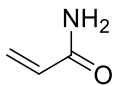
Dentro de los contaminantes químicos de mayor interés por su alto riesgo a la salud y elevada neurotoxicidad, toxicidad reproductiva y posible genotoxicidad cancerígena (Tritscher, 2004) destacan: los hidrocarburos aromáticos policíclicos, (HAPs) cloropropanos, cloroésteres, aminas heterocíclicas (HCAs), furanos y la acrilamida (AA), siendo los contaminantes más comúnmente encontrados en diversos alimentos procesados (Domingo y Nadal, 2016).



1.1.2 Hidrocarburos aromáticos policíclicos

Los compuestos hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs) se caracterizan por tener dos o más anillos de benceno unidos entre sí, (ATSDR, 1995) son compuestos orgánicos altamente hidrofóbicos, que en su estructura se encuentran formados principalmente por átomos de carbono e hidrógeno (Singh et al., 2016); generados por condensación de compuestos orgánicos mediante pirólisis y pirosíntesis. Diversos estudios (Jägerstad y Skog, 2005) han comprobado que los niveles de HAPs aumentan linealmente en un intervalo de temperatura entre 400-1000 °C, originando la descomposición de estructuras complejas formando compuestos químicos de menor peso molecular, principalmente radicales libres (pirólisis) los cuales se unen para formar compuestos aromáticos polinucleares estables (pirosíntesis) (Singh et al. 2016). A temperaturas por debajo de 400 °C la formación de HAPs policíclicos es de menor proporción; sin embargo una vez producidos este tipo de compuestos son fácilmente retenidos por alimentos o sustancias ricas en grasa debido a su carácter lipofílico (Singh et al. 2016).

En la industria alimentaria, los alimentos donde se han encontrado mayor cantidad de este tipo de contaminantes abarca una gran gama que va desde las nueces y bebidas (té y café), hasta ciertos productos cárnicos, como carnes ahumadas y procesadas. Los niveles de contenido de HAPs dependen de la técnica de procesado (rostizado, asado, procesos de fritura, calentamiento, ahumado, secado u horneado), el contacto con fuentes de calor, el combustible empleado durante la cocción (aceites vegetales, grasas animales, carbón, madera o derivados de petróleo), y el tiempo de procesado. (Singh et al., 2016). Debido a su elevada disponibilidad diversas agencias como la Agencia para Sustancias Tóxicas y Registro de Enfermedades de Estados Unidos (ATSDR) ha realizado diversos estudios, corroborando que los HAPs se encuentran generalmente como mezclas complejas, formados como parte de subproductos en la combustión y en el tratamiento de diversos compuestos utilizados durante el procesado de alimentos (ATSDR, 1995).



Por otro lado, la Agencia de Protección Ambiental (EPA) y la IARC, han clasificado a los HAPs como contaminantes químicos probablemente carcinógenos de alto riesgo, entre los cuales los de mayor importancia son: benzo[a]pireno, benzo[a]antraceno y el dibenzo[a,h]antraceno (fig. 1) (ATSDR, 1995; Jägerstad y Skog, 2005; Singh et al. 2016).

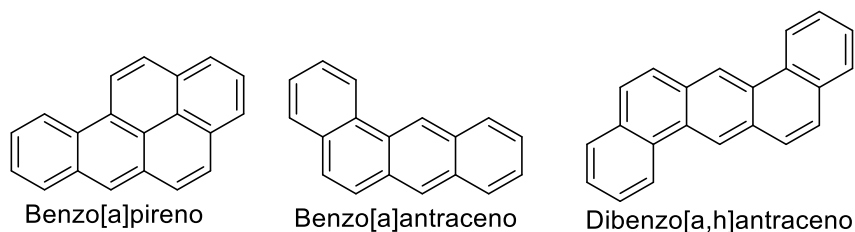
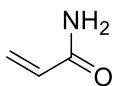


Figura 1. Hidrocarburos aromáticos policíclicos de mayor toxicidad.

1.1.3 Cloropropanos y cloroésteres

Los compuestos como los cloropropanos y cloroésteres son contaminantes de gran interés en la industria alimentaria, y son producidos por cloración de glicerol o glicéridos que reaccionan con iones cloruro. Estos compuestos se forman como producto secundario durante la elaboración de determinados alimentos tanto en procesos industriales como domésticos, generados por la hidrólisis ácida de la proteína vegetal presente en ciertos productos crudos como trigo, arroz, semillas de soja y algunos frutos secos (Chung et al. 2002; Crews C., 2014).

Por otra parte los ésteres de ácidos grasos derivados del 3-cloro-1,2-propanodiol (3-MCPD), (cloroésteres) son obtenidos mediante la hidrólisis del cloropropanol una vez producido durante la elaboración de ciertos alimentos (Zhou et al., 2014; Crews C., 2014), así como en el procesado a altas temperaturas de diversas matrices con abundante contenido graso (Ermacora y Hrnčirik, 2014; Zhou et al., 2014).



Altos niveles de estos compuestos han sido encontrados en alimentos procesados, siendo el 3-MCPD y el 1,3-dicloro-2-propanol (1,3-DCP) (fig. 2) los más abundantes, los cuales han sido clasificados por el Comité Científico Alimentario (SCF) de Estados Unidos (2001) como posibles agentes carcinógenos (Tritscher, 2004); indicando así un límite máximo de ingesta diaria de $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal para el 3-MCPD. (Ermacora y Hrnčirik, 2014).

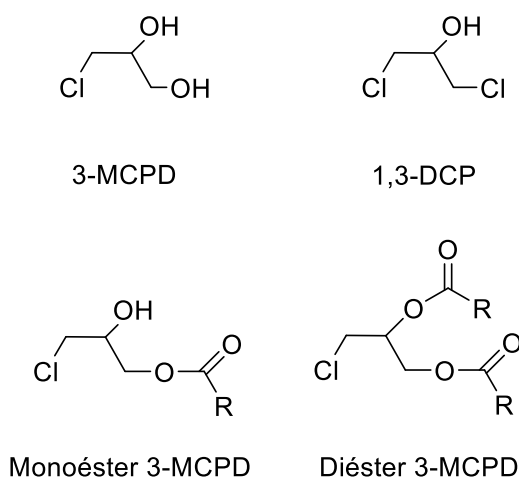
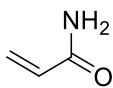


Figura 2. Cloropronanos y cloroésteres más comunes

1.1.4 Aminas heterocíclicas

Las aminas heterocíclicas (HCAs) son compuestos formados generalmente por dos o tres anillos con un grupo amino exocíclico. Este tipo de sustancias son producidas durante el proceso de cocción de carnes y pescado, debido a la presencia de precursores (aminoácidos y proteínas) en músculos de pescado y carne cruda. (Galceran, 2002; Jägerstad y Skog, 2005).

Dependiendo de su estructura química estas se pueden dividir en cuatro familias: aminocarbólinas (AC), imidazo-quinolinas (IQ), imidazopiridinas (PhIP) e imidazoquinoxalinas (MeIQx) (Jägerstad y Skog, 2005), siendo las imidazopiridinas, imidazoquinolinas e imidazoquinoxalinas formadas como producto de la reacción de



Maillard a partir de la reacción entre la creatina o creatinina con algunos aminoácidos libres y azúcares presentes en la matriz. Mientras que las aminocarbonilas o aminas pirolíticas se forman por pirólisis de aminoácidos o proteínas vía reacciones radicalarias a temperaturas mayores a 300 °C (fig.3).

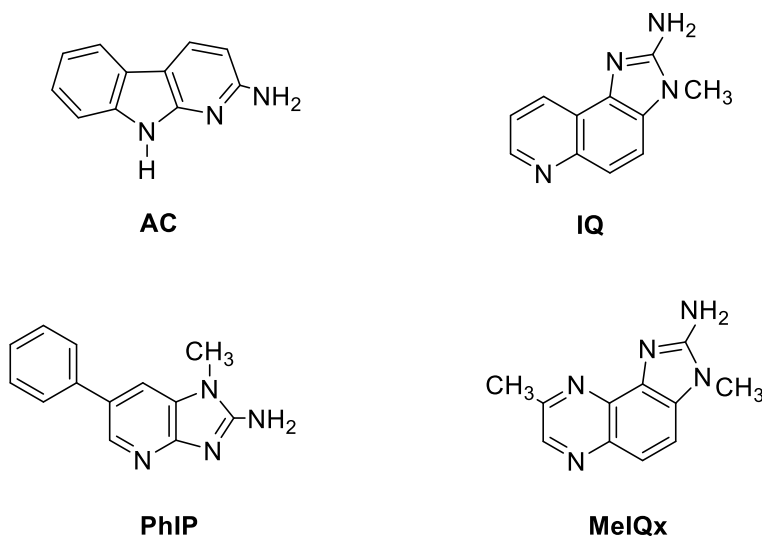
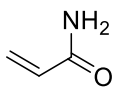


Figura 3. Aminas heterocíclicas de mayor toxicidad.

Las HCAs son sustancias clasificadas como agentes carcinógenos, cuya exposición prolongada pueden originar el desarrollo de una gran variedad de tumores en múltiples órganos. Adicionalmente las HCAs pueden presentar un índice de mutagenicidad hasta más de 100 veces superior a compuestos HAPs. (Galceran, 2002; Jägerstad y Skog, 2005; Bover-Cid et al. 2014).



1.1.5 Furano

El furano es un éter cíclico de bajo peso molecular de carácter aromático (fig. 4). (Crews and Castle, 2007). Se trata de un compuesto orgánico lipofílico, incoloro y volátil que en la década de los 60's fue encontrado en una gran variedad de alimentos sometidos a tratamientos térmicos como carnes procesadas, asadas, productos fritos, sopas, y en algunos alimentos para recién nacidos (Nie et al, 2013). Debido a la alta volatilidad del furano, los análisis químicos para determinar su presencia en alimentos son escasos y de alta complejidad (Crews C., 2014).

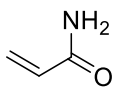


Furano

Figura 4. Estructura química del furano

La generación de este compuesto puede ser mediante seis posibles vías: 1) reacción entre un aminoácido específico con un azúcar reductor 2) degradación térmica de aminoácidos; 3) oxidación de ácidos grasos poliinsaturados; 4) descomposición de ácido ascórbico o sus derivados; 5) oxidación térmica de carotenoides y 6) modificación estructural de algunos carbohidratos (Nie et al, 2013; Kim et al., 2010).

La formación de furano durante el tratamiento térmico puede verse afectada o promovida por diversos factores como: temperatura, pH, presencia de aminoácidos, ácidos grasos, entre otros; siendo las temperaturas mayores a 100 °C favorables para la producción de este contaminante (Fan X., 2015). Adicionalmente diversos estudios han demostrado que una gran variedad de procesos de fritura incrementan los niveles de furano producidos en los alimentos (Juániz et al., 2016).



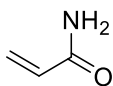
Diversas agencias gubernamentales como la IARC, el Departamento de Salud y Servicio Humano de USA (DHHS) y el Programa Nacional de Toxicología (NTP) han clasificado al furano como un potencial carcinógeno humano del Grupo 2B (Tabla 1) (Nie et al., 2013).

1.2 Acrilamida

La acrilamida (AA) o 2-propenamida (CAS No. 79-06-1) es un compuesto orgánico de tipo amida, que contiene un doble enlace electrófilo y un grupo amida (fig. 5). Se trata de un compuesto que es sólido a temperatura ambiente, de alta solubilidad en compuestos orgánicos polares y de polaridad media como: agua, alcoholes, y acetona. Una de las principales características de la AA es su fácil polimerización a temperaturas mayores a 85 °C (Wenzl et al., 2003). Es producida a escala industrial mediante hidrólisis catalítica de acrilonitrilo; y ha sido usada por casi 60 años en la síntesis de poliacrilamidas en diversas aplicaciones industriales como en la manufactura de varios productos plásticos, pigmentos, pegamentos, cosméticos, entre otros; así mismo la AA es utilizada en el tratamiento de aguas residuales, en la clarificación de agua potable, y como gel en la separación de proteínas u otros compuestos de interés mediante el uso de electroforesis (Wenzl et al., 2003; Skog y Viklund, 2014).

1.2.1 Acrilamida en alimentos

Dentro de las sustancias químicas de mayor importancia como resultado en el procesamiento de alimentos, la acrilamida es uno de los principales contaminantes por su alto grado de toxicidad en la salud humana y su elevada disponibilidad, tal y como se muestra en la Tabla 1. (IARC, 2016), siendo clasificada por la IARC como sustancia probablemente carcinógena del grupo 2A.



La exposición prolongada a esta sustancia puede provocar daño en el sistema nervioso central, presentando actividad mutanogénica, genotóxica y carcinógena. (Wenzl et al., 2003; Rice 2015; Oracz et al., 2011; Bethke y Bussan, 2013; Skog y Viklund, 2014).

En la industria alimenticia la AA es generada como subproducto en el procesamiento del alimento, como consecuencia de la reacción de Maillard, la cual se lleva a cabo entre la amina libre de la asparagina y un azúcar reductor u otros compuestos con grupos carbonilos

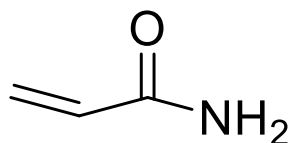
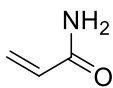


Figura 5. Estructura química de la acrilamida.

Diversas agencias internacionales como la Agencia Nacional Sueca de Alimentos (Swedish National Food Agency-SNFA) y la Universidad de Estocolmo han establecido que elevadas cantidades de acrilamida pueden ser encontradas en una gran variedad de alimentos fritos y horneados (Dybing et al., 2005), esta es formada como subproducto durante el tratamiento térmico de varios alimentos ricos en carbohidratos y proteínas, bajo condiciones de temperatura superiores a 120°C (Wenzl et al., 2003; Rice, 2005).

Dentro de los principales alimentos con presencia de acrilamida se ha encontrado que la papa sometida a diversos procesos de fritura contienen los más altos niveles de este contaminante, debido a la gran cantidad de precursores presentes en dicha matriz (asparagina y azúcares) (Bethke y Bussan, 2013)



1.2.2 Mecanismo de formación de Acrilamida en alimentos

La obtención de AA se lleva a cabo por dos vías principales, las cuales incluyen la reacción de Maillard con el aminoácido asparagina y un conjunto de vías alternas que incluyen la presencia o generación de amonio y ácido acrílico a partir de otros aminoácidos. (Keramat et al., 2011)

- **Reacción de Maillard**

Esta reacción química ocurre durante el proceso de cocción de algunos alimentos, especialmente compuestos ricos en almidón como papas o cereales que al ser sometidos a elevadas temperaturas provocan que los alimentos adquieran un olor y sabor agradable (Oracz et al., 2011). En el caso de la AA la reacción ocurre específicamente entre la asparagina y la glucosa (fig. 6) presentes en alimentos crudos (Tekkeli et al., 2012)

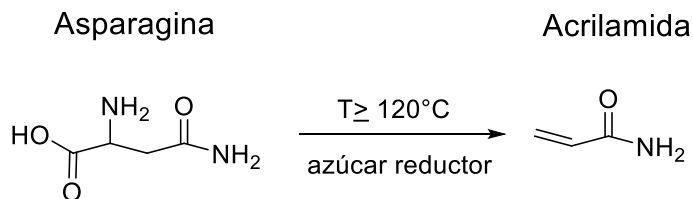
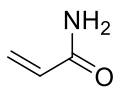


Figura 6. Esquema de reacción de Maillard.

El proceso de formación de AA (fig. 7) se realiza a partir de la transformación de amino ácidos, que comienza con la reacción con un azúcar reductor dando lugar a la formación de una imina (base de Schiff). Una vez obtenida, la imina lleva a cabo un rearrreglo estructural para convertirse en un compuesto de Amadori (cetosa); compuesto que al deshidratarse y/o fragmentarse libera un aminoácido, produciendo un conjunto de intermediarios altamente reactivos como dicarbonilos e hidroxycarbonilos, que reaccionan consecutivamente para llevar a cabo una segunda reacción de Maillard, obteniendo los denominados compuestos de la



reacción de Maillard (como HCAs, furano, acrilamida e hidroximetilfurfural) los cuales proporcionan el sabor y color característicos a los productos fritos.

Cuando los intermediarios (II, III) de la de base de shiff resultantes de la fragmentación de Amadori reaccionan específicamente con asparagina se obtiene la acrilamida (Bethke y Bussan, 2013).

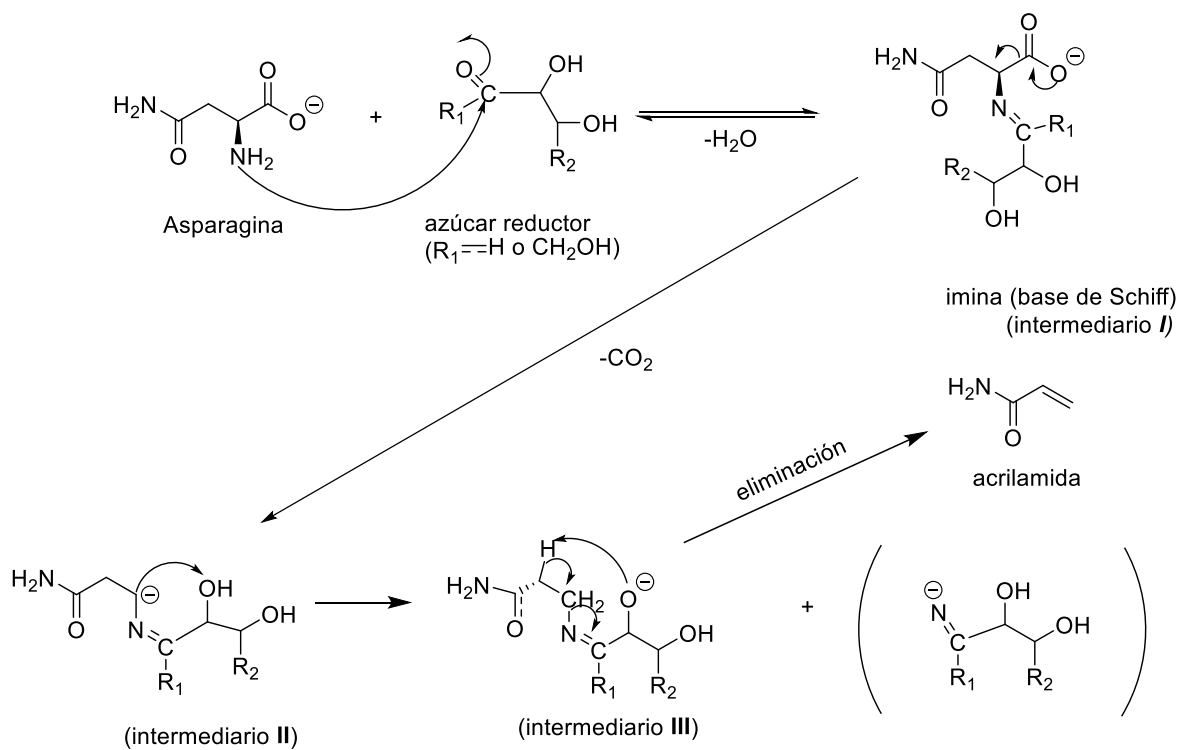
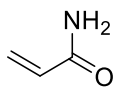


Figura 7. Mecanismo de reacción de Maillard

• Rutas alternativas

Dentro de las vías alternas de obtención de AA en alimentos en procesos tanto industriales como domésticos se encuentra la reacción directa entre aminoácidos y azúcares reductores mediante la formación de una base de Schiff y una secuencia de reacciones (fig. 8). (Bethke y Bussan, 2013).



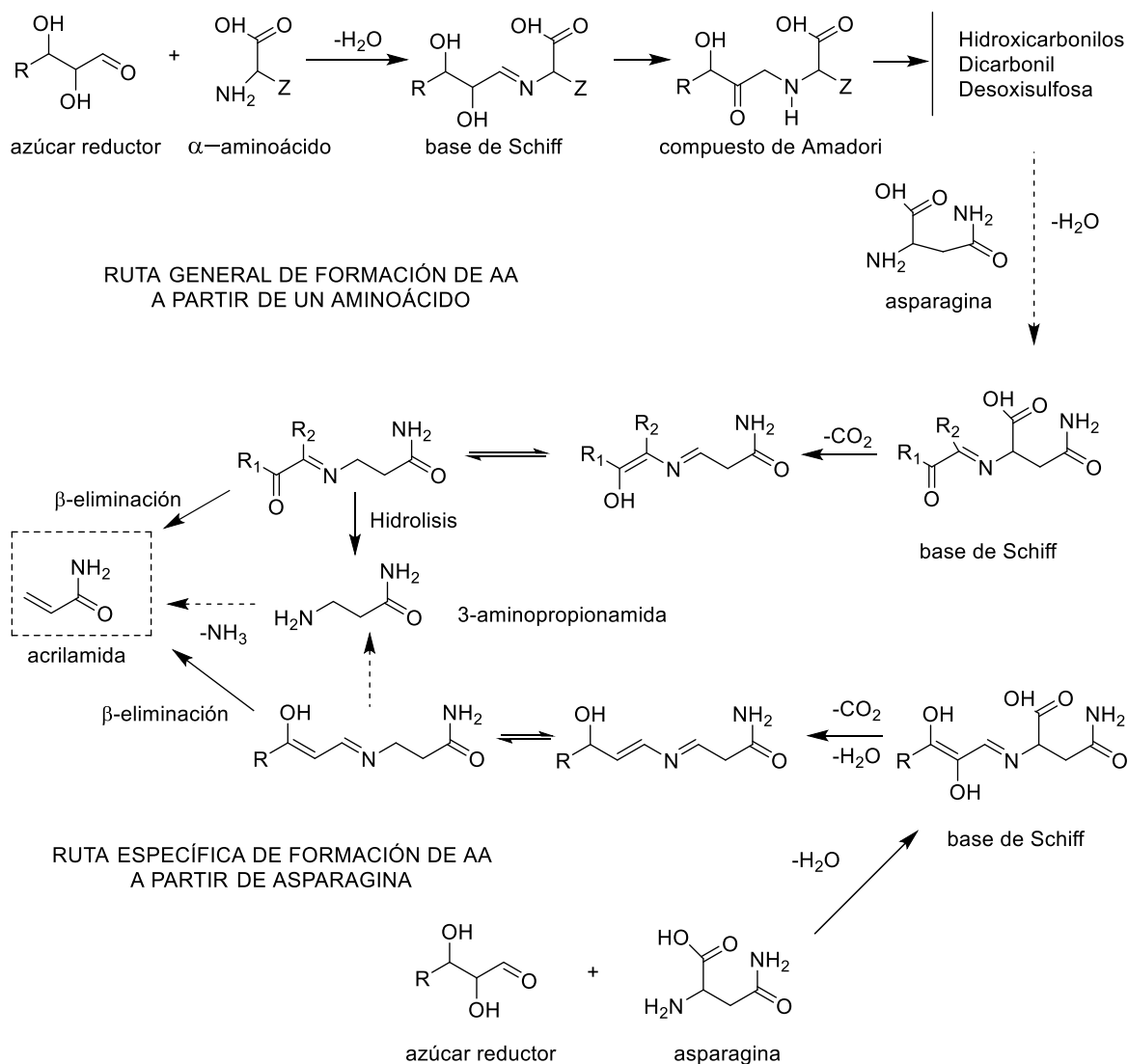
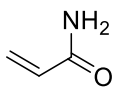


Figura 8. Mecanismo de formación de acrilamida por vía general y específica de aminoácidos.

Adicionalmente diversos estudios han demostrado que la formación de AA se puede llevar a cabo a partir de la presencia de precursores como ácido pirúvico, la acroleína o 1-propenal, aminopropionamida, ácido aspártico o por la deshidratación de α -dicarbonilos (fig. 9) (Keramat et al., 2011).



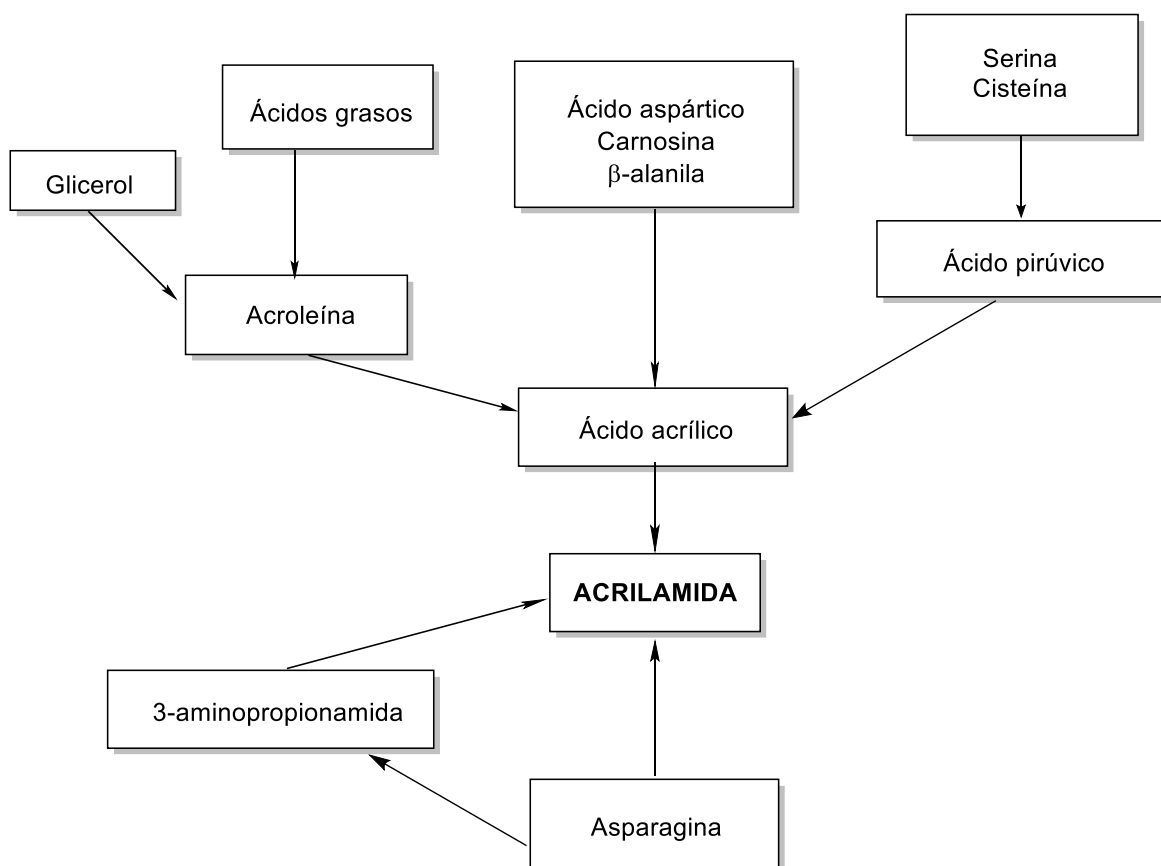
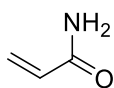


Figura 9. Diagrama de rutas alternativas para la obtención de acrilamida

1.2.3 Metabolismo y biotransformación

La acrilamida es un compuesto fácilmente absorbido y metabolizado por el cuerpo, principalmente excretado por la orina. (Parzefall, 2008). La principal vía de biotransformación de la acrilamida en el cuerpo (fig. 10), consiste en la conjugación de la AA con glutatión (GSH, tripéptido formado por cisteína, glutamato y glicina) y su epoxidación a glicidamida (GA) como producto de su reacción enzimática en el hígado por el citocromo P450 (Parzefall, 2008; Tekkeli et. al, 2012).



1.2.4 Toxicidad de la Acrilamida

La toxicidad de la acrilamida ha sido evaluada por diversas agencias internacionales y por una gran cantidad de investigadores. Dentro de los principales efectos tóxicos derivados del consumo de AA se encuentran: neurotoxicidad en humanos y animales, toxicidad reproductiva, genotoxicidad y carcinogenicidad en roedores (Parzefall, 2008).

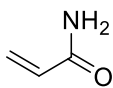
- **Neurotoxicidad**

Los efectos neurotóxicos más conocidos de la acrilamida (por experimentos en animales y análisis de intoxicaciones accidentales en humanos o exposición crónica) son neuropatías periféricas, daño en el sistema nervioso central y periférico, y daño en el cerebelo. Asimismo, degradación de terminales nerviosas que afectan las funciones cognitivas, provocando daño en el cortex cerebral, tálamo e hipocampo. (Parzefall, 2008).

En estudios realizados en animales, el nivel sin efecto observable (NOEL) para el efecto neurotóxico se ha estimado entre 0.2 y 10 mg kg⁻¹ peso corporal/día, muy por encima de la exposición dietética. Sin embargo, se ha encontrado que la neurotoxicidad de la acrilamida podría ser acumulativa (Parzefall, 2008).

- **Genotoxicidad.**

La genotoxicidad de la acrilamida ha sido estudiada extensivamente y se ha comprobado que no causa mutaciones; sin embargo el metabolito (GA) producido cuando la AA entra en contacto con el organismo es considerado como el principal promotor de mutaciones incluso sin activación metabólica. (Jägerstad y Skog, 2005; Parzefall, 2008).



La AA es un compuesto que por sí mismo tiene baja reactividad con el ADN bajo condiciones in vitro, sin embargo posterior a su biotransformación a GA, ésta se une a la molécula de ADN formando aductos, los cuales se encuentran presentes en la mayoría de los órganos (células mamarias, células de ovario y aberraciones cromosómicas) en animales como roedores en los que se han realizado diversos análisis, después de la administración de AA (Jägerstad y Skog, 2005).

Tanto la AA como la GA reaccionan directamente con la hemoglobina en sistemas in vivo (Jägerstad y Skog, 2005), mediante el enlace entre la AA y diversas macromoléculas (proteínas y ADN) lo cual sugiere la existencia de un riesgo genotóxico en humanos (Parzefall, 2008).

La formación de algunos productos en la conjugación de GA con glutatión, son excretados por la orina después de su transformación metabólica a ácidos mercaptúricos regioisoméricos rac-N-acetil-S-(2-carbamoil-2-hidroxietil)-L-cisteína (GAMA) y rac-N-acetil-S-(1-carbamoil-2-hidroxietil)-L-cisteína (iso-GAMA) (Tekkeli et. al, 2012).

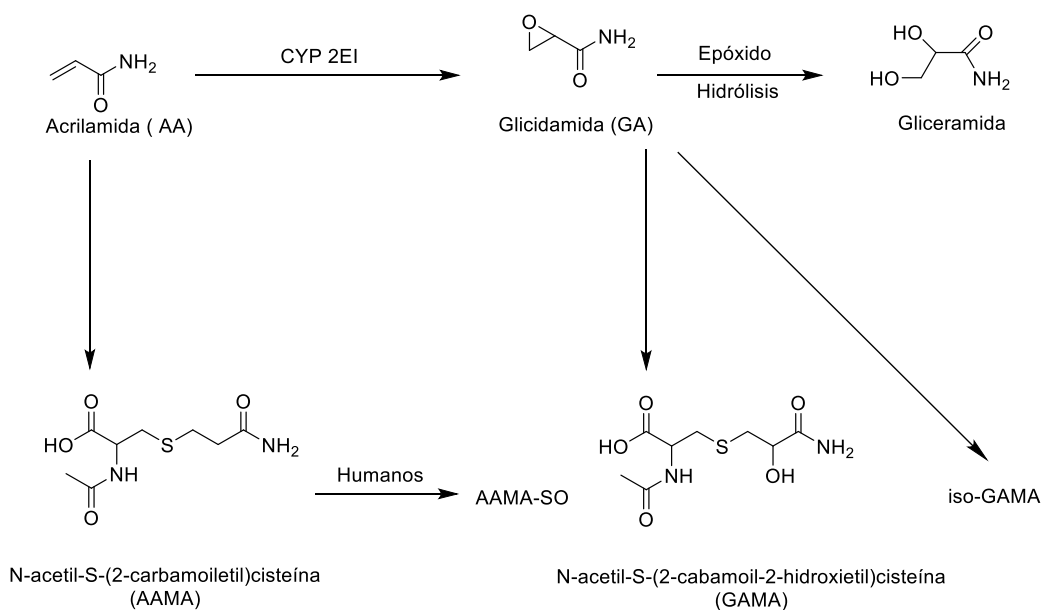
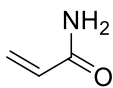


Figura 10. Metabolismo de la acrilamida en el cuerpo humano.

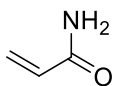


- **Carcinogenicidad**

La AA ha sido clasificada por diversas agencias internacionales como una sustancia probablemente carcinógena para humanos (Grupo 2A) por la IARC. También se encuentra clasificada en el sistema de la Unión Europea como: carcinógeno categoría 2, sustancia mutagénica categoría 2, y como una sustancia tóxica en la reproducción categoría 3 (Rudén C., 2004).

Adicionalmente ciertas investigaciones clínicas, mediante la aplicación de diversas pruebas epidemiológicas en animales indican que el margen de seguridad es mayor para los efectos neurotóxicos que puede causar la ingesta de AA que para su potencial de carcinogénesis; además de ser un compuesto que afecta el desarrollo pre y post-natal (Bethke y Bussan, 2013). Así mismo han demostrado que la AA es un carcinógeno que produce tumores en varios órganos, como en la glándula tiroidea en roedores machos y hembras. Adicionalmente se han encontrado tumores en el sistema nervioso central, la cavidad oral, glándula mamaria y útero en hembras (Parzefall, 2008).

Conforme a su clasificación la IARC indica que hay pruebas suficientes de efectos carcinogénicos en animales, pero insuficientes en humanos, sin embargo estudios epidemiológicos no han proporcionado pruebas contundentes de que la AA presente actividad carcinogénica debido a la limitada fiabilidad de las diversas pruebas realizadas, no obstante se sabe que la exposición ocupacional a la AA representa un mayor riesgo cancerígeno (Rudén, 2004; Rice, 2005 y Parzefall, 2008).



1.2.5 Vías de exposición.

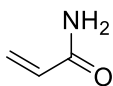
Una de las fuentes principales de exposición a AA es por la ingesta de diversos alimentos de consumo, los cuales fueron sometidos a algún tipo de tratamiento térmico durante su procesado, dentro de los cuales se destacan:

- Alimentos altos en proteína (carnes)
- Papas fritas y a la francesa
- Fórmulas pediátricas
- Pan y productos horneados
- Cereales y granolas
- Nueces y mantequillas (mantequilla de frutos secos)
- Productos de chocolate
- Frutas y vegetales enlatados
- Café tostado

Los productos derivados de papa como papas fritas y papas a la francesa destacan como aquellos con mayor contenido de AA en comparación con otros productos alimenticios procesados a altas temperaturas. Siendo más grave aún debido a la elevada disponibilidad que se tiene a este tipo de productos en el mercado, siendo las botanas principales consumidas por niños y adultos (Dybing et al., 2005; Bethke y Bussan, 2013).

- **AA en alimentos derivados de papa**

La acrilamida no se encuentra presente en la papa cruda, sino que se forma como producto de la reacción de Maillard. Esta reacción es altamente conocida en la industria de la papa debido a que es la que otorga el color dorado a las papas fritas. La formación de AA en los productos a base de papa se debe principalmente a la presencia de asparagina, glucosa y fructosa presente en la materia prima, siendo la

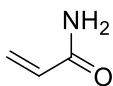


asparagina el aminoácido libre más abundante en la papa, con un contenido típico de 4 a 25 mg g⁻¹ (peso seco), aunque el contenido de asparagina puede variar dependiendo de la región y tipo de papa. Sin embargo, la producción de AA en estos productos está limitada por los azúcares reductores, ya que estos se encuentran presentes en concentraciones en el orden de 0.04-4.8 mg g⁻¹ (peso seco). Por lo tanto, las muestras de papa que contienen 0-2.6 mg g⁻¹ (peso seco) de azúcares reductores limitan la generación de acrilamida en concentraciones de 0-2.5 mg g⁻¹. (Bethke y Bussan, 2013).

1.2.6 Determinación de acrilamida y métodos analíticos.

Desde el año 2002, cuando la AA fue declarada como producto probablemente carcinogénico y encontrado en una gran gama de alimentos procesados de consumo cotidiano, se han desarrollado diversos métodos analíticos para su detección y cuantificación en múltiples alimentos de consumo humano (Tekkeli et al., 2012).

Dentro de los métodos analíticos desarrollados en la determinación y cuantificación de AA, se encuentran los métodos no cromatográficos como electroforesis capilar (CE) (Bermudo et al, 2006), y los métodos cromatográficos como cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) (Jezussek y Schieberle, 2003) y cromatografía de gases (GC) (Hird et al, 2014), siendo HPLC el método más usado para el análisis de AA en alimentos. (Tekkeli et al., 2012). De manera general el análisis de AA incluye la extracción acuosa de la misma a partir de muestras frescas o congeladas, pre-concentración y limpieza de la muestra generalmente mediante extracción en fase sólida (SPE) o extracción líquido-líquido (LLE) acoplados a CE, HPLC y GC (Wenzl et al., 2003; Oracz et al., 2011; Tekkeli et al., 2012) así como su análisis mediante HPLC o GC acoplado a masas (GC-MS) (Bethke y Bussan, 2013).



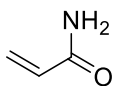
1.2.7 Métodos no cromatográficos

- **Electroforesis Capilar**

La técnica electroforesis capilar (CE) se centra en la separación de iones presentes en una disolución por la acción de un campo eléctrico, basado en la diferencia de migración de los analitos expuestos a éste, principalmente por la relación masa/carga que estos poseen. En el sistema de CE al aplicar un determinado voltaje se pueden separar los componentes de una disolución dentro de un tubo capilar de sílice fundida (SiO_2) de alrededor de 50 cm de longitud y diámetro interior de 25-75 μm (Harris, 2010).

La CE es una técnica de separación muy versátil y robusta que provee rapidez y eficiencia además de buena separación en los análisis químicos, utilizando pequeños volúmenes de muestra y bajo consumo de solventes. Este método ha sido ampliamente utilizado en el análisis de ciertos compuestos con alto potencial en el análisis de alimentos incluyendo polifenoles, péptidos, proteínas, metabolitos, ácidos orgánicos, micronutrientes, aditivos y productos de la reacción de Maillard (AA), entre otros, tal y como se muestra en la tabla 2. Los detectores más utilizados para el análisis de AA por CE son comúnmente espectrómetro ultravioleta (UV) acoplado a detector de arreglo de diodos (DAD), así como CE acoplado a MS (CE-MS). (Herrero et al., 2010).

Dentro de las técnicas de análisis de AA presente en alimentos por métodos electroforéticos se encuentra la electroforesis capilar de zona (CZE), basada en la diferencia de migración de los analitos expuestos a un campo eléctrico. Sin embargo la AA por sí sola es una molécula que no posee carga, por lo que no presenta movilidad electroforética y por tanto para el análisis de AA por CZE se requiere de una derivatización pre-columna utilizando ácido 2-mercaptobenzoico como agente derivatizante (Baskan y Erim, 2007). Sin embargo la principal desventaja de este compuesto químico radica en su poca o nula disponibilidad en el mercado, lo que se refleja en el coste del mismo y por ende propicia la búsqueda de diversas alternativas.



Otra técnica reportada para el análisis de AA en la determinación cuantitativa a bajos niveles en papas fritas es la cromatografía capilar electrocinética de microemulsión (MEECK), obteniendo resultados de hasta de mg kg^{-1} . MEECK es una técnica electroforética que ofrece la oportunidad de separar una gran variedad de compuestos neutros, ácidos y básicos, lo cual comprueba que es una técnica que puede ser viable en la determinación de AA. Sin embargo MEECK resulta ser una técnica que presenta una mayor complejidad respecto a la de CZE (Bermudo et al., 2006).

También se han implementado técnicas de análisis con CE no acuosa (NACE) para la determinación cuantitativa de AA en alimentos procesados como papas fritas, papas a la francesa y extracto de almendra; obteniendo resultados en $\mu\text{g kg}^{-1}$, debido a que NACE es un método más sensible que CE-UV (Baskan y Erim, 2007).

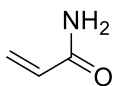


Tabla 2. Análisis de acrilamida por métodos no cromatográficos: Electroforesis capilar (CE).

Matriz	Método	Separación	Electrolito	LOD/LOQ	Referencia
Papas fritas y papas a la francesa	NR	NACE UV a 200 nm.	30 mmol l ⁻¹ HClO ₄ en ACN	0.041 mg ml ⁻¹ / 0.123 mg ml ⁻¹	Baskan y Erim 2007
Papas fritas y a la francesa preparadas en casa 2 g	10 ml de ACN y (3 x 5 ml) de hexano. centrifugó a 4000 rpm por 2 min, filtrada en micro filtro de 0.2 µm	NACE CE-DAD 200nm 25 kV, 25°C, Capilar 75 µm	2 mol l ⁻¹ de HClO ₄ en ACN	0.041 mg l ⁻¹ / 0.137 mg l ⁻¹	Baskan y Erim, 2007.
Papas fritas, pan tostado, galletas, cereales, café	NR	CE MS/MS	Solución de amonio a pH 10.	8 ng ml ⁻¹ / 24 ng ml ⁻¹	Bermudo 2007
	10 ml de agua, agitación 1 hr centrifugar.				
Papas fritas Muestras de 1g	5 ml de la solución acuosa se filtraron en filtro de nitrocelulosa (0.45 µm) 2 ml de hexano. SPE (Strata-X-C) eluyente (1ml) derivatizado con 100 µl MBA/NaOH 1M.	CE - DAD. 210 nm 25 °C 25 kV, capilar 75 µm	Buffer de fosfato (40 mM con pH= 8.0),	0.07 µg ml ⁻¹ / 5.8 µg ml ⁻¹ .	Bermudo et al., 2006
Papas fritas y extracto de almendras.	NR	NACE (DAD) a 210 nm.	30 mmol l ⁻¹ HClO ₄ 20 mmol l ⁻¹ NaClO ₄ , 218 mmol l ⁻¹ ácido acético en ACN	2.6 - 4.4 ng ml ⁻¹ / 7.8 ng ml ⁻¹ y 4.4 ng ml ⁻¹ / 13.2 ng ml ⁻¹	Tezcan y Erim 2008
Papas fritas	NR	MEKC UV a 198 nm.	50 mmol l ⁻¹ Na ₂ B ₄ O ₇ y 40 mmol l ⁻¹ SDS a pH 10.	0.1 µg ml ⁻¹ / 0.3 µg ml ⁻¹	Zhang 2007.

NR: No reportado

1.2.8 Métodos Cromatográficos

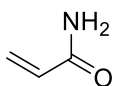
En 1906, el botánico ruso M. Tswett definió la cromatografía como el método en el cual los componentes de una mezcla son separados en una columna adsorbente dentro de un sistema fluyente; esto en base a la afinidad que presenten los componentes de dicha mezcla hacia las fases móvil y estacionaria (Técnicas Cromatográficas, 2007).

El proceso consiste principalmente en el intercambio de un determinado analito de una fase a otra mientras una se mantiene fija (fase estacionaria) y la otra se mueve a través de ella (fase móvil). La fase móvil es un líquido o un gas, mientras que la fase estacionaria es normalmente un líquido viscoso enlazado químicamente a las paredes interiores de un tubo capilar o a la superficie de las partículas sólidas empaquetadas dentro de una columna (Harris, 2010). Los métodos cromatográficos son usados principalmente para identificar, analizar o separar algún analito presente en una matriz.

Dentro de las técnicas cromatográficas más empleadas en el análisis de AA, se encuentran: GC, HPLC (Jezussek y Schieberle, 2003; Bethke y Bussan, 2013; Hird et al, 2014).

- **Cromatografía de gases**

En la cromatografía de gases (GC) se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de la columna (donde se encuentra la fase estacionaria), arrastrado por una fase móvil gaseosa, llamada gas portador, para finalmente ser analizado mediante los diferentes detectores que se usan en el sistema de GC como detector de conductividad térmica, detector de ionización de llama, detector de captura electrónica o espectrómetro de masas (MS) (Elceman et al. 1994; Harris, 2010).



El análisis de AA mediante GC se puede llevar a cabo por dos métodos principales, los cuales consisten en la inyección de la muestra con o sin derivatización.

- **Acrilamida con derivatización**

En el análisis cuantitativo de AA por cromatografía de gases usualmente es necesaria la derivatización de ésta mediante bromación, con el fin de obtener un compuesto que sea lo suficientemente volátil para el análisis e incrementar la selectividad del método (Keramat et al., 2011). Sin embargo la preparación de la muestra es laboriosa, y conforme a la complejidad de la matriz analítica se puede requerir de un pretratamiento adicional de limpieza para muestras que presentan alto contenido graso (Wenzl et al., 2003; Keramat et al., 2011).

- **Acrilamida sin derivatización**

En el análisis de AA mediante el uso de (GC), se realiza una extracción previa mediante la adición de agua o una mezcla de agua:solventes orgánicos como *n*-propanol o 2-butanona (Wenzl et al., 2003).

Para la extracción de la muestra es necesario la eliminación de diversos interferentes que se encuentran presentes en la matriz analítica. La tabla 3 muestra el pre-tratamiento de la muestra en una serie de etapas como precipitación de proteínas y desengrasado, entre otros, mediante la adición de solventes orgánicos adecuados, seguida de la preconcentración de la AA mediante el uso de técnicas de extracción como extracción en fase sólida (SPE) o micro-extracción en fase sólida (MSPE) y su posterior análisis mediante GC (Wenzl et al., 2003).

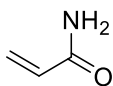


Tabla 3. Análisis de acrilamida por métodos cromatográfico: Cromatografía de gases (GC)

Matriz	Extracción y limpieza	Estándar interno	Columna	Condición de separación	Derivatización	Detector	LOD/LOQ	[REF]
Papas fritas, cereales y pan tostado.	Muestra: 3 g, 4.5 ml de agua. Tratamiento: ultrasonido (30 min). n-propanol, centrifuga, evaporar y reconstituir. Extracción: sorbente PSA.	[D ₃]-acrilamida	Columna capilar INNOWx 30 m x 0.25 mm	70 °C (1 min) aumentando 20 °C min ⁻¹ hasta 240 °C (10.5 min) Gas portador: He, 1.0 ml min ⁻¹ . Inyección 1 µl sin división.	Sin derivatización	GC-MS	5 y 13.33 µg kg ⁻¹ /15 y 40 µg kg ⁻¹ .	Dunovska et al., 2006
Varios productos alimenticios	Muestra: 50 g, 300-400 ml agua. Tratamiento: homogenizar, centrifugar. Extracción: cartucho de SPE.	[² H ₃]-acrilamida	Columna CP-Sil 24 CB 30 m x 0.25 mm	85 °C (1 min) aumentando 25 °C min ⁻¹ hasta 175 °C (6 min) aumentando 40 °C min ⁻¹ hasta 250 °C (7.52 min).	Bromación	GC-MS	0.2 ng ml ⁻¹ / 0.6 ng ml ⁻¹	Ono et al., 2003
Alimentos ricos en proteínas y Carbohidratos	Muestra: 10 g, 100 ml de agua. Tratamiento: filtración Extracción: columna carbograph 4.	N,N-dimetilacrilamida	Columna HP PAS 1701 25m x 0.32 mm	65 °C (1 min) aumentando 15 °C min ⁻¹ hasta 250 °C (10 min). Inyección: 2 µl sin división.	Bromación	GC-MS	5 µg kg ⁻¹ / 15 µg kg ⁻¹	Tareke et al., 2000

Tabla 3. Análisis de acrilamida por métodos cromatográficos: Cromatografía de gases (GC)

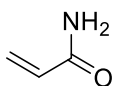
Matriz	Extracción y limpieza	Estándar interno	Columna	Condición de separación	Derivatización	Detector	LOD/LOQ	[REF]
Papas fritas y a la francesa	Muestra: 10 g, 100 ml de agua. Tratamiento: centrifugar, diluir alícuota de 1.5 ml en 15 ml agua, mezclar con 15 ml buffer (pH=7). Extracción: fibra de SPME	----	Columna capilar de sílica: DB-WAX 30 m x 0.25 mm	80 °C- 220 °C (15 °C min ⁻¹) por dos min.	Sin derivatización	GC-PSI-MS/MS	0.1 µg l ⁻¹ / 0.3 µg l ⁻¹	Lee et al., 2007
Papas fritas	Muestra: 2 g, 20 ml MeOH. Tratamiento: clarificación Carrez. Centrifugar (10 min; 10000 rpm), filtrar.	[¹³ C3]-acrilamida	Columna HP INNOWAX 30 m x 250 µm.	80-280 °C (10 °C min ⁻¹), isotérmico por 13 min. Inyección 1 µl sin división.	Sin derivatización	GC-MS	15 ng g ⁻¹ / 50 ng g ⁻¹ .	Serpen y Gokmen, 2007

- **Cromatografía de líquidos de alta resolución**

La cromatografía de líquidos es un método de análisis importante y altamente utilizado debido a que la mayoría de los compuestos no son suficientemente volátiles para poder ser analizados por GC. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) utiliza una presión elevada para forzar al disolvente a que pase por una columna que contiene partículas muy finas, consiguiendo así separaciones de gran resolución (Pérez, 2000; Harris, 2010).

Estudios recientes han demostrado que HPLC es una técnica de separación aplicable en el análisis de distintos analitos como pesticidas, toxinas, residuos de medicinas veterinarias, contaminantes obtenidos durante el procesado de ciertos alimentos, agua, suelos, alimentos y medicamentos, entre otros. El acoplamiento de HPLC con masas (HPLC-MS) da como resultado una poderosa herramienta debido a su alta sensibilidad y selectividad al ser un método robusto. (Hird et al., 2014). Asimismo se han determinado y cuantificado ciertos contaminantes emergentes presentes principalmente en alimentos procesados, así como en jugos y vinos (Palma y Guillen, 2011; Benavides et al., 2012). Además de la amplia aplicación que tiene HPLC como técnica de análisis en alimentos procesados, hay estudios que indican que se trata de una técnica sumamente utilizada en la industria farmacéutica en el control de calidad y estudios de estabilidad de varios medicamentos como la protilerina. (Yaquis et al., 1998). Debido a que la cromatografía de líquidos es comúnmente utilizada para el análisis de compuestos solubles en agua y no volátiles, por estas características representa una alternativa altamente viable para el análisis y cuantificación de diversos analitos como la AA y otros contaminantes derivados del procesado de alimentos (Oracz et al., 2011).

Una de las etapas de suma importancia en HPLC es el tratamiento de la muestra, garantizando la máxima limpieza y pre-concentración del analito.



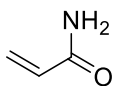
- **Tratamiento de la muestra**

Uno de los principales agentes extractantes empleados por su elevada afinidad a la AA es el agua a temperatura ambiente, también se ha utilizado agua a 80 °C obteniendo buenos resultados durante el análisis por cromatografía líquida. Además, en algunos laboratorios se ha utilizado una mezcla de agua-acetona como agente extractante (Wenzl et al, 2003). Adicionalmente la aplicación de diversos métodos mecánicos como agitación, vortex, o mediante el uso de baño ultrasónico han permitido una mayor extracción de acrilamida.

En algunos análisis de acrilamida se han realizado etapas de limpieza a la muestra antes de la inyección en el equipo de HPLC. Generalmente estas etapas previas son para desengrasar o para la eliminación de interferentes, lo cual se hace con una extracción de las grasas mediante la adición de soluciones orgánicas de hexano, tolueno o ciclohexano. Para separar la fase acuosa de la fase orgánica se centrifuga la muestra y se obtiene finalmente solo el extracto acuoso. La extracción de AA del extracto acuoso se realiza generalmente por extracción en fase sólida (SPE) (Lagante y Felter, 2004) o líquida (LLE) (Wenzl et al., 2003).

- **Detección de AA**

De acuerdo al análisis de AA mediante el uso de HPLC se encuentra que los detectores más comúnmente utilizados son detector de rearreglo de diodos (DAD), detector de fluorescencia (FL) y como ya se había descrito anteriormente, masas (MS). Las columnas comúnmente usadas son columnas C₁₈ (Mestagh et al, 2004), columna capilar de sílica DB-WAX (Lee et al, 2007), columna HP-INNOWAX (Serpen y Gokmen, 2007), entre otras. La mayoría de los laboratorios utilizan cromatografía en fase inversa para la determinación de AA, empleando columnas C₁₈ y metacrilamida o isótopos lábiles de acrilamida como estándar interno (Wenzl et al, 2003).



La tabla 4 muestra la detección de AA en alimentos fritos mediante el uso de HPLC - UV, obteniendo resultados en el orden de $\mu\text{g kg}^{-1}$. Así mismo se han reportado análisis con el uso de detector de arreglo de diodos (DAD) para la determinación de AA en alimentos a base de papa, en estos casos los resultados registrados estuvieron en el intervalo de mg kg^{-1} (Tekkeli et al., 2012).

Sin embargo diversos estudios han implementado el uso de HPLC-MS como método instrumental para la determinación de AA en diversos alimentos, permitiendo la obtención de resultados más precisos, además de alta reproducibilidad, selectividad y sensibilidad del método. No obstante unas de las principales desventajas de este método es su poca disponibilidad en un gran porcentaje de laboratorios enfocados en el análisis de estos contaminantes, adicionalmente esta técnica requiere de un pre-tratamiento de la muestra diferente, empleando una solución acidificada en la extracción (Wenzl et al., 2003; Oracz et al., 2011; Tekkeli et al., 2012), así como una derivatización previa a su análisis, que permita la detección de la misma de forma indirecta.

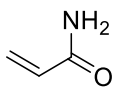


Tabla 4. Análisis de acrilamida por métodos cromatográficos: Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Matriz	Extracción y limpieza	Estándar interno	Columna	Condiciones de separación	Detector	LOD/LOQ	[REF]
Papas fritas, cereales, pan y café.	Muestra: 16 g de muestra, 80 ml H ₂ O, 10 ml CH ₂ Cl ₂ . Tratamiento: mezclar, centrifugar. Extracción: SPE, cartuchos Oasis MAX Y MCX.	[¹³ C ₃]-acrilamida o [D ₃]-acrilamida	Columna Hypercarb 50 x 2.1 mm	Fase Móvil. 15% MeOH en formato de amonio 1mM. 0.175 ml min ⁻¹ , Inj: 5-10 µl. 28 °C.	LC-MS/MS	6 µg kg ⁻¹ / 18 µg kg ⁻¹	Becalski et al., 2003
Papas fritas, pan tostado, galletas.	Muestra: 1 g, 9 ml ácido fumárico (10 mM) o MeOH. Tratamiento: soluciones Carrez I y II. Centrifuga. Extracción: SPE, cartuchos Oasis MCX.	[¹³ C ₃]-acrilamida	Columna Atlantis T3. 150 mm x 4.6 mm	Fase móvil: ácido fumárico 10 mM. 0.3 ml min ⁻¹ . 25 °C	LC-MS	5 µg kg ⁻¹ / 15 µg kg ⁻¹	Gökmen et al., 2009
Papas a la francesa	Muestra: 1, 10 ml hexano. Tratamiento: agitar, centrifugar, remover hexano, agregar 10 ml agua. Agitar, centrifugar. Extracción: SPE, cartuchos Oasis HLB.	[D ₃]-acrilamida	Columna Atlantis dC18. 150 mm x 2.1 mm	Fase móvil: 92 % agua (0.1% HAc) y 8% H ₂ O/MeOH (35/65 con 0.3% ácido fumárico). 0.15 ml min ⁻¹ .	LC-MS/MS	NR	Mestagh et al., 2004
Papas fritas, migas de pan, café.	Muestra: 1 g, 9 ml H ₂ O. Tratamiento: mezclar y centrifugar Extracción: SPE, cartuchos Oasis HLB.	[¹³ C ₃]-acrilamida	Columna Synergi Hydro-RP 80 250 mm x 2 mm	Fase móvil: 0.5% MeOH, 0.1% HAc en agua. 0.2 ml min ⁻¹ , Inj: 20 µl. 10 min.	LC-ESI-MS/MS	10 µg kg ⁻¹ / 30 µg kg ⁻¹	Roach et al., 2003

NR-No Reportado

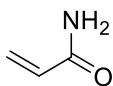
1.2.9 Derivatización

La derivatización es un procedimiento ampliamente utilizado, en el que se modifica químicamente el analito para detectarlo o separarlo con mayor facilidad. Generalmente se busca obtener un compuesto de estructura similar al analito con características y propiedades diferentes con el fin de que esta nueva especie sea más compatible con la técnica de análisis que se desea utilizar (Harris, 2010; Jezussek y Schieberle, 2003). Dentro de las principales finalidades que tiene derivatizar un analito son: mejorar la estabilidad térmica del analito, mejorar la resolución cromatográfica, aumentar la sensibilidad del análisis incorporando grupos funcionales o grupos cromóforos que puedan ser percibidos por algún detector específico (Wenz et al., 2003).

- **Derivatización pre-columna**

La derivatización pre-columna es un método ampliamente empleado en el cual la derivatización se lleva a cabo antes de la introducción de las matrices analíticas en el sistema cromatográfico.

En el análisis de AA comúnmente se lleva a cabo una derivatización pre-columna; en algunos casos se agrega un grupo cromóforo a la estructura con el fin de obtener un compuesto de fácil detección en los análisis instrumentales. Dentro de las técnicas de derivatización más utilizadas para el análisis de AA en alimentos procesados destacan la bromación, sililación y el uso del ácido 2-mercaptobenzoico como agente derivatizante (Wenzl et al., 2003; Jezussek y Schieberle, 2003; Lagante y Felter, 2004).



- **Bromación**

La derivatización de la AA con bromuro o bromato de potasio es el principal método de pretratamiento de la muestra utilizado en GC (Tekkeli et al., 2012). El procedimiento requiere la adición de una solución que contenga bromo, como ácido bromhídrico (fig. 11), bromuro de potasio o bromo durante el pretratamiento de la muestra o en los extractos acuosos obtenidos de la misma (Wenzl et al., 2003).

La separación del analito por GC se realiza usualmente con columnas capilares de media a alta polaridad con longitud de 30 m y diámetro interno de 0.25 mm. Inyectando de 1-2 µl de muestra en inyección sin división de flujo. Se utiliza gradiente de temperatura para el análisis, iniciando entre 60-85 °C, aumentando la temperatura hasta llegar a una temperatura final alrededor de 250 °C (Wenzl et al., 2003).

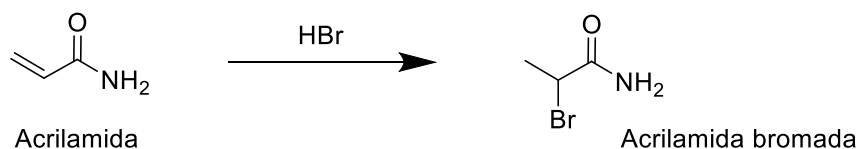
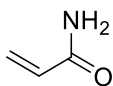


Figura 11. Esquema de reacción de bromación de acrilamida.



- **Sililación**

Otro método de derivatización utilizado es la sililación de la AA seguida de SPME (Wenzl et al, 2003). En este método se utiliza como agente derivatizante soluciones de *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) en presencia de acetonitrilo, que al reaccionar con la AA (fig.12) da lugar al compuesto volátil *N,O*-bis(trimetilsilil)acrilamida (BTMSA). Para la detección de AA mediante sililación, generalmente se hace uso de GC-MS, empleando como estándar interno [$^{13}\text{C}_3$]-acrilamida. (Lagante y Felter, 2004)

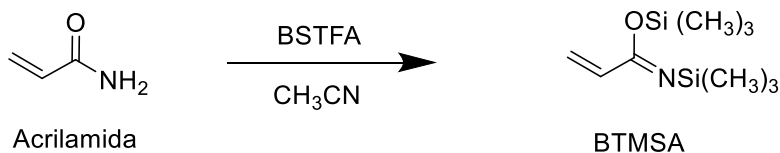


Figura 12. Esquema de reacción de sililación de acrilamida.

- **Derivatización con ácido 2-mercaptobenzoico**

Para esta técnica de derivatización se utilizan soluciones del agente derivatizante: ácido 2-mercaptobenzoico (2-MBA) en presencia de hidróxido de sodio (NaOH), que al reaccionar con la AA produce un tioéter (fig. 13) que puede ser fácilmente detectado por equipos cromatográficos.

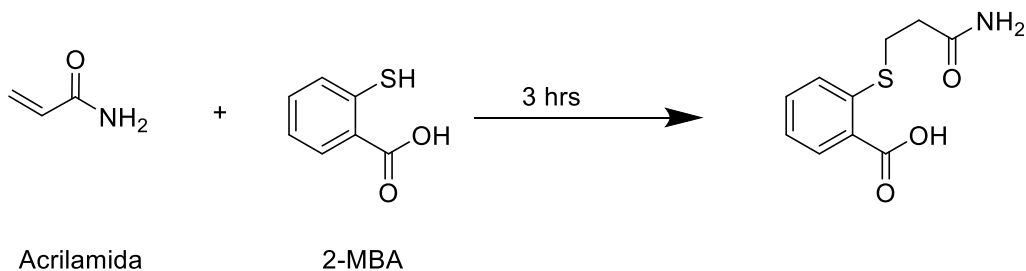
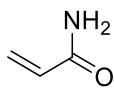


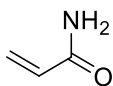
Figura 13. Reacción de derivatización de acrilamida con ácido 2-mercaptobenzoico



La detección de AA después de ser derivatizada con 2-MBA, se realiza generalmente por HPLC-MS, sin embargo se han reportado estudios en los que se hace uso de otros detectores como DAD. Adicionalmente se emplea como estándar interno la [$^{13}\text{C}_3$]-acrilamida.

La derivatización de AA con 2-MBA ha demostrado ser una técnica altamente reproducible y relativamente sencilla (3 hrs en oscuridad y en ocasiones bajo atmósfera de N_2) que permite el análisis de este analito en diversas matrices analíticas (Jezussek y Schieberle, 2003; Baskan y Erim, 2007). Sin embargo una desventaja de este compuesto químico radica en su poca o nula disponibilidad en el mercado, reflejado en el coste del mismo y por ende la búsqueda de diversas alternativas.

Es por ello que el presente trabajo está basado en la búsqueda de una alternativa eficaz en el proceso de derivatización aplicando como agente derivatizante el ácido 4-mercaptobenzoico con las principales ventajas que presenta este reactivo como son derivatización en medio acuoso, bajos costos y elevada disponibilidad en el mercado, como una opción viable para la posterior detección de AA mediante HPLC-DAD siendo ésta una de las técnicas más empleadas en el análisis de este compuesto, comparado con otras metodologías reportadas.





OBJETIVOS



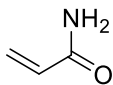
Objetivos

2.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología de preconcentración y cuantificación de acrilamida en botanas basada en la combinación de intercambio aniónico mediante HPLC.

2.2 Objetivos específicos

1. Establecer las condiciones óptimas en la derivatización de acrilamida mediante el método univariable
2. Establecer las condiciones de separación y detección de acrilamida en botabas mediante HPLC, partiendo de condiciones predeterminadas
3. Diseñar una estrategia de preconcentración por intercambio aniónico.
4. Determinar los parámetros analíticos del método desarrollado.





METODOLOGÍA EXPERIMENTAL



2 Metodología Experimental

3.1 Reactivos

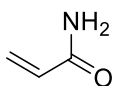
Todas las soluciones se prepararon disolviendo el respectivo reactivo de grado analítico en agua desionizada con una resistividad no menor a 18.0 MΩ cm. Las distintas soluciones estándar fueron preparadas diariamente mediante dilución de una solución madre de 1000 mg l⁻¹ de AA. Esta solución se almacena en la oscuridad a 4.0°C y se renueva cada tercer día.

Para la derivatización se utilizó una solución de ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA) 1000 mg l⁻¹ en NaOH 0.1 M. Como estándar interno se utilizó una solución madre de acrilato de metilo (EI) (1000 mg l⁻¹) para mediante dilución obtener distintas soluciones estándar. Todas las soluciones se almacenaron a 4 °C y en oscuridad, además de que se renovaron cada tercer día. Los reactivos AA ($\geq 99\%$), 4-MBA (90%), acrilato de metilo (EI) (99 %) se obtuvieron de Sigma Aldrich.

Las muestras de papas fritas se obtuvieron de un establecimiento comercial en la Ciudad de Pachuca, Hidalgo.

3.2 Material y equipo

Las determinaciones mediante HPLC se realizaron usando un equipo Agilent 1200 infinity series (Agilent Technologies, CA, Estados Unidos de América) equipado con un detector DAD a 290 nm y conectado a un inyector manual con un bucle externo de 20 µl. La separación se realiza utilizando una columna Eclipse XDB-C8 (5 µm; 150 x 4.6 mm i.d) de Agilen Technologies. La fase móvil utilizada consiste en acetonitrilo: 1% de ácido acético (20:80 v/v, pH 2.5) a un flujo de 0.80 ml min⁻¹, a temperatura constante de 25 °C. Los datos obtenidos fueron adquiridos y analizados mediante el software Lab Advisor Versión B.02.04.



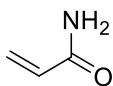
3.3 Desarrollo experimental HPLC-DAD

3.3.1 Tratamiento de la muestra

En una primera etapa la muestra se homogenizó, pesando 1.0 g de papas y se colocó en tubos de polipropileno de 15 ml; adicionalmente a la muestra se le añadieron 4 ml de agua desionizada y 1 ml de solución madre de AA (1000 mg l^{-1}). La mezcla se agitó en un vortex durante 5 min, posteriormente la mezcla se colocó a baño maría a 80° durante 30 min. Una vez transcurrido el tiempo a esta solución se agregaron 5 ml de metanol (MeOH) empleado en la precipitación de proteínas y eliminación de algunos interferentes presentes en la muestra (Oracz et al., 2011; Wenzl et al., 2003). La solución obtenida fue mezclada y centrifugada a 4,000 rpm durante 15 min, reservando la fase líquida.

En una segunda etapa se tomó una alícuota de 125 μl de la fase líquida y se mezcló con 250 μl de 4-MBA, aforando a un volumen de 5 ml. La mezcla se calentó en baño maría a 80°C durante 30 min, dando lugar a la reacción de adición 1, 4 o reacción de Michael.

En una tercera etapa, una vez derivatizada la AA con 4-MBA se llevó a cabo la extracción de AA-derivatizada (AAD) por intercambio iónico en dos etapas: inicialmente se pesó 1.0 g de resina directamente en un tubo de polipropileno y se activó mediante la adición de 10 ml de NaOH (1M), con agitación suave durante 30 min. Transcurrido el tiempo de activación se realizaron dos lavados a la resina con 10 ml agua por 10 min. Posteriormente, se puso en contacto la resina con el extracto acuoso previamente derivatizado (5 ml) durante 30 min en agitación. Terminado el tiempo de contacto las fases fueron separadas, lavando la resina con NaOH ($1 \times 10^{-3} \text{ M}$) por duplicado con 10 ml cada uno.



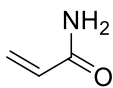
Posterior al intercambio iónico, se realizó la elución de la AAD, mediante la adición de 5 ml de metanol acidificado (MeOH-HCl; 5×10^{-3} M), durante 15 min con agitación constante.

Al término de la elución de AAD, el solvente empleado fue evaporado a sequedad, manteniendo la temperatura menor a 40 °C. Finalmente el analito fue reconstituido con 780 µl de agua desionizada, 50 µl de 4-MBA, 20 µl de acrilato de metilo (EI, 1000 mg l⁻¹), realizando una segunda derivatización bajo las mismas condiciones descritas anteriormente con la finalidad de evitar una competencia entre el analito y el EI una vez derivatizados durante la extracción por intercambio iónico, así como que el EI sea detectable en el equipo cromatográfico, por último se filtró la solución obtenida antes de su análisis.

Transcurrida la segunda derivatización, a la solución se le adicionaron 150 µl de ácido acético glacial (HAc) al 1% (v/v), disminuyendo el pH de la solución concluyendo así la reacción de derivatización. Finalmente se inyectó la muestra en el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) equipado con detector DAD y se realizó el análisis a 290 nm.

3.4 Optimización del sistema

La optimización del sistema se realizó mediante el método univariable la cual involucra 5 etapas, I) identificación de la variables a optimizar, II) identificación y selección de los factores que afectan el sistema, III) selección de las restricciones de cada factor, IV) análisis de los datos y determinación de las condiciones óptimas y V) experimento confirmatorio bajo las condiciones óptimas obtenidas.



3.4.1 Procedimiento cromatográfico

Al inicio de cada día de trabajo la columna cromatográfica se activó durante 30 min con acetonitrilo (ACN), a un flujo de $0.200 \text{ ml min}^{-1}$; posteriormente se acondicionó el flujo a $0.800 \text{ ml min}^{-1}$ con una fase móvil de: ACN:HAc 1% (20:80 v/v).

Concluidos los análisis, la columna se lavó nuevamente con ACN por 30 min a un flujo de $0.200 \text{ ml min}^{-1}$.

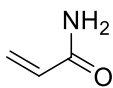
3.4.2 Optimización del proceso de derivatización.

La optimización se llevó a cabo mediante la evaluación de dos parámetros principales: temperatura de derivatización de $20.0 - 90.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$ y tiempo de reacción $20.0 - 50.0 \text{ min}$, obteniendo la mayor relación de áreas entre la acrilamida y el estándar interno.

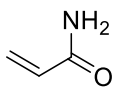
3.4.3 Optimización del pretratamiento de la muestra.

El pretratamiento de la muestra se realizó utilizando una resina de intercambio iónico como método de pre-concentración del analito. Una vez establecidas las condiciones de derivatización, se determinó la metodología de pre-concentración y de limpieza en el tratamiento de la muestra, mediante una extracción de intercambio iónico empleando una resina aniónica en la extracción de AA en muestras de extracto acuoso de papas.

Las variables optimizadas en el sistema de separación fueron: cantidad de resina de 0.5 a 2.0 g , volumen de muestra $5.0 - 15.0 \text{ ml}$, tiempo de contacto muestra:resina $10.0 - 40.0 \text{ min}$, con el objetivo principal de obtener la mayor relación de áreas entre la acrilamida y el estándar interno, permitiendo la máxima adsorción de acrilamida. Adicionalmente, se inyectaron todas las muestras en el sistema de HPLC, así como una muestra blanco empleada como referencia para evaluar la eficiencia en la



extracción de AAD, determinado el % de retención mediante la relación de concentración añadida y la concentración determinada en la solución remanente una vez llevada a cabo el intercambio iónico.





RESULTADOS Y DISCUSIÓN



4 Resultados y Discusión

4.1 Derivatización

Como una etapa previa al proceso de extracción se lleva a cabo la derivatización del analito de interés utilizando como agente derivatizante el ácido 4-mercaptobenzoico (4-MBA), con base a los estudios realizados por Jezussek y Schieberle aplicando el ácido 2-,mercaptobenzoico (2-MBA) (fig. 14) (Jezussek y Schieberle, 2003; Oracz et al, 2011; Tekkeli et al., 2012). Este tratamiento se realizó con el fin obtener un compuesto que contenga propiedades iónicas y a su vez que en su estructura presente un grupo cromóforo el cual sea detectable en el equipo cromatográfico, realizando la detección indirecta de la AA por HPLC (Jezussek y Schieberle, 2003).

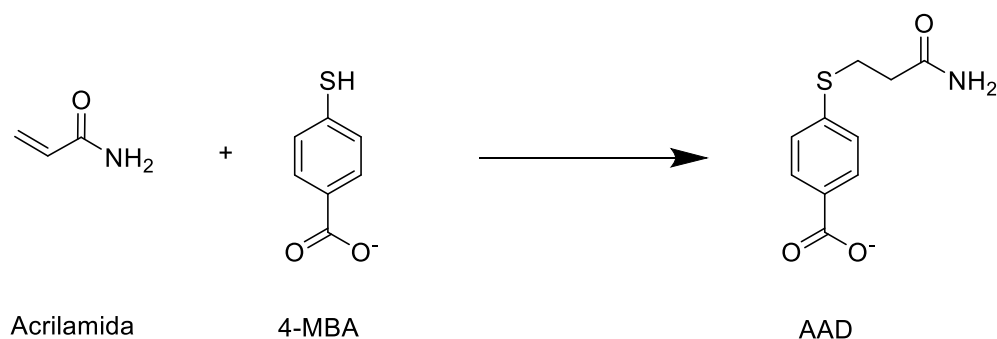
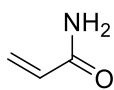


Figura 14. Esquema de reacción de derivatización de acrilamida con ácido 4-mercaptobenzoico.

La derivatización de AA con 4-MBA se lleva a cabo mediante una adición 1-4 (reacción de Michael) presentando el esquema de reacción de la fig. 15.



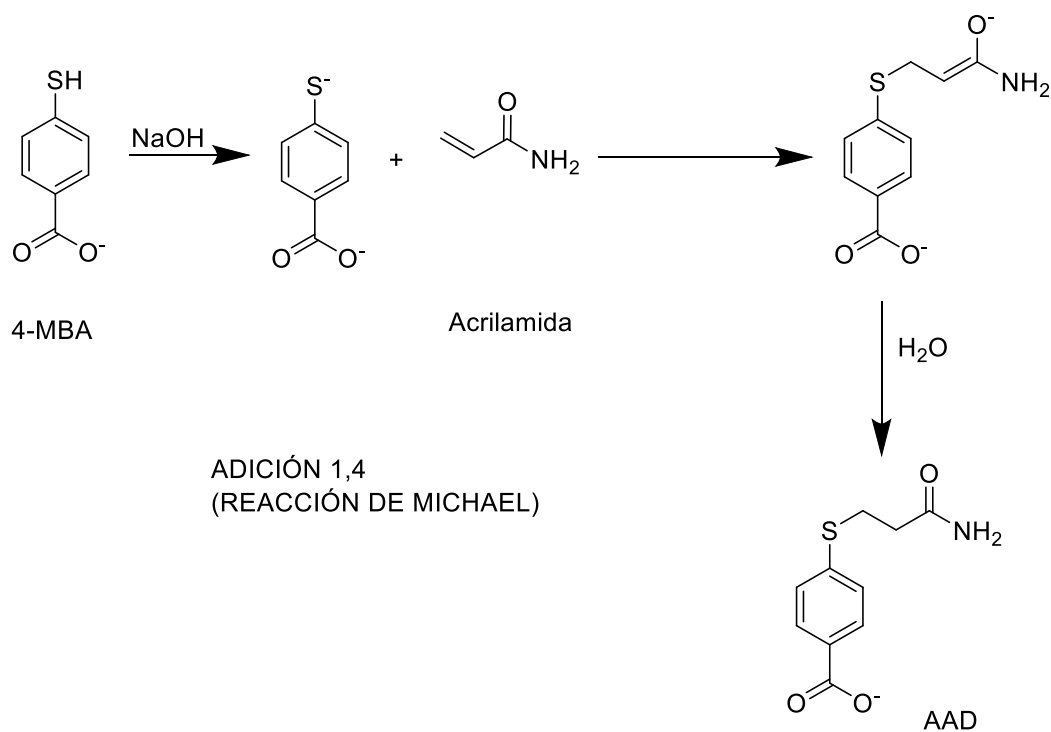
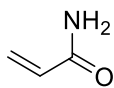


Figura 15. Esquema de reacción de derivatización de acrilamida con ácido 4-mercaptobenzoico.

De acuerdo al esquema de reacción de derivatización se obtiene el cromatograma (fig. 16) del análisis de AAD (10 mg l⁻¹), EI (acrilato de metilo, 20 mg l⁻¹) y 4-MBA (50 mg l⁻¹); en donde se observa que la AAD presenta una señal cromatográfica alrededor de 5-6 minutos, mientras que el EI se obtiene alrededor de 15 minutos. Finalmente se observa la señal cromatográfica correspondiente al exceso de agente derivatizante (4-MBA) que se presenta en alrededor de 24 minutos.



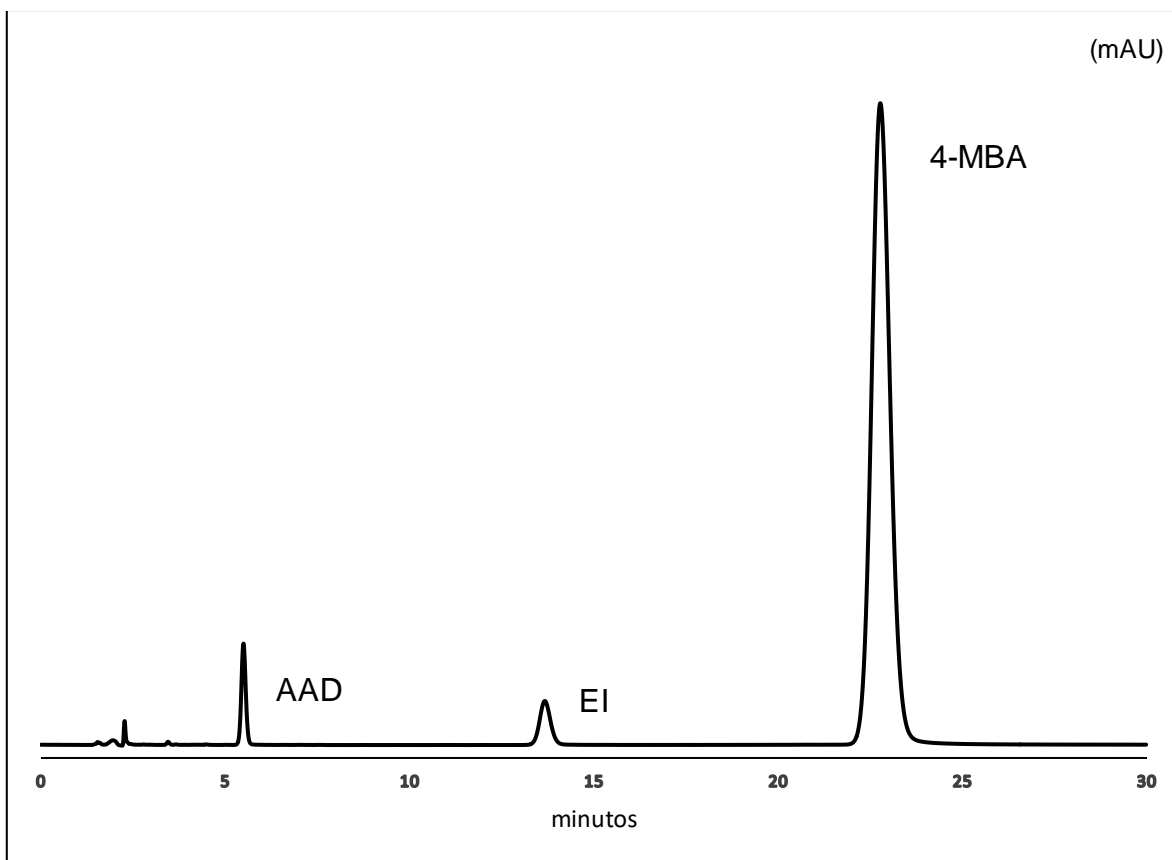
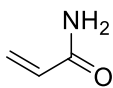


Figura 16. Cromatograma correspondiente al análisis de acrilamida (10 mg l^{-1}), acrilato de metilo (20 mg l^{-1}) y ácido 4-mercaptobenzoico (50 mg l^{-1}).

4.1.1 Temperatura para la reacción de derivatización.

Uno de los principales factores en la derivatización es la temperatura a la cual se llevará a cabo dicha reacción, por lo que la primera etapa consiste en la evaluación de la temperatura de derivatización de la AA de 20 a 90°C conforme a diversos datos bibliográficos (Wenzl et al., 2003). La derivatización se realizó a partir del uso de las soluciones de AA ($1.41 \times 10^{-4} \text{ M}$) y 4-MBA en exceso ($3.24 \times 10^{-4} \text{ M}$); la mezcla se colocó a baño maría a las temperaturas establecidas durante un periodo de 30 min. Posteriormente al tiempo transcurrido la reacción de derivatización es detenida con la adición de una solución de HAc (1%), inyectando las muestras en el sistema cromatográfico, obteniendo los siguientes resultados mostrados en la fig. 17.



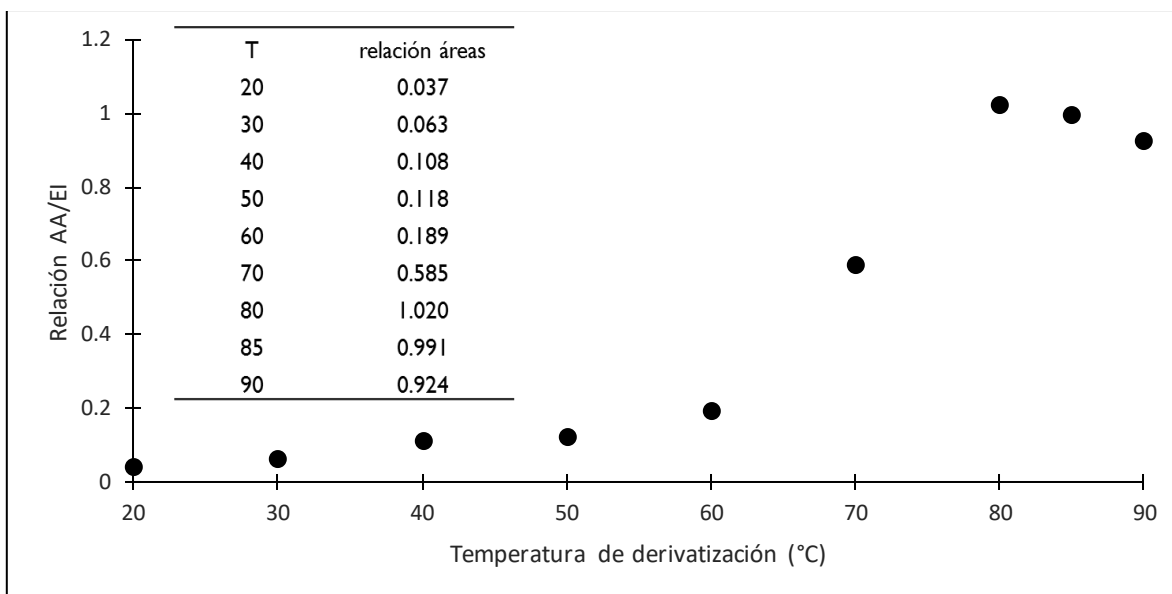
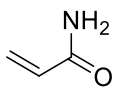


Figura 17. Estudio de la temperatura en la reacción de derivatización.

Con base a los resultados obtenidos se observa que al aumentar la temperatura de calentamiento en la reacción de derivatización entre 20-80°C esta se ve favorecida, debido a una mayor interacción entre las moléculas de AA y 4-MBA presentes en la solución. Sin embargo, a temperaturas por encima de este intervalo la reacción de derivatización se ve afectada por la posible polimerización de la AA, que conforme a la bibliografía se lleva a cabo a temperaturas mayores a 85 °C (Wenzl et al, 2003), observando una disminución del área de AA y por consiguiente una disminución en la variable de respuesta. Se seleccionó como temperatura óptima 80 °C en la derivatización de AA.

4.1.2 Tiempo de reacción

En una segunda etapa se realizó la evaluación del tiempo en el proceso de derivatización, para lo cual se eligió un intervalo de tiempo de 10 a 50 min, para ello se prepararon diversas soluciones bajo las condiciones descritas anteriormente; AA (1.41×10^{-4} M) y 4-MBA en exceso (3.24×10^{-4} M), a baño maría a 80 °C, para posteriormente ser inyectadas y analizadas en el equipo de HPLC-DAD.



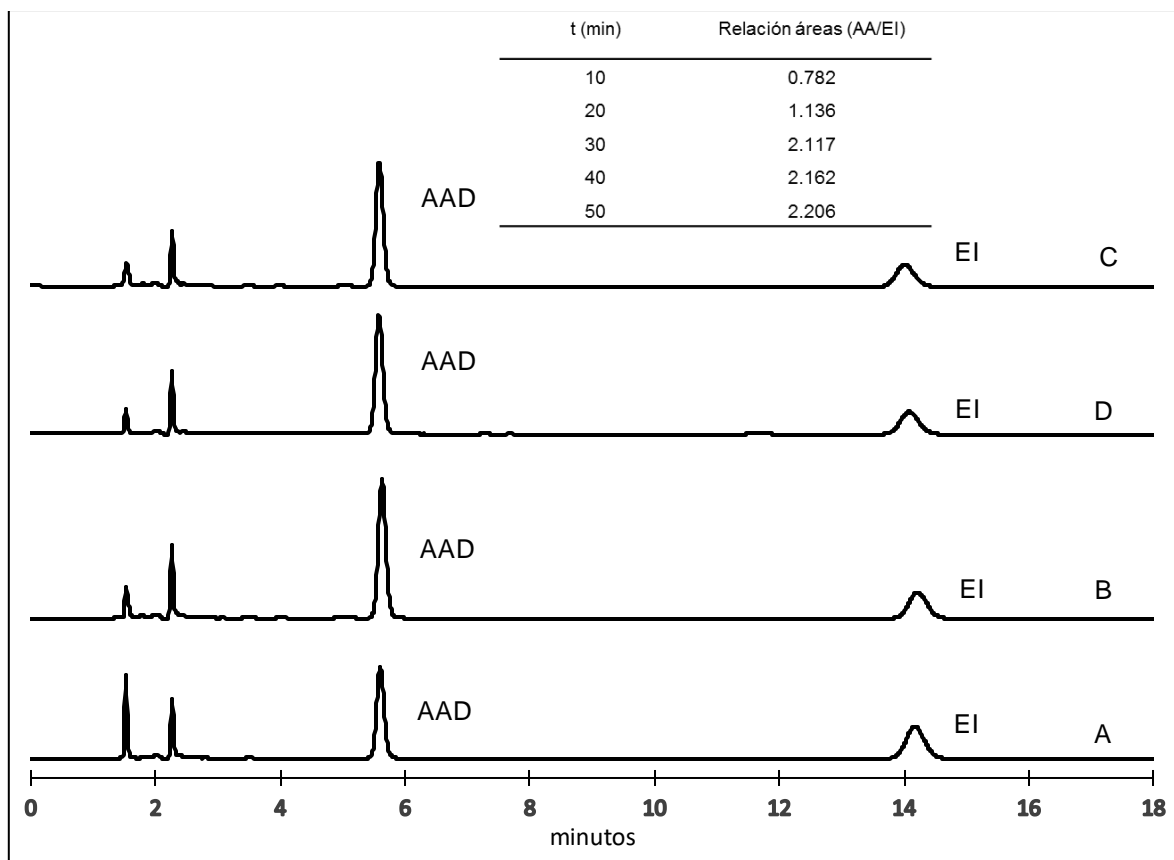
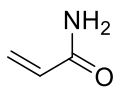


Figura 18. Evaluación del tiempo de derivatización, cromatogramas A) 20 min, B) 30 min, C) 40 min y D) 50 min.

De acuerdo con los resultados cromatográficos (fig.18) se observa que derivatizar la AA un intervalo de tiempo mayor a 30 min (fig. 18 B) no presenta beneficios al método; ya que después de este tiempo la relación entre el compuesto derivatizado y EI permanece prácticamente constante. Con base en los resultados obtenidos, se eligieron 30 min como tiempo óptimo en el proceso de derivatización; además de que la elección de este tiempo conlleva un menor consumo energético.

El método propuesto y desarrollado para la derivatización de AA utilizando como agente derivatizante el 4-MBA resulta ser altamente favorecedor ya que permite realizar el análisis de AA obteniendo señales analíticas con buena resolución y reproducibilidad, presentando las ventajas de consumir bajos tiempos de reacción a una temperatura de 80 °C mientras que otros agentes derivatizantes empleados



y reportados consumen altos tiempos en el proceso de derivatización (3hrs), además de conllevar un mayor gasto económico, como es el caso del 2-MBA.

4.2 Optimización del sistema de extracción por intercambio iónico

La extracción de AA se puede llevar a cabo mediante intercambio iónico (fig.19) debido a que al derivatizarla se adiciona un grupo que le confiere propiedades iónicas a la molécula, siendo así fácilmente retenida en una resina de intercambio aniónica.

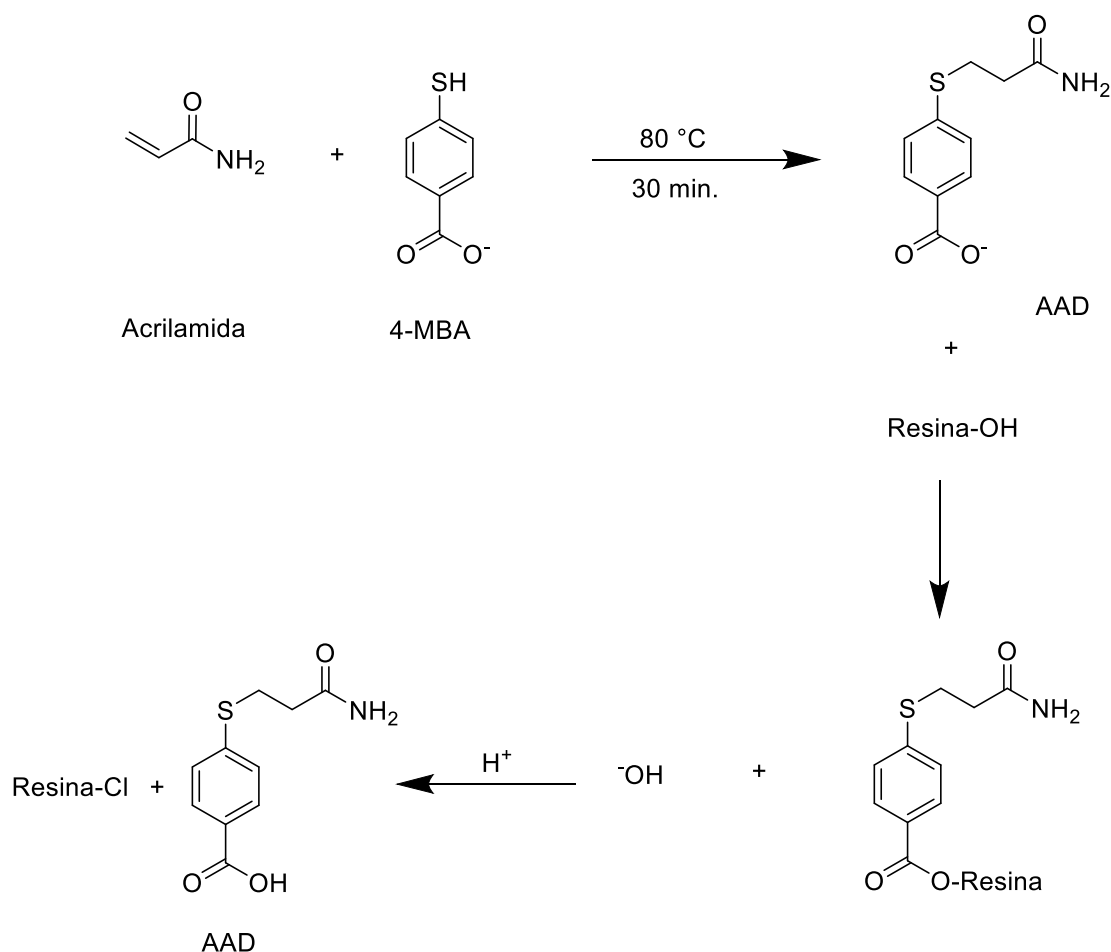
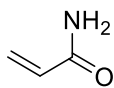


Figura 19. Esquema de extracción de acrilamida por intercambio iónico.



4.2.1 Cantidad de resina

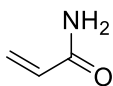
Uno de los principales factores en la pre-concentración de AA es la evaluación de la cantidad de resina utilizada en el sistema analítico, con el principal objetivo de asegurar la adsorción de la AA y obteniendo así la máxima retención. Para ello, en una etapa inicial se preparan soluciones de AA (5 ml, AA: 50 mg l⁻¹; 4-MBA: 250 mg l⁻¹) derivatizada bajo las condiciones óptimas descritas anteriormente (baño maría a 80 °C durante 30 min).

Para ello es necesaria la activación de la resina de intercambio iónico para poder llevar a cabo la extracción, por lo cual se pesaron 0.5, 1.0, 1.5 y 2.0 g de resina (seca) que fueron colocadas directamente en tubos de polipropileno llevando a cabo la siguiente metodología

- 1) La resina se pone en contacto durante 30 min con 10 ml de solución de NaOH (1M), manteniendo una agitación suave.
- 2) Activada la resina, se realizaron dos lavados con 10 ml de agua durante 10 min cada uno para que la fase líquida alcance un pH neutro.

Posterior a la activación de cada sistema, se adiciona la solución de AA previamente derivatizada, poniendo en contacto 5 ml de dicha solución con la resina activada durante 30 min a temperatura ambiente en agitación suave.

Terminado el tiempo de extracción se toman 200 µl de la solución adicionando 10 µl de EI (acrilato de metilo) y 640 µl de agua desionizada, seguido de una segunda derivatización (bajo las condiciones óptimas), con la finalidad de que el EI sea detectable en el equipo cromatográfico. Finalmente se adicionan 150 µl de HAc 1% (v/v).



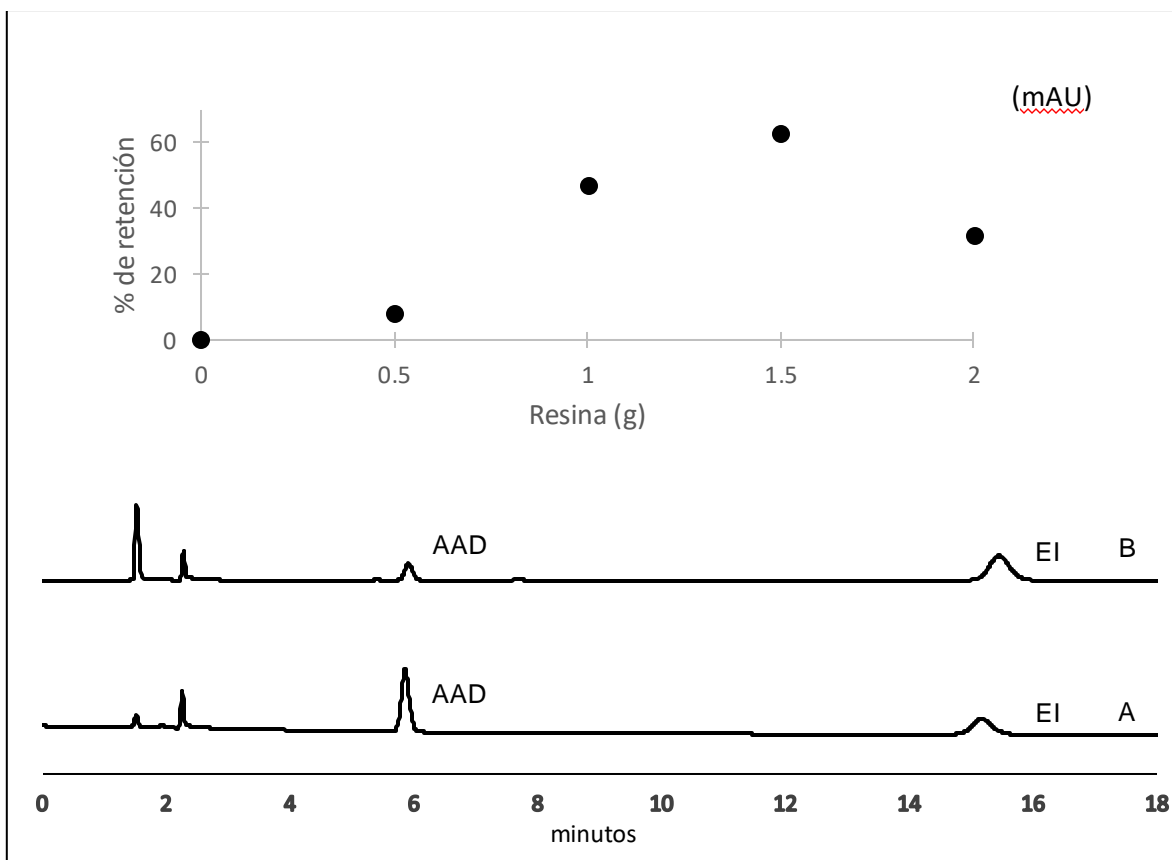
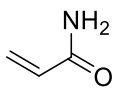


Figura 20. Evaluación de la retención de acrilamida con resina, cromatogramas A) 0 g de resina, muestra derivatizada con 10 ppm de AA; B) 1 g de resina, remanente de la solución en contacto con la resina.

La fig. 20 muestra los cromatogramas obtenidos en el estudio del efecto de la cantidad de resina empleada en el sistema de extracción, A) Análisis de una solución estándar de AA (10 mg l^{-1}) y EI (20 mg l^{-1}); B) análisis del remanente de AA encontrada después de la extracción con 1 g de resina. Observándose que conforme se incrementa la cantidad de resina en el sistema se obtienen mayores porcentajes de retención de AA; sin embargo, a cantidades superiores a 1.0 g de resina se observa que los porcentajes de retención no presentan un comportamiento lineal, disminuyendo la relación de áreas AA/EI, lo cual es atribuido a la falta de dispersión de la solución con la resina, por lo tanto en el presente trabajo se selecciona 1.0 g de resina como la óptima en la etapa de extracción de acrilamida.



4.2.2 Tiempo de contacto en intercambio iónico

Como segunda etapa se evaluó el tiempo de contacto entre la resina activada y la solución derivatizada en intervalos de tiempo de 15, 30 y 45 min., para ello se tomaron 5 ml de la solución derivatizada bajo las condiciones anteriormente descritas, posteriormente se pone en contacto con 1.0 g de resina previamente activada durante el tiempo correspondiente, transcurrido el tiempo de contacto se realizó una segunda reacción de derivatización del acrilato de metilo (EI), concluida la reacción se adiciona HAc (1%), analizando las muestras mediante HPLC-DAD.

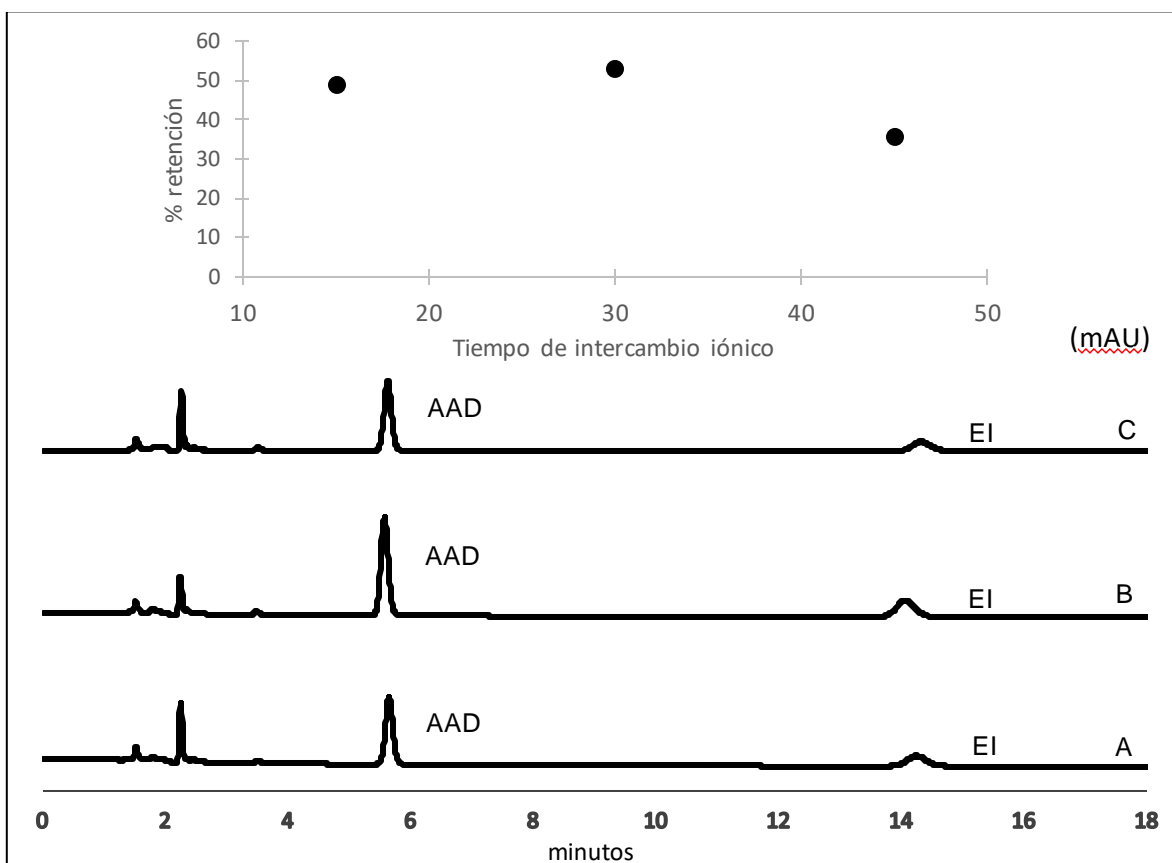
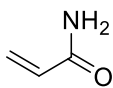


Figura 21. Tiempo de contacto en el proceso de extracción por intercambio iónico, A) 15 min, B) 30 min y C) 45 min.

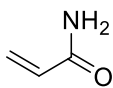


De acuerdo a los resultados obtenidos (fig. 21) se observa que conforme se incrementa el tiempo de contacto entre el analito y la resina se obteniendo una mejor señal cromatográfica, sin embargo a un tiempo de contacto superior a los 30 min no presenta un cambio significativo en la extracción de acrilamida presente en la matriz analítica, es por ello y con el fin de realizar un mayor número de análisis en menor periodo de tiempo, se elige como tiempo óptimo de contacto 30 min alcanzando porcentajes de retención de hasta el 60%.

4.2.3 Optimización del volumen de extracción

En una tercera etapa se evaluó el volumen de extracto de papas con el principal objetivo de determinar las condiciones ideales para obtener los mejores porcentajes de retención en el sistema de extracción, para ello se evaluó el volumen de muestra previamente derivatizada siendo 5, 10 y 15 ml los volúmenes empleados con 1.0 g de resina siguiendo la metodología descrita anteriormente.

Los resultados obtenidos durante el análisis son mostrados en la figura 22, donde se observa que al aumentar el volumen de muestra disminuye considerablemente el porcentaje retención de AA; concluyendo que a mayor volumen de muestra la resina presenta una saturación impidiendo la retención de todo el analito presente en la solución, eligiendo 5 ml de solución derivatizada como el volumen óptimo en la retención de AA existiendo un equilibrio entre los sitios activos disponibles en la resina y la cantidad AA que pueda interaccionar con la misma mejorando la eficiencia en la extracción.



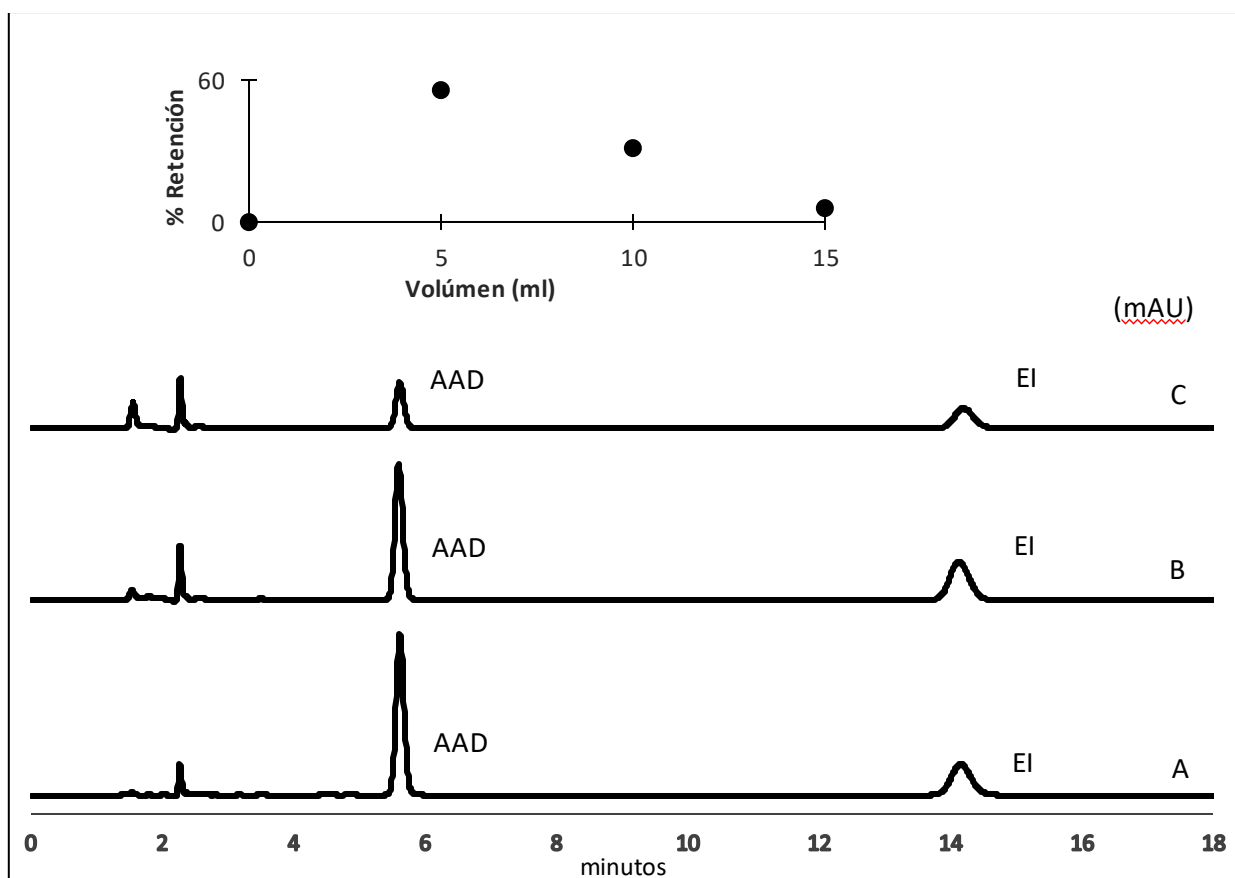
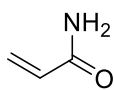


Figura 22. Evaluación del volumen óptimo para el intercambio iónico, cromatogramas A) 5 ml, B) 10 ml y C) 15 ml.

4.3 Elución del compuesto derivatizado

Una vez obtenidas las condiciones óptimas en la pre-concentración de AA, en una segunda etapa del proceso se evaluaron las condiciones de elución, para ello se realizó la adición de diversos solventes orgánicos probando la eficacia de los mismos en la elución del analito de interés, empleando solventes como: ACN acidificado ($\text{HCl } 5 \times 10^{-3} \text{ M}$), metanol acidificado ($\text{MeOH-HCl } 5 \times 10^{-3} \text{ M}$) y ácido acético ($\text{HAc } (5 \times 10^{-3} \text{ M})$).



El procedimiento se llevó a cabo al término del intercambio iónico donde las fases fueron separadas, lavando la resina en dos ocasiones con NaOH (1×10^{-3} M) garantizando la permanencia de la AA en la superficie de la resina. Posteriormente la resina se pone en contacto con los distintos agentes eluyentes manteniendo una agitación suave y constante durante 15 min.

Conforme a los resultados obtenidos en la evaluación de la elución, se observó que en la adición de una solución de MeOH-HCl 5×10^{-3} M como agente eluyente se obtienen una buena señal cromatográfica de la AAD eluida, en comparación con los otros agentes eluyentes con los cuales el análisis fue prácticamente nulo. Por lo tanto y de acuerdo a los resultados se selecciona la solución de MeOH-HCl como la más adecuada en la elución de AA tal y como se muestra en la fig. 23.

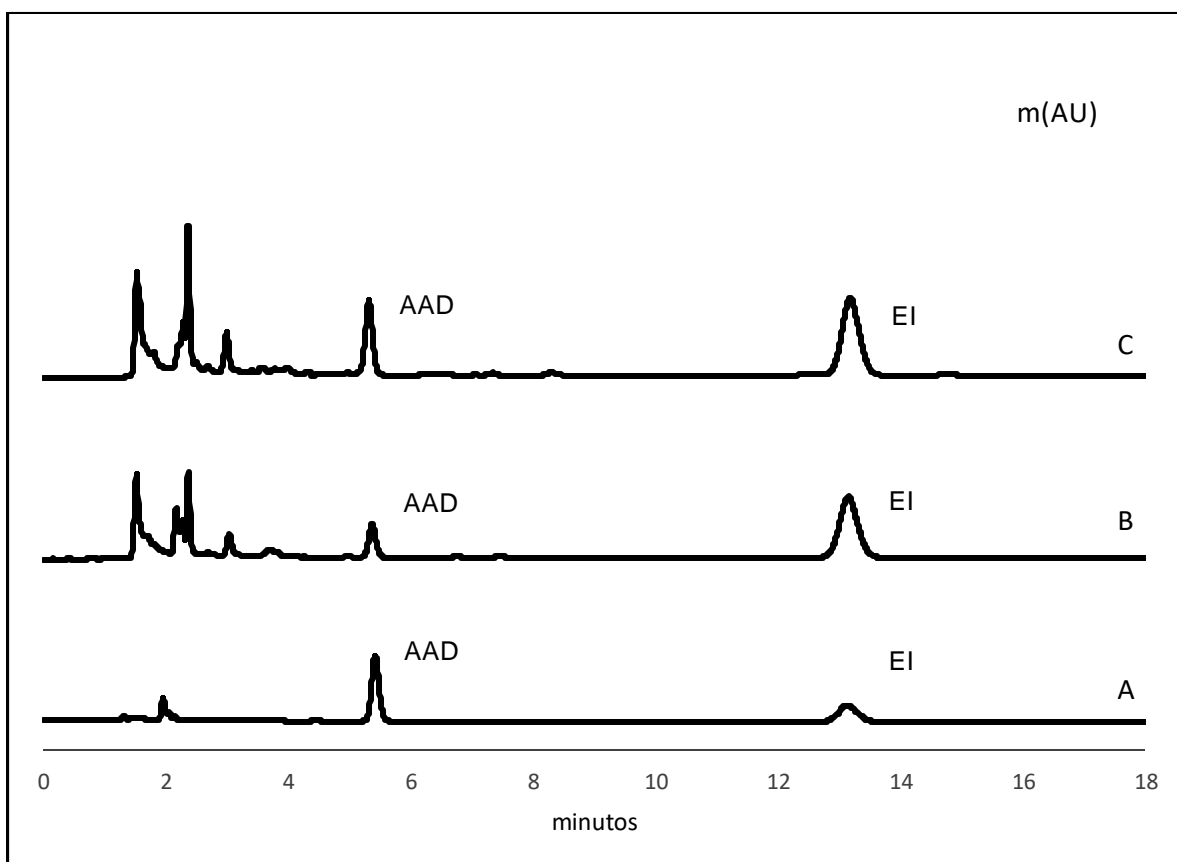
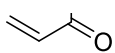


Figura 23. Elución de acrilamida. Cromatogramas: A) Muestra estándar con 10 ppm AA; B) Solución remanente después de la extracción con resina; C) Elución de AA con MeOH-HCl



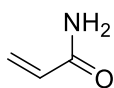
4.4 Determinación de los parámetros analíticos

Bajo las condiciones óptimas de análisis (derivatización 80°C, 30 min; intercambio iónico: 1g de resina, 5 ml de extracto de papas, tiempo de contacto 30min; elución con una solución metanol-HCl $5 \times 10^{-3} \text{M}$), se determinaron los parámetros analíticos del sistema mediante la construcción de una curva de calibrado en extracto acuoso de papas fritas con un intervalo de AA ($1\text{-}60 \text{ mg l}^{-1}$), analizadas bajo las condiciones anteriormente descritas (tabla 5), es importante mencionar que también se realizó una curva de calibrado utilizando soluciones patrón de AA en agua.

Tabla 5. Parámetros analíticos en muestras dopadas de papas fritas ($n=3$)

Parámetros analíticos		
Coeficiente de correlación (R^2)		0.9979
Ordenada en el origen $b_0 \pm ts (b_0)$		0.0403 ± 0.0076
Pendiente $b_1 \pm ts (b_1)$		0.0334 ± 0.0100
Intervalo lineal (mg g^{-1})		0.127-7.619
Reproducibilidad (%DER, $n=3$)	0.635 mg g^{-1}	4.50 (7.49)
	6.349 mg g^{-1}	48.16 (8.77)
Repetitividad (%DER, $n=3$)	0.635 mg g^{-1}	4.83 (4.98)
	6.349 mg g^{-1}	50.35 (5.33)
LOD (mg g^{-1})		0.482
LOQ (mg g^{-1})		1.445

De acuerdo a los parámetros analíticos se obtiene un LOD de $0.482 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$ y un LOQ $1.445 \text{ (mg g}^{-1}\text{)}$ con una repetitividad y reproducibilidad adecuada en el análisis de AA con porcentajes de desviación estándar relativa (%DER) menores al 10% en todos los casos. Sin embargo se observa que los límites de determinación y cuantificación obtenidos no presentan alta sensibilidad como otros estudios realizados y reportados, esto se debe principalmente a la técnica de pre-concentración ya que no se extrajo el 100% de la AA presente en los extractos acuosos de papas fritas.



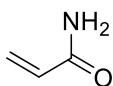


CONCLUSIONES



5. Conclusiones

1. Conforme a los resultados obtenidos en la optimización en la reacción de derivatización, se demostró que el ácido 4-mercaptobenzoico resulta un agente derivatizante adecuado, con la ventaja adicional de minimizar el tiempo de reacción con respecto a otros agentes derivatizantes.
2. El método de HPLC-DAD con derivatización pre-columna empleando el ácido 4-mercaptobenzoico es una alternativa en la determinación de acrilamida en muestras complejas
3. De acuerdo a los resultados obtenidos el pretratamiento de la muestra empleado resulta ser adecuado con la principal ventaja de minimizar la cantidad de interferentes presentes en la matriz analítica sin requerir procedimientos de limpieza laboriosos. El método propuesto por intercambio aniónico en la preconcentración de acrilamida presenta la limitante de proveer bajos porcentajes de retención del analito.
4. Los parámetros analíticos del sistema (HPLC-DAD) acoplado con extracción por intercambio iónico presentan límites de detección y cuantificación (0.482 y 1.445 mg g⁻¹) por encima de los reportados en el implemento de otras técnicas de extracción.
5. De acuerdo a los resultados obtenidos se sugiere el estudio y evaluación de otros métodos de extracción que permitan alcanzar límites acordes a las normativas internacionales como extracción en fase sólida (SPE) o micro-extracción en fase sólida (SPME), que han sido altamente utilizados por diversos autores.





REFERENCIAS



Baskan S. and Erim B.F. *NACE for the analysis of acrylamide in food.* Electrophoresis 28, (2007), 4108-4113.

Benavides L. O., Arango O., Hurtado M. A. y Rojas C. M. *Cuantificación de Sapogeninas del Jugo Fresco y Fermentado de Figue (Furcraea gigantea) mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC-PDA)* Inf. Tecnol. 23, (2012), 67-76.

Bermudo E., Núñez O. Puignou L. and Galceran M.T. *Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis.* J Chromatogr A, 1120, (2006), 199-204.

Bethke P.C. and Bussan A.J. *Acrylamide in processed Potato products.* Am J. Potato Res. 900, (2013), 403-424.

Bover-Cid S., Latorre-Moratalla M.L., Veciana-Nogués M.T. and Vidal-Carou M. C. *Processing contaminants: Biogenic Amines.* Elsevier Inc. (2014), 381-392.

Brennan G.J. *Food Processing Handbook.* Wiley-VCH. (2006), 1-35.

Chung, W.; Hui, K. and Cheng, S. *Sensitive method for the determination of 1,3-dichloropropan-2-ol and 3-chloropropane-1,2-diol in soy sauce by capillary gas chromatography with mass spectrometric detection.* J. Chromatogr. A, 952, (2002), 185-192.

Crews C. *Processing contaminants: Chloropropanols and Related Esters.* Elsevier Inc. (2014), 391-398.

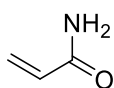
Crews C. *Processing contaminants: Furan.* Elsevier Inc. (2014), 399-403.

Crews C. and Castle L. *A review of the occurrence, formation and analysis of furan in heat-processed foods.* J.Tifs 18, (2007), 365-372.

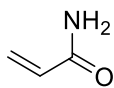
Domingo, J.L. and Nadal, M. *Carcinogenicity of consumption of red and processed meat: What about environmental contaminants?* Mar. Environ. Res. 145, (2016), 109-115

Dybing E., Farmer P.B., Andersen M. and Fennell T.R. *Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food.* Food Chem. Toxicol. 43, (2005), 365-410.

Elceman A. G., Hill H. H. Jr. and Davani B. *Gas Chromatography.* Anal. Chem. 66, (1994), 621R-633R.



- Ermacora, A.** and Hrnčirik, K. *Influence of oil composition on the formation of fatty acid esters of 2-chloropropane-1,2-diol (2-MCPD) and 3-chloropropane-1,2-diol (3-MCPD) under conditions simulating oil refining.* Food Chem. 161, (2014), 383-389.
- Fan X.** *Furan formation from fatty acids as a result of storage, gamma irradiation, UV-C and heat treatments.* Food. Chem. 175, (2015), 439-444.
- Friedman, M.** *Chemical basis for biological effects of acrylamide. A review.* J. Agric. Food Chem. 51, (2003), 4504-4526
- Galceran M.T.** *Aminas heterocíclicas en alimentos cocinados.* Revista Nutrición, (2002), 39-47.
- Harris D.C.** *Análisis químico cuantitativo.* Editorial Reverté. 3ª Edición (2010), 654-658
- Herrero M.,** García-Cañas V., Simo C. and Cifuentes A. *Recent advances in the application of capillary electromigration methods for food analysis and foodomics. Review.* Electrophoresis 31, (2010), 205-228.
- Hird, S.J.;** Lau, B.P-Y.; Schuhmacher, R. and Krska, R. *Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food.* Trends Anal. Chem. 59, (2014), 59-72.
- Jägerstad, M.** and Skog, K. *Genotoxicity of heat-processed foods.* Mutat. Res. 574, (2005), 156-172.
- Jezussek M.** and Schieberle P. *A new LC/MS-Method for the Quantification of Acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with two GC/MS-Methods.* J. Agric. Food Chem. 51, (2003), 7866-7871.
- Juániz, I.;** Zocco, C.; Mouro, V.; Cid, C. and Paz de Peña, M. *Effect of frying process on furan content in foods and assessment of furan exposure of Spanish population.* LWT. Food Sci. Technol. 68, (2016), 549-555.
- Keramat J.,** LaBail L., Prost C. and Soltanizadeh N. *Acrylamide in foods: Chemistry and Analysis. A Review.* Food Bioprocess Technol 4, (2011), 340-363.
- Kim T.,** Kim S. and Lee K. *Analysis of furan in heat-processed foods consumed in Korea using solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS).* Food Chem. 123, (2010), 1328-1333.



Lagante F.A. and Felter A.M. *Silylation of acrylamide for analysis by Solid-Phase Microextraction/Gas Chromatography/Ion Trap Mass Spectrometry*. J. Agric. Food Chem. 52, (2004), 3744-3748.

Nie S., Huang J., Zhang Y. and Hu J. *Analysis of furan in heat-processed foods in China by automated headspace gas chromatography-mass spectrometry (HS-GC-MS)*. Food.Cont. 30, (2013), 62-68.

Oracz J., Nebesny E. and Zyzelewicz D. *New trends in quantification of acrylamide in food products. Review*. Talanta 86, (2011), 23-34.

Palma L.M. y Guillén S. D.A. *La Cromatografía Líquida en la enología*. Revista de enología, 126, (2011), 1697-4123.

Parzefall W. *Minireview on the toxicity of dietary acrylamide*. J.FCT. 46, (2008), 1360-1364.

Pérez C. R. *Estudio de validación de la Metodología para la determinación de Vitamina A en Alimentos infantiles instantáneos por Cromatografía Líquida de alto rendimiento (HPLC)* Rev. Perú. Med. Exp. Salud Pública.17 (2000), N.1-4.

Resumen de salud pública: Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAPs). Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades de USA. (ATSDR). Agosto (1995), 1-7.

Rice J.M. *The carcinogenicity of acrylamide. Review*. Mutat. Res. 580, (2005), 3-20.

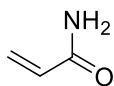
Rudén C. *Acrylamide and cancer risk-expert risk assessments and the public debate*. Food Chem Tox. 42, (2004), 335-349

Singh, L; Varshney, J.G. and Agarwal, T. *Polycyclic aromatic hydrocarbons formation and occurrence in processed food*. Food Chem. 199, (2016), 768-781.

Skog K. and Viklund G., *Processing contaminants: Acrylamide*. Elsevier Inc. (2014), 363-370.

Técnicas Cromatográficas. Facultad de Química; Química Analítica Instrumental II. UNAM; http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/M.Cromatograficos_6700.pdf julio, 2016, (2007), 1-10.

Tekkeli S.E.K., Önal C. and Önal A. *A Review of current methods for the determination of acrylamide in food products*. Food Anal. Methods 5, (2012), 29-39.



Tritscher, A.M.; *Human health risk assessment of processing-related compounds in food.* Toxicol. Lett. 149, (2004), 177-186.

Wenzl T., De la Calle B.M. and Anklam E. *Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review.* Food Addit. Contam. 20, (2003), 885-902.

Yaqueis P. A. S., Nieves F. M., Miranda M. L. y Lozano I, J. C. *Método analítico para la determinación de protirelina por cromatografía líquida de alta resolución* Rev Cubana Farm. 32, (1998), 93-98.

Zhou, H.; Jin, Q.; Wang, X. and Xu, X. *Direct measurement of 3-chloropropane-1,2-diol fatty acid esters in oils and fats by HPLC method.* Food Control 36, (2014), 111-114.

