



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos
Facultad de Veterinaria
Universitat Autònoma de Barcelona

**Desarrollo de un método analítico para la
cuantificación de acrilamida en tostadas de tortillas
de maíz procedentes de Monterrey (México) y
estimación de la exposición dietética**

Tesis Doctoral dirigida por:

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dr. Pedro César Cantú Martínez

Memoria presentada para
optar al grado de Doctora en
Ciencia y Tecnología de los Alimentos

Mirna Elizabeth Santos Lara

Bellaterra 2017

Los Directores de tesis, ANTONIO JOSÉ TRUJILLO MESA, Catedrático de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (España), PEDRO CÉSAR CANTÚ MARTÍNEZ, Profesor Investigador de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León (México) y la Tutora de tesis MANUELA HERNÁNDEZ HERRERO, Profesor Titular de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona (España).

HACEN CONSTAR: Que la maestra en Ciencias de los Alimentos MIRNA ELIZABETH SANTOS LARA ha realizado, bajo su dirección en el Área de Tecnología de los Alimentos de la Universitat Autònoma de Barcelona, el trabajo titulado “*Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz procedentes de Monterrey (México) y estimación de la exposición dietética*” que presenta para optar al grado de Doctora.

Y para que así conste firmamos el presente documento en Bellaterra (Cerdanyola del Vallés), Mayo 2017.

Dr. Antonio José Trujillo Mesa

Dr. Pedro César Cantú Martínez

Dra. Manuela Hernández Herrero

*Y tal confianza tenemos mediante Cristo para con Dios;
no que seamos competentes por nosotros mismos para pensar algo como de
nosotros mismos, sino que nuestra competencia proviene de Dios.*

2 Corintios 3:4-5

A mi Madre, a la memoria de mi Padre a mi Familia

*Dios gracias, por haberme regalado el don de la vida, por ser mi fortaleza en mis
momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de mucho aprendizaje,
experiencia, felicidad y permitirme el haber llegado hasta este momento tan
importante de mi formación profesional.*

Agradecimiento

Mi reconocimiento especial a la Dra. Lidia Rumia Nacha Torres por su tiempo dedicación y apoyo incondicional para compartir su tiempo y sus conocimientos.

A mis directores de tesis Dr. Antonio José Trujillo Mesa y Dr. Pedro Cesar Cantú por haberme confiado en este trabajo en mi persona, por su paciencia ante mi inconsistencia, por su valiosa dirección y apoyo para seguir este camino de tesis y llegar a la conclusión del mismo.

A la Unión Ganadera del estado de Nuevo León, al Ing. José G. Murarúa Gutiérrez, Director General del Laboratorio Central Regional de Monterrey S.A de C. V., a la Química Miriam Montante Leal, Jefa del departamento de Residuos Tóxicos, a todos los compañeros del Laboratorio en especial al técnico laboratorista Luis Carlos Tovar mi más profundo agradecimiento y por el apoyo técnico y económico, con el cual realicé este trabajo.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León por su apoyo a través del Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT-UANL).

A mi Directora Hilda Irene Novelo Huerta por todo su apoyo, a Manuel López Cabanillas Lomeli, por los trámites y enlace ente UANL – UAB.

Todos mis compañeros de grupo, Adela, Arnoldo, Betty, Gustavo, José Luis, Lety, Lulú, Marco, Paty Rodrigo y Tere, y sin excepción a mis pasantes gracias por todo su apoyo incondicional, por el respaldo y la amistad. Gracias.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	5
1.1 Acrilamida: Generalidades	11
1.1.1 Características químicas, propiedades físicas y estructura	11
1.1.2 Estructura química de la acrilamida	12
1.1.3 Formación de la acrilamida en los alimentos	12
1.1.3.1 Reacción de Maillard	13
1.1.3.2 Vías alternativas de formación	14
1.2 Factores que influyen en la formación de acrilamida en los alimentos	17
1.2.1 Temperatura	17
1.2.2 Composición química de los alimentos	18
1.2.3 Contenido de agua.....	19
1.2.4 pH en los alimentos	20
1.2.5 Forma o tamaño del alimento	20
1.3 Niveles de acrilamida en alimentos	21
1.4 Métodos empleados en el análisis de acrilamida en alimentos.....	25
1.4.1 Método de cromatografía de gases (GC).....	32
1.4.1.1 Método de cromatografía de gases-masas (GC-MS)	32
1.4.1.2 Cromatografía de GC-MS y análisis directo de acrilamida	33
1.4.1.3 Cromatografía de GC-MS y análisis de acrilamida por derivatización con bromación.....	33
1.4.1.4 Cromatografía de GC-MS y análisis de acrilamida por derivatización con N, 0-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BTMSA)	34
1.4.1.5 Método de cromatografía de gas con impacto de electrones (GC-IE).....	35
1.4.2 Método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas- masas (LC-MS/MS)	35
1.5 Toxicidad de la acrilamida	38
1.6 Estimación de la ingesta de acrilamida en la dieta.....	39
1.7 Maíz en México	40
1.7.1 Definición de tortilla de maíz.....	40
1.7.2 Valor nutritivo y consumo de tortilla	41

1.7.3 Subproductos de tortillas de maíz: tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas	41
1.7.3.1 Tostada.....	42
1.7.3.2 Tostada de maíz frita	42
1.7.3.3 Tostada de maíz horneada.....	42
II. OBJETIVOS	43
2.1 Objetivo general	45
2.2 Objetivos específicos	45
2.2.1 Seleccionar un método analítico capaz de cuantificar los niveles de acrilamida encontrados en los productos a base de cereales	45
2.2.2 Adaptar y validar el método analítico de cuantificación de acrilamida seleccionado (LC-MS/MS) en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas	45
2.2.3 Cuantificar la presencia de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas comercializadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (México) mediante el método de LC-MS/MS	45
2.2.4 Relacionar la presencia de acrilamida según tipo de tortillas de maíz y proceso de fabricación.....	46
2.2.5 Determinar la ingesta diaria de acrilamida por peso corporal en la población de Monterrey, Nuevo León (México) estimando la exposición a este contaminante y el riesgo asociado por consumo de tortillas de maíz	46
III. DISEÑO EXPERIMENTAL	47
3.1 Diseño experimental: actividades, motivos y justificación.	49
3.1.1 Estudios de acrilamida	49
3.1.2 Selección de muestra de matriz para el análisis de acrilamida.....	50
3.1.3 Determinación de la ingesta diaria de acrilamida por grupo de edad ...	50
3.2 Plan de trabajo.	51
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	53
4.1 Equipos	55
4.2 Material	56
4.3 Material de seguridad.....	56

4.4	Reactivos	57
4.5	Metodología	58
4.5.1	Determinación de acrilamida por cromatografía de gases-masas	58
4.5.2	Determinación de acrilamida empleando N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) por cromatografía de gases-masas (GC-MS).....	59
4.5.2.1	Preparación del estándar de acrilamida	60
4.5.3	Determinación de acrilamida por cromatografía de gases con captura de electrones	60
4.5.3.1	Preparación de la solución stock	62
4.5.3.2	Solución de trabajo	62
4.5.3.3	Soluciones de la curva externa.....	63
4.5.3.4	Condiciones cromatográficas del método con captura de electrones	63
4.5.3.5	Curva de calibración	63
4.5.3.6	Preparación de la muestra.....	64
4.5.4	Determinación de acrilamida por el método de cromatografía líquida acoplada a masas-masas (LC-MS/MS)	64
4.5.4.1	Preparación de soluciones de acrilamida y metacrilamida	64
4.5.4.2	Establecimiento de las condiciones para el análisis de acrilamida por LC-MS/MS.....	65
4.5.4.2.1	Validación del sistema.....	65
4.5.4.2.2	Linealidad del sistema	66
4.5.4.2.3	Precisión.....	66
4.5.4.2.4	Exactitud.....	66
4.5.4.2.5	Límite de detección (LD) y cuantificación (LC).....	66
4.5.4.2.6	Curva de calibración de acrilamida	67
4.5.4.3	Determinación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas por LC-MS/MS	67
4.5.4.3.1	Fortificación de la muestra	68
4.5.4.4	Validación del método para la determinación de acrilamida.....	68
4.5.4.4.1	Linealidad	68
4.5.4.4.2	Exactitud y precisión	69

4.5.4.4.3 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).....	69
4.5.4.5 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas de tostadas horneadas y fritas	70
4.5.4.6 Preparación de la muestra.....	70
4.5.4.6.1 Extracción.....	70
4.5.4.6.2 Limpieza y purificación	71
4.5.4.7 Condiciones de cromatografía del método LC-MS/MS.....	71
4.5.4.8 Procedimiento de cuantificación	72
4.5.4.8.1 Cálculos del analito	73
4.5.4.8.2 Control de calidad	73
4.5.5 Determinación de la exposición a la acrilamida en la población	75
4.5.6 Análisis estadístico	76
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
5.1 Métodos probados para determinar acrilamida	79
5.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas	79
5.1.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (método directo)	79
5.1.1.2 Empleo de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) por cromatografía de gases-masas (GC-MS).....	81
5.1.2 Cromatografía de gases con captura de electrones (GC-ECD).....	82
5.1.2.1 Validación del sistema	82
5.1.2.2 Optimización del equipo	83
5.1.3 Determinación de acrilamida por el método de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)	86
5.1.4 Desarrollo y validación del método analítico para determinar acrilamida por LC-MS/MS	86
5.1.5 Técnica LC-MS/MS.....	87
5.1.5.1 Condiciones instrumentales.....	87
5.1.5.2 Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas	87
5.1.5.3 Optimización de las transiciones de fragmentación y de las energías de colisión	88
5.1.5.4 Optimización de la separación cromatográfica	88

5.1.5.5 Optimización de la fase móvil	89
5.1.5.6 Optimización del tiempo de retención.....	89
5.1.5.7 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica	91
5.1.5.8 Optimización del proceso de extracción	92
5.1.6 Validación del sistema	92
5.1.7 Validación del método.....	94
5.1.7.1 Curva de calibración de acrilamida.....	94
5.1.8 Linealidad.....	95
5.1.9 Precisión	95
5.1.10 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)	95
5.1.11 Recobro de extracción.....	96
5.1.12 Aplicación del método en muestras comerciales	97
5.2 Niveles de acrilamida en diferentes tipos de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas.....	102
5.3 Ingesta diaria de acrilamida y evaluación del riesgo a su exposición (riesgo carcinogénico).....	107
5.3.1 Estimación de la ingesta diaria de acrilamida por grupos de edad	109
5.3.2 Evaluación del riesgo a la exposición dietética de acrilamida.....	115
VI. CONCLUSIONES.....	117
VII. BIBLIOGRAFÍA.....	123

RESUMEN

Tesis Doctoral. Mirna Elizabeth Santos Lara. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos, Facultad de Veterinaria, Universitat Autònoma de Barcelona

La acrilamida es una molécula muy polar altamente soluble en agua. Es un compuesto neurotóxico, genotóxico y carcinógeno, catalogado como probable carcinógeno para humanos por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer. En el 2002 se reportó presencia de niveles muy altos de acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos cuando son sometidos al proceso de cocción por horneado, fritura, tostados o asado por encima de 120 °C. Este hallazgo generó gran preocupación a nivel mundial por el riesgo que representa para la salud pública y ha llevado a organismos internacionales a incluir a la acrilamida como un tema prioritario en la seguridad alimentaria.

Este trabajo de investigación se centró en tortillas de maíz, por ser un producto base en la alimentación de México, planteando el desarrollo de un método analítico para la cuantificación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz procedentes de Monterrey (Nuevo León, México) y la estimación de la exposición dietética.

Para la determinación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz se probaron diversas técnicas y métodos analíticos: cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS), GC-MS empleando el N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) como agente derivatizante, cromatografía de gases con captura de electrones (GC-ECD) y cromatografía líquida acoplada a masas-masas (LC-MS/MS). Después de revisar las dificultades en cuanto a la aplicación de cada uno de los métodos mencionados se optó por la LC-MS/MS.

El método propuesto se validó evaluando linealidad con intervalo de concentraciones de 0,5 a 1000 µg/kg, coeficientes de correlaciones mayores a 0,996. Exactitud expresada como porcentaje de error presentó valores de 1,96%.

El límite de detección fue de 3 ppb y de cuantificación de 10 ppb, se obtuvo una recuperación de 101%. La cuantificación fue por el método de adición de estándar. Desarrollando un método preciso, exacto y capaz de cuantificar acrilamida a niveles bajos en tostadas de tortillas de maíz.

Analizando un total de 45 muestras comerciales de tostadas de tortillas de maíz, clasificadas como tortillas de maíz, tostadas fritas grandes, tostadas horneadas y tostadas pequeñas, redondas y fritas. Las concentraciones de acrilamida presentadas en las tortillas fritas grandes (n=11) fueron de 114,26-279,19 µg/kg. En el grupo de tostadas horneadas (n=14) se encontró de 154,18-266,53 µg/kg, superando en ambos casos la media recomendada por la Comisión Europea, que sugiere valores indicativos de 200 µg/kg en productos de maíz (Recomendación 2013/647/UE, European Commission, 2013). Las concentraciones más bajas de acrilamida se presentaron en la clasificación del grupo de tostadas pequeñas, redondas y fritas, con un intervalo de concentración de 115,66 a 197,34 µg/kg (n=16).

Para la estimación del consumo promedio de acrilamida se tomaron los datos obtenidos de la ingesta diaria del consumo de tostadas de tortillas de maíz por grupo de edad, así como el peso corporal promedio de la población por grupo de edad, y la cantidad de acrilamida determinada en las tostadas de tortillas de maíz (se tomó como referencia las tortillas de maíz horneadas con un contenido medio de acrilamida de 210,36 µg/kg), los resultados obtenidos se compararon con la estimación de referencia propuesta en 2011 por la JECFA para los procesos tumorales y los problemas neurotóxicos. El mayor consumo y así exposición a la acrilamida lo presentó el grupo de adultos jóvenes (20-39 años) con 0,73-0,70 µg/kg, seguido del grupo de adultos (40-59 años) con 0,51-0,47 µg/kg, después el grupo de menores (5-11 años) con 0,19 µg/kg y el grupo de adultos mayores (60+ años) con 0,19-0,14 µg/kg, y finalmente el grupo de adolescentes (12-19 años) con 0,11-0,12 µg/kg. Estos resultados muestran que el mayor riesgo de exposición a la acrilamida lo presentan los adultos jóvenes y adultos.

SUMMARY

Acrylamide is a polar and highly soluble in water molecule. Is a neurotoxic, genotoxic and carcinogen compound, catalogued as a probably carcinogen for human beings by the International Agency for Research on Cancer.

In 2002 the presence of very high levels of acrylamide in rich carbohydrate foods when they are submitted to the process of baked, fried, toasting or roasting over 120 °C, was reported. This finding generated great concern worldwide because of the risk that it represents for the public health, leading international organizations to include acrylamide as a priority topic in food safety.

This investigation was focused on the toasted corn tortillas, for being a product of high consumption in Mexico, raising the development of an analytical method for the quantification of acrylamide in toasts of corn tortillas from Monterrey (Nuevo León, Mexico) and the estimation of the dietetic human exposure.

For the determination of acrylamide in toasts of corn tortillas diverse technologies and analytical methods were proved: gas chromatography with mass detector (GC-MS), GC-MS using N, O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) as derivatization agent, electron capture gas chromatography (GC-ECD) and mass mass liquid chromatography (LC-MS/MS). After checking the difficulties for the application of each one of the mentioned methods the LC-MS/MS was chosen.

The proposed method was validated evaluating the linearity in an interval of concentrations from 0.5 to 1000 µg/kg, with correlations coefficient being bigger than 0.996. The accuracy expressed as error percentage presented values of 1.96%. The detection limit was 3 ppb, the quantification limit was 10 ppb, and a recovery of 101% was obtained. The quantification was for the method of standard addition. Therefore, a precise and exact method, able to quantify acrylamide at low levels in toasted corn tortillas, was developed.

The concentrations of acrylamide obtained in the fried big tortillas (n=11) were 114.26-279.19 µg/kg. In the group of baked toasts (n=14) the values were in the range of 154.18-266.53 µg/kg, overcoming in both cases the average recommended by the European Commission, which suggests indicative values of

200 µg/kg in corn products (Recommendation 2013/647/UE, European Commission, 2013). The lower concentrations of acrylamide appeared in the group classified as small, round and fried toasts, with an interval of concentration from 115.66 to 197.34 µg/kg (n=16).

For the estimation of the average consumption of acrylamide, the information obtained of the daily ingestion of corn tortillas toasts by group of age, as well as the corporal average weight of the population for group of age, and the quantity of acrylamide in the corn tortillas toasts (we took as a reference the corn tortillas baked with an average content of acrylamide of 210.36 µg/kg) were considered, and the obtained results were compared with the reference estimation proposed in 2011 by the JECFA for the tumour processes and the neurotoxic problems.

The biggest consumption and then exposure to the acrylamide was presented by the group of young adults (20-39 years) with 0.73-0.70 µg/kg, followed by the group of adults (40-59 years) with 0.51-0.47 µg/kg, next to under eighteen group (5-11 years) with 0.19 µg/kg and the group of senior citizen (60 + years) with 0.19-0.14 µg/kg, and finally the group of teenagers (12-19 years) with 0.11-0.12 µg/kg. These results showed that the biggest exposure risk to the acrylamide is that presented by the young and adult adults.

I. INTRODUCCIÓN

En nuestra vida diaria nos exponemos a una gran cantidad de sustancias químicas, ya sea en el aire que respiramos, los productos que empleamos en la casa o el jardín, incluso en el agua que bebemos y los alimentos que consumimos. En estos últimos se ha detectado, después de años de investigación científica, la presencia de sustancias químicas tóxicas para el consumidor, ya sea que ingresaron por vía externa o se formaron durante los tratamientos tecnológicos usados en su preparación, como los procesos térmicos que se utilizan para la cocción, esterilización, fritura, tostado u horneado (Barlow *et al.*, 2009).

El término contaminante se refiere a cualquier sustancia que no haya sido agregada intencionadamente al alimento en cuestión, pero que se encuentra en el mismo como residuo de la producción, fabricación, transformación, preparación, tratamiento, acondicionamiento, empaquetado, transporte, almacenamiento o como consecuencia de la contaminación ambiental. Esta definición no abarca las partículas extrañas, por ejemplo, restos de insectos, pelos de animales u otras (Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición - Aecosan, 2016).

En el grupo de contaminantes industriales y medioambientales se engloban aquellas sustancias que se derivan de la actividad industrial y se acumulan en el ambiente, incluyendo micotoxinas, nitratos, metales pesados, contaminación radioactiva, todo el grupo de contaminantes orgánicos persistentes (COP: dioxinas y policlorobifenilos, PCB; sustancias perfluoroalquiladas, PFA; retardantes de llama bromados, BFR), cloropropanoles/3-MCPD e hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), entre otras sustancias, como melamina, estaño, perclorato, níquel, etil carbamato y furano (Aecosan, 2016).

Los tratamientos térmicos implican una serie de transformaciones en los alimentos que crean nuevos compuestos, los cuales, de manera general, inciden en la aceptabilidad del producto por el consumidor. Sin embargo, en algunos casos el empleo de altas temperaturas, en combinación con otros factores externos, produce compuestos tóxicos que reducen el valor biológico y afectan la seguridad de los alimentos (Jiménez *et al.*, 2007). Estas sustancias se incluyen en el grupo de contaminantes industriales y se forman durante el proceso de cocción,

es decir, no estaban presentes en el alimento fresco, y su origen está directamente relacionado con el proceso tecnológico o culinario aplicado. Algunas de estas sustancias están vinculadas con alergias, actividades mutagénicas, teratogénicas, carcinogénicas y otra serie de alteraciones en la salud en organismos vivos de gran complejidad, sobre todo al ser consumidas durante periodos prolongados (Barlow *et al.*, 2009). El desarrollo de estos padecimientos depende de factores internos de tipo personal, dosis o tiempo de exposición (Masson *et al.*, 2007). Por esta razón, los alimentos no sólo deben ser considerados como vehículos de nutrimentos para el hombre, sino también de contaminantes y tóxicos que en la mayoría de los casos resultan por descuido de actividades antropogénicas diversas, o bien, por desconocimiento y falta de calidad en los procesos aplicados, que se han intensificado desde la Revolución Industrial (Vega *et al.*, 2007).

Uno de los primeros compuestos químicos generados durante la preparación de alimentos que ha sido objeto de numerosos estudios es la acrilamida, la cual se produce durante la aplicación de métodos tradicionales de cocción. Los resultados obtenidos en estos estudios han establecido que la acrilamida se crea en diversos tipos de comida de acuerdo a su origen, composición y modo de preparación (Jiménez *et al.*, 2007). De acuerdo a la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC, <https://www.iarc.fr/>) y con base en los estudios realizados en animales, la acrilamida se encuentra clasificada como probable carcinógeno para los humanos (Grupo 2A).

En abril de 2002, la Autoridad Sanitaria Sueca de los Alimentos (Swedish National Food Authority), junto a un grupo de investigadores de la Universidad de Estocolmo, anunciaron el descubrimiento de niveles relativamente altos de acrilamida en muchos tipos de alimentos, formada al momento de preparar, cocer, freír u hornear a altas temperaturas (más de 120 °C), principalmente en alimentos particularmente ricos en almidón y pobres en proteínas. Entre los productos analizados destacaron por su concentración en acrilamida los productos industrializados derivados de los cereales y los tubérculos, sobre todo los

procedentes de plantas de procesamiento comerciales, de establecimientos de servicios alimentarios y, finalmente del hogar (Tareke *et al.*, 2002).

El antiguo Comité Científico de la Alimentación Humana (Scientific Committee on Food, SCF) adoptó en 2002 la opinión científica sobre la presencia de acrilamida, en la que recomendaba reducir su contenido en alimentos ante la alerta lanzada por la autoridad sanitaria sueca. Por otra parte, la Comisión Europea publicó en 2003 recomendaciones dirigidas a las industrias de alimentos, restaurantes y consumidores para lograr reducir esta sustancia en los grupos de alimentos susceptibles. Además, en colaboración con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, <http://www.efsa.europa.eu/>), se creó una base de datos de acrilamida que incluye las investigaciones desarrolladas por los estados miembros y una recopilación de información sobre este contaminante en todos los grupos de alimentos.

También a nivel internacional, evaluaciones llevadas a cabo por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/es/>), en especial las de 2005 y 2010, y recientemente la llevada a cabo por los expertos de la EFSA han concluido que son necesarias más investigaciones para establecer una ingesta diaria tolerable (IDT) de acrilamida en alimentos.

Los expertos de la EFSA estimaron el intervalo de la dosis en el que la acrilamida presenta más probabilidad de causar una pequeña pero apreciable incidencia de tumores (efecto neoplásico) u otras consecuencias adversas potenciales, como afectar la reproducción masculina y daños neurológicos en el desarrollo pre o posnatal. El valor mínimo de este intervalo se llama límite mínimo de confianza para la dosis de referencia (BMDL₁₀). En el caso de tumores, los expertos seleccionaron un BMDL₁₀ de 0,17 mg/kg de peso corporal por día; para otros efectos, los cambios neurológicos fueron aquellos con un BMDL₁₀ de 0,43 mg/kg de peso corporal por día.

Comparando el BMDL₁₀ con la exposición de los humanos a la acrilamida a través de la dieta, los científicos pueden indicar un nivel de peligro sanitario,

conocido como margen de exposición (MOE: Margin of Exposure), el cual no cuantifica el riesgo. Aun así, el uso del MOE puede ayudar a los gestores del riesgo a definir las posibles acciones necesarias para mantener la exposición a dichas sustancias tan baja como sea posible.

Desde 2002, cuando se descubrió la presencia de la acrilamida en los alimentos cocinados, se han utilizado varios métodos para su determinación y cuantificación, basados principalmente en la cromatografía, ya sea cromatografía gaseosa (GC) o cromatografía líquida (LC), junto con espectrometría de masas (Abdalla *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2005), aunque también se han desarrollado procedimientos rápidos de análisis (Hu *et al.*, 2015). Sin embargo, muchos de estos métodos no han sido eficientes para todos los grupos de alimentos, a lo cual se suma la falta de laboratorios con un método implementado para la determinación de acrilamida, así como la inexistencia de una normatividad que exija un control en los niveles de este compuesto en los alimentos.

La tortilla de maíz es el producto alimenticio básico más comercializado en México, ya que se estima que el 94% de la población la consume, lo que representa un volumen de producción y consumo cercano a los 12 millones de toneladas por año. La tortilla de maíz provee energía por su alto contenido de carbohidratos, además, es rica en calcio, potasio y fósforo; también aporta fibra, proteínas y algunas vitaminas, como la tiamina, riboflavina, niacina y vitamina A (Retes, 2010). Este alimento se le identifica principalmente como un complemento en forma de disco aplanado de masa de maíz nixtamalizado, cuyas dimensiones varían entre doce y dieciocho centímetros de diámetro y de uno a dos milímetros de espesor. Normalmente se cuece sobre un comal, que es una superficie caliente, generalmente metálica, cuya temperatura oscila entre 230 y 270 °C (Yuliana *et al.*, 2015). Las tortillas se pueden someter al proceso de tostado y fritura a altas temperaturas, generalmente de 160 a 300 °C para obtener tostadas de tortillas de maíz horneadas o fritas (Serna, 2008). Sus características de composición y la temperatura de tratamiento la convierten en un candidato ideal para generar acrilamida. Considerando que en México existen muy pocos estudios

sobre este contaminante en estos productos, ya sea su concentración o ingesta diaria, se planteó la necesidad de desarrollar y validar un método analítico para determinar la presencia de este compuesto en alimentos elaborados a base de maíz, principalmente las mencionadas tostadas de tortilla de maíz horneadas y fritas. La cuantificación de este tipo de analito y el análisis de la ingesta diaria del mismo indicarán el riesgo de consumir estos productos en la población de Monterrey (Nuevo León, México).

1.1 Acrilamida: Generalidades

1.1.1 Características químicas, propiedades físicas y estructura

La acrilamida (2-propenamida, $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) es un compuesto sólido, blanco y cristalino que carece de aroma, con un peso molecular de 71,08 g/mol. Es una molécula polar y altamente soluble en agua (2155 g/L a 30 °C), tiene baja solubilidad en alcoholes (1550 g/L en metanol y 860 g/L en etanol) y en otros solventes orgánicos polares (396 g/L en acetonitrilo, 126 g/L en acetato de etilo y 631 g/L en acetona), también es soluble en solventes orgánicos no polares como heptano o tetracloruro de carbono (<1 g/L). Tiene una densidad de 1,27 g/L (25 °C), su punto de fusión es de 84,5 °C y de ebullición a 25 mm/Hg es de 125 °C (Valenzuela *et al.*, 2007). La acrilamida sólida es estable a temperatura ambiente, pero puede polimerizarse violentamente cuando se mezcla o expone a agentes oxidantes. Se utiliza en la fabricación de materiales de poliacrilamida de alto peso molecular y para proporcionar a los materiales propiedades iónicas (El-Ziney *et al.*, 2009). Algunas de las aplicaciones más comunes de esos polímeros son el tratamiento de agua potable, procesado de petróleo, papel, minerales, concreto y textiles, también en la industria de los cosméticos, cirugías oftálmicas, plásticos, lentes de contacto y en emulsiones y adhesivos; además, está presente en el humo del tabaco (Sharama *et al.*, 2008; Zubeldia *et al.*, 2007).

1.1.2 Estructura química de la acrilamida

La estructura química de la acrilamida (Figura I.1) tiene un doble enlace reactivo deficiente de electrones y un grupo amida, así, sufre reacciones típicas de estos grupos funcionales y además exhibe propiedades de ácido y base débil (Castle & Eriksson, 2005).

El doble enlace electrolítico puede participar en reacciones como adición nucleofílica con grupos funcionales que tengan hidrógenos ácidos, reacciones Diels-Alder o reacciones medidas por radicales libres (Granados, 2007), siendo la química de la acrilamida más compleja que la del resto de las amidas alifáticas.

En presencia de radicales libres, la acrilamida fácilmente forma poliacrilamida siguiendo el mecanismo de polimerización vinílica, que puede ser iniciada por diferentes sistemas, entre ellos: peróxidos, persulfatos, pares redox, compuestos azo, sistemas fotoquímicos, perboratos, percarbonatos y radiación (Girma, 2005).

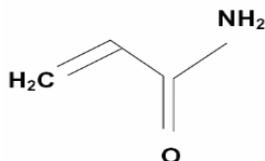


Figura I.1. Estructura química de la acrilamida. Tomado de Godnic (2010).

1.1.3 Formación de la acrilamida en los alimentos

Científicos del área de alimentos han estado tratando de elucidar las vías químicas de formación de la acrilamida y buscan tratamientos efectivos para reducir o inhibir su presencia, así como investigar la química de su toxicidad (Zhu *et al.*, 2008).

1.1.3.1 Reacción de Maillard

Según las investigaciones de los últimos años, se ha demostrado que la acrilamida se forma de manera mayoritaria mediante la reacción de Maillard, en la cual los grupos carbonilos de los azúcares reductores reaccionan con ciertos aminoácidos para formar este compuesto (Claus *et al.*, 2008; Kaplan *et al.*, 2009). También se ha comprobado que la asparagina es el aminoácido principal que interviene en esta reacción, por lo tanto, se le considera un precursor, como en el caso de los azúcares reductores. Esto explica, por ejemplo, por qué la cantidad de acrilamida en productos a base de patata es tan abundante, puesto que este tubérculo es particularmente rico en asparagina (Mottram *et al.*, 2002).

En la Figura 1.2 se presentan las reacciones principales que tienen lugar en la formación de la acrilamida, teniendo como reactivos principales la asparagina libre y una fuente de compuestos carbonílicos. Los estudios muestran que la acrilamida se forma a temperaturas altas ($> 120^{\circ} \text{C}$) y por una vía que involucra una base de Schiff como molécula precursora resultante de la reacción entre el azúcar reductor y el aminoácido (Barutcu *et al.*, 2009; Friedman & Levin, 2008; Stadler *et al.*, 2004). Según estas investigaciones, la reacción continúa con una descarboxilación y degradación posterior de la base de Schiff, la cual se produce por una rotura de un puente entre carbono y nitrógeno que puede darse por dos mecanismos principales. Por un lado, puede ocurrir la eliminación de una imina de la base de Schiff descarboxilada, dando como resultado la acrilamida. La otra vía posible consiste en una hidrólisis de la base de Schiff descarboxilada, para formar un compuesto carbonílico y además un precursor denominado 3-aminopropionamida, que puede perder una molécula de amoníaco para formar la acrilamida (Arribas, 2013).

Finalmente, hay que mencionar que la cantidad de asparagina que acaba por crear acrilamida es baja, del orden de 1%; estos valores se han calculado a partir de estudios realizados en sistemas modelo, más simples en comparación

con los alimentos, por lo que el rendimiento de estas reacciones es menor (Stadler, 2006).

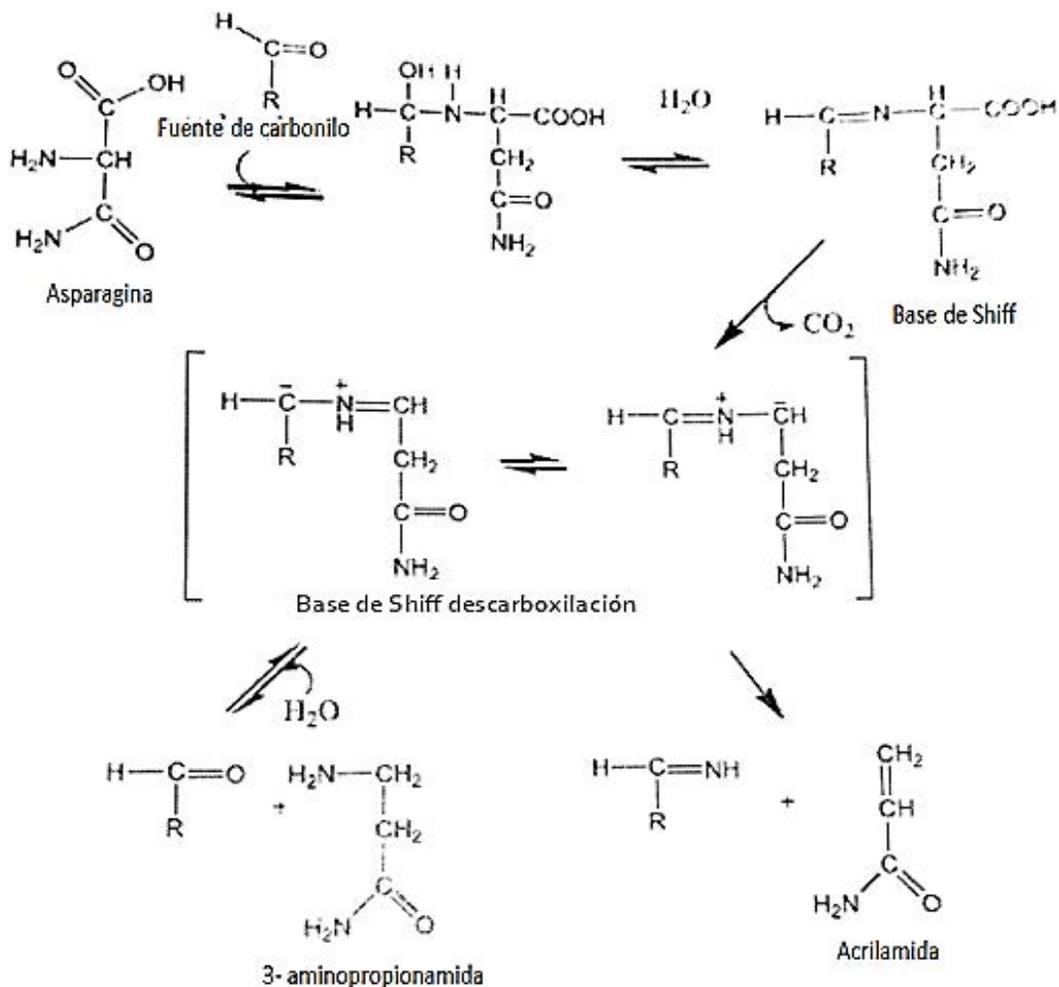


Figura I.2. Mecanismos de formación de acrilamida en la reacción de Maillard. Tomado de Friedman y Levin (2008).

1.1.3.2 Vías alternativas de formación

La acroleína (2-propenal) es un aldehído α,β -insaturado que se forma cuando un triglicérido sufre hidrólisis, de forma que con la incorporación de moléculas de agua y en presencia de temperatura elevada da como producto resultante el glicerol (Figura I.3). Éste sigue estando bajo condiciones de

temperatura elevada, por lo que acaba perdiendo dos moléculas de agua, lo que supone la formación de la acroleína. Estos dos últimos pasos pueden considerarse también previos (Stadler, 2006). Llegados a este punto pueden pasar dos situaciones: por un lado, debido a una oxidación de la acroleína por las altas temperaturas, se obtendrá ácido acrílico, el cual tendrá suficiente reactividad como para interactuar con moléculas de amoníaco procedentes de aminoácidos y formar finalmente la acrilamida. Asimismo, se daría una segunda reacción en que la acroleína pasa a formar un radical de acroleína debido a la temperatura elevada; la reacción final de esta vía consiste en la interacción del radical de acroleína con un radical amino, procedente de aminoácidos, formando finalmente la acrilamida (Claeys *et al.*, 2005).

Por otro lado, el ácido acrílico también puede formarse por descomposición térmica a partir del ácido aspártico, la carnosina o la β -alanina, o bien, generarse indirectamente por la serina y la cisteína a través del ácido pirúvico. En este punto la reacción sigue el mismo sentido que antes: el ácido acrílico reacciona con el amoníaco. La formación de acrilamida estará determinada por la disponibilidad de las moléculas de amoníaco, de forma que si el número de moléculas que hay no es suficiente o si éstas no tienen una estructura adecuada para llevar a cabo la reacción, la cantidad de acrilamida formada finalmente será menor (Xu *et al.*, 2014).

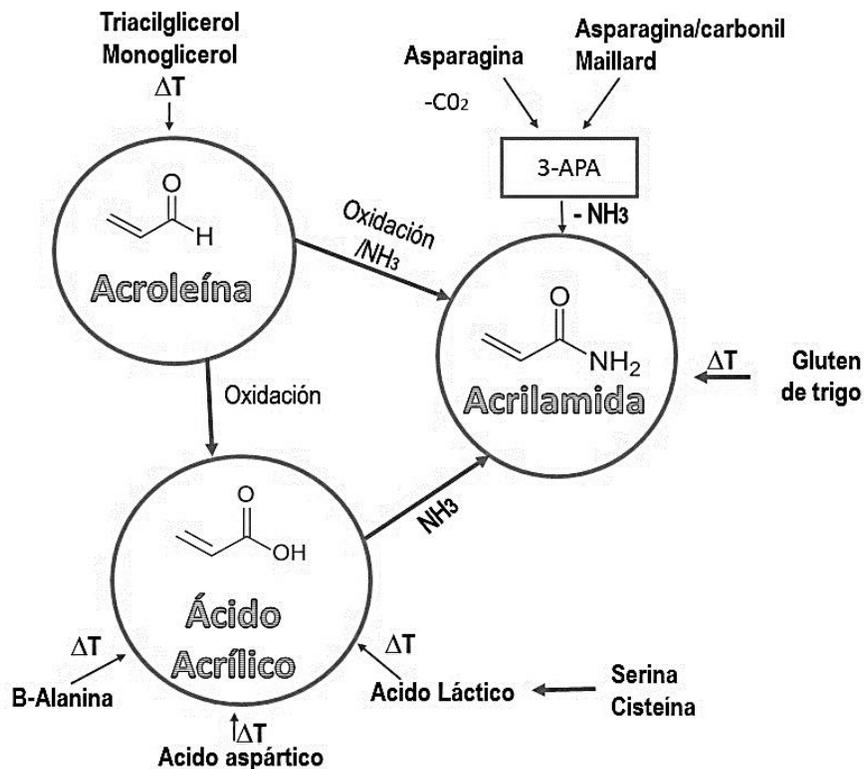


Figura I.3. Formación de acrilamida a partir de la acroleína. Tomado de Calderón (2015).

Como vía alternativa de formación puede mencionarse también la molécula precursora 3-aminopropanamida, que a pesar de ser presente a la reacción de Maillard, también puede formarse por descarboxilación enzimática de la asparagina. Es un precursor que se encuentra en poca cantidad, pero que tiene mucha eficacia para formar acrilamida, aunque sea sin presencia de compuestos carbonílicos (EFSA, 2013).

Según diferentes estudios (Arribas, 2013; Zhang *et al.*, 2005), se ha demostrado que los lípidos oxidados compiten muy eficientemente con los hidratos de carbono por las reacciones entre amina y grupos carbonilo. De este modo se producen los mismos compuestos tanto a partir de carbohidratos como a partir de lípidos oxidados, mediante reacciones muy similares. Un ejemplo de estos lípidos es el 2,4-decadienal, que presenta un grado de reactividad muy grande para convertir la asparagina en acrilamida. Por lo tanto, se piensa que el mecanismo de

esta reacción tiene lugar mediante dos etapas principales, primero una descarboxilación de la asparagina y posteriormente una desaminación de la 3-aminopropionamida, dando como producto final la acrilamida.

1.2 Factores que influyen en la formación de acrilamida en los alimentos

Los niveles de concentración de acrilamida en los alimentos dependen de diferentes factores, entre ellos, temperatura, composición química, contenido de agua, pH y grosor del producto.

1.2.1 Temperatura

Según diferentes autores, la temperatura y el tiempo de tratamiento que reciben los alimentos son factores relevantes en la formación de acrilamida. En cuanto a la temperatura, se ha comprobado que la forma de transferir el calor al alimento (freír, asar u hornear) no está relacionada con una mayor o menor formación de la sustancia (Stadler, 2006). Sin embargo, sí se ha observado que a temperaturas de entre 120 y 185 °C la formación de acrilamida aumenta.

Hay que destacar que algunos estudios demuestran que a temperaturas superiores a las citadas, la acrilamida formada sufre un proceso de degradación, lo que disminuye la concentración final (Friesling *et al.*, 2013). Este es el caso de productos como el café, que durante su producción se somete a tostado u otros métodos similares y llega a temperaturas muy elevadas, hasta 300 °C, de manera que la acrilamida que se crea en los primeros instantes del proceso se degrada al llegar a esas temperaturas (Stadler, 2006; Taeymans *et al.*, 2004).

El tiempo de tratamiento también es importante: los procesos de mayor duración permiten mayor formación de acrilamida (Figura I.4). Los estudios muestran que la concentración de acrilamida formada presenta una cierta linealidad con el tiempo de tratamiento, a diferencia de con la temperatura (Gökmen *et al.*, 2006; Surdyk *et al.*, 2004; Tardiff *et al.*, 2010).

Otras investigaciones van más allá y muestran que la formación de acrilamida se produce mayormente en la parte superficial de los productos, sobre todo en patatas o cereales, ya que las temperaturas de tratamiento son mucho más elevadas en la superficie que en el interior. Algunos autores sugieren que podría haber una relación entre la intensidad del color de los alimentos (por ejemplo, en una tostada de pan) y la cantidad de acrilamida formada (Gertz *et al.*, 2002; Surdyk *et al.*, 2004; Yasuhara *et al.*, 2003).

1.2.2 Composición química de los alimentos

Los compuestos precursores de la acrilamida son aquellas moléculas presentes en el alimento que por altas temperaturas u otras vías pueden formar este compuesto. Como se ha comentado anteriormente, son sobre todo los azúcares reductores y aminoácidos, principalmente la asparagina. Las concentraciones de estas moléculas en el alimento están determinadas por muchos factores, desde el sistema de cultivo utilizado, el método de recolección, las condiciones de almacenamiento (que influye mucho en productos como la patata), hasta aspectos más intrínsecos, como la genética de la especie que se cultiva (Jackson, 2009).

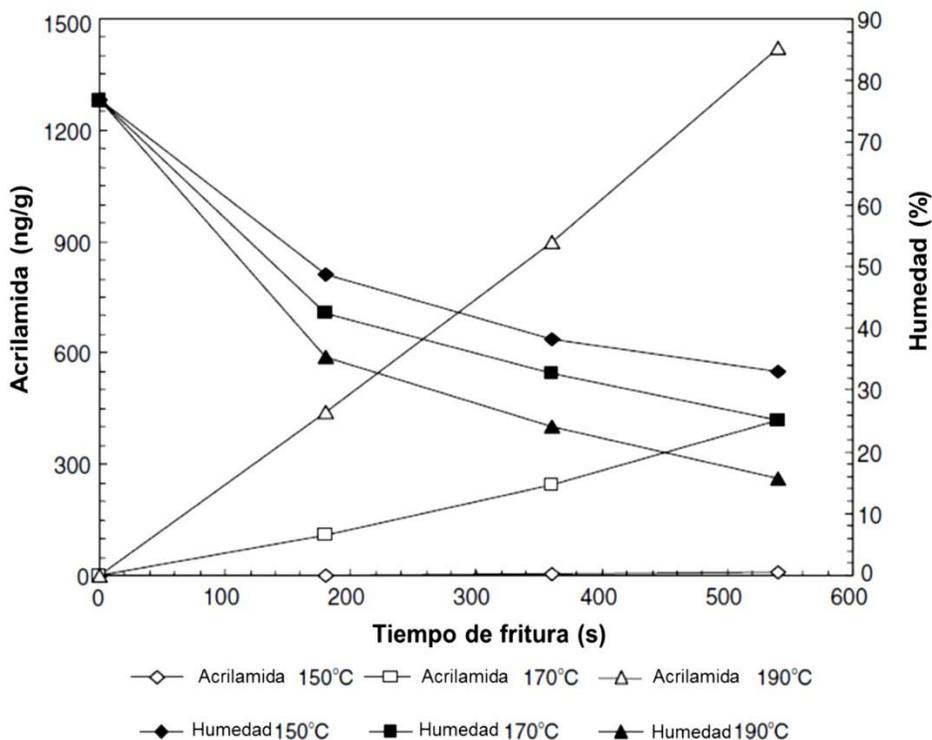


Figura I.4. Formación de acrilamida en patatas fritas en función de la humedad del alimento, temperatura y tiempo de procesado. Tomado de Gökmen *et al.* (2006).

Aparte de estas moléculas precursoras principales, destacan otras como bases de Schiff, 3-aminopropionamida, glicoxal, octanal y 2-octanona, 2-desoxiglucosa o glicerol, que reaccionan con la asparagina para formar acrilamida (Bråthen *et al.*, 2005; Gökmen *et al.*, 2006; Low *et al.*, 2006; Matthäus *et al.*, 2004; Pedreschi *et al.*, 2005; Serpen & Gökmen, 2007; Stadler *et al.*, 2004; Zyzak *et al.* 2003).

1.2.3 Contenido de agua

Se ha observado que la cantidad de acrilamida formada es significativamente más grande cuando la humedad del producto se reduce en procesos o tratamientos prolongados (Gökmen, 2005). Por lo tanto, cuánto más tiempo está el alimento a cierta temperatura (unos 120 °C), la acrilamida se crea en mayor medida, lo que vuelve a demostrar la linealidad entre formación de

acrilamida y tiempo de exposición, pero esta vez refiriéndose a la humedad del producto (Figura I.4).

1.2.4 pH en los alimentos

El grado de protonación de un aminoácido a cualquier pH se determina por el valor de pK_a de este grupo, en el que la mayor parte de los valores de pK_a para aminoácidos naturales oscilan entre 9,3 y 9,8 (a 25 °C). A pH de 8, el grupo α -amino de la asparagina, exhibe un valor de pK_a excepcionalmente bajo (8,9 a 25 °C), y se protona en un grado más bajo. Por esta razón, a este pH la asparagina es más propensa a reaccionar con electrófilos, por ejemplo, grupos aldehído de hidratos de carbono, lo que resulta en la formación de la base de Schiff, el primer paso en la formación de acrilamida.

El pH neutro es óptimo para la formación de acrilamida en los alimentos. Sin embargo, la reducción del pH con ácidos orgánicos como el ácido cítrico ha permitido la disminución de la formación de la acrilamida, debido a que la reducción del pH provoca la conversión de los grupos α -amino libres de la asparagina en grupos amino protonados, impidiendo participar posteriormente en reacciones de adición nucleofílica con compuestos carbonílicos. Se ha demostrado que el ácido cítrico es el modificador más eficiente en la reducción de acrilamida en sistemas modelo de patatas (78%, pH 3,7), seguido por el láctico (62%, pH 4,2) y el acético (46%, pH 4,5) comparado con el control (pH 5,4) (Arribas, 2013; Jung *et al.*, 2003).

1.2.5 Forma o tamaño del alimento

La formación de acrilamida también se desarrolla de acuerdo a la forma del alimento, así como la relación que existe entre el tamaño del producto y la superficie. Asimismo, el color se ve afectado por las condiciones de procesado, tiempo, temperatura y tipo de aceite, así como por las características del producto,

como el tamaño, la variedad, o las condiciones de almacenamiento (Fellows, 1998; Krokida *et al.*, 2001; Sahin, 2000).

1.3 Niveles de acrilamida en alimentos

En general, la acrilamida suele presentarse en alimentos que incluyen los productos hechos con patata, como las patatas fritas o de bolsa y los productos a base de cereales o de panadería como las galletas, pasteles y pan, entre otros, además del café.

Desde el descubrimiento de la acrilamida en los alimentos, gran parte de la comunidad científica ha intentado recoger el máximo número de datos para documentar y tener un cierto control sobre la presencia de este contaminante. En 2002, los estudios suecos revelaron niveles relativamente altos en diferentes productos, por ejemplo, las patatas u otros a base de cereales sujetos a procesos de fritura, cocción u horneado. Después, la FAO/OMS convocó a una consulta para examinar los datos disponibles (Tabla 1.1) y se continuó trabajando en un seguimiento desde el 2002 hasta el 2004 sobre la presencia de acrilamida en grupos como los cereales, el café, el pan, las patatas y otros que estaban bajo sospecha, incluyendo ciertas verduras. Los resultados fueron presentados en el 2005 por el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA); el informe se puede encontrar de manera resumida en http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/43258/1/WHO_TRS_930_eng.pdf.

Por otro lado, en los años posteriores (2007-2012) la EFSA también realizó un nuevo seguimiento para determinar la presencia de acrilamida en los alimentos, centrándose más en los grupos que podían presentar mayor cantidad de este contaminante. Durante el estudio se recogieron y analizaron 8240 muestras (10% controles analíticos) procedentes de 24 países europeos y un total de 37552 muestras (4% controles analíticos) procedentes de 6 asociaciones europeas alimentarias (European Coffee Federation, European Breakfast Cereals

Association, European Snaks Association, Food Drink Europe, Finnish Food and Drink Industries Federation y German Plant Bakeries Association).

A partir de los resultados obtenidos, en 2011 se publicó un documento en la página web de la Comisión Europea (Recomendación 2010/307/UE) donde se establecían una serie de advertencias sobre los niveles indicativos de acrilamida en determinados alimentos. En 2013, la Comisión Europea dio a conocer una lista de valores recomendados de acrilamida en alimentos (Recomendación 2013/647/UE), en concreto en patatas fritas, pan de molde, cereales, galletas y barquillos, café tostado e instantáneo y alimentos infantiles (Tabla 1.2). Estos nuevos niveles sustituyen a los establecidos en 2011; por ejemplo, han disminuido hasta 50 µg/kg en alimentos infantiles y también en alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.

La FDA también se ha pronunciado y publicó un borrador de guía para que la industria controle los niveles de acrilamida en los alimentos (<http://www.fda.gov/downloads/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/ChemicalContaminantsMetalsNaturalToxinsPesticides/UCM374534.pdf>), guía que proporciona información para ayudar a productores, fabricantes y operadores del sector de la alimentación a reducir este contaminante en ciertos productos. Sin embargo, no establece valores máximos.

Con todo esto, las acciones de la Comisión Europea y FDA en EE. UU. pueden convertirse en una regulación que fije el control de los niveles de acrilamida en los alimentos a mediano plazo.

Tabla 1.1. Acrilamida en diferentes grupos de alimentos y productos alimenticios de Noruega, Suecia, Suiza, Reino Unido y los Estados Unidos de América.

Grupo de productos alimenticios	Niveles de Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Media	Mediana	Mínima/ Máxima	Número de muestras
Papa/papas fritas en rodajas	1312	1343	170-2287	38
Papas fritas en bastón	537	330	< 50-3500	39
Producto rebozados	36	36	< 30 - 42	2
Productos de panadería	112	< 50	< 50 - 450	19
Bizcochos, galletas, tostada, rodajas de pan	423	142	< 30 - 3200	58
Cereales para el desayuno	298	150	< 30 - 1346	29
Copos de maíz	218	167	34 - 416	7
Pan suave	50	30	< 30 - 162	41
Pescados y productos del mar, empanados, rebozado	35	35	30 - 39	4
Carnes de aves, empanados, rebozado	52	52	39 - 64	2
Bebidas de malta de instantáneas	50	50	< 50 - 70	3
Chocolate en polvo	75	75	< 50 - 100	2
Café en polvo	200	200	170 - 230	3
Cerveza	< 30	< 30	< 30	1

FAO/OMS (2002).

Tabla 1.2. Valores indicativos de acrilamida basados en los datos de control de la EFSA entre 2007 y 2012.

Alimento	Valor indicativo (µg/kg)
Patatas fritas listas para consumir	600
Patatas fritas a la inglesa (chips) fabricadas con patatas frescas y con masa de patatas, galletas saladas a base de patatas	1000
Pan de molde	80
a) Pan de molde a base de trigo	150
b) Otro pan de molde	
Cereales para el desayuno	
a) Productos de salvado y cereales integrales, grano inflado (sólo es pertinente si está así etiquetado)	400
b) Productos de trigo y centeno (*)	300
c) Productos de maíz, avena, espelta, cebada y arroz (*)	200
Galletas y barquillos	500
Galletas saladas, excepto las de patata	500
Pan crujiente, pan de especias	450
Pan de jengibre	1 000
Productos similares a otros de esta categoría	500
Café tostado	450
(Café soluble) instantáneo	900
Sustituto de café	
a) Sustituto de café a base de cereal	2000
b) otro sustituto de café	4000
Alimentos para bebés, excepto los alimentos elaborados a base de cereales	
a) que no contengan ciruelas pasas	50
b) que contengan ciruelas pasas	80
Galletas y bizcochos para lactantes y niños de corta edad	200
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños pequeños excluyendo galletas y bizcochos	50

(*) Cereales no integrales ni de salvado. La categoría se determina en función del cereal presente en mayor cantidad.

EFSA Journal 2015; 13(6):4104.

Hasta el momento la mayor parte de los alimentos estudiados son típicos de dietas europeas, estadounidense y japonesa, pero no de la mexicana, cuya base es el maíz (Millán, 2008).

1.4 Métodos empleados en el análisis de acrilamida en alimentos

Como resultado de los efectos tóxicos de la acrilamida, se ha despertado un gran interés mundial en desarrollar métodos analíticos para cuantificar su presencia en alimentos, los más reportados son la cromatografía de gases-masas (GC-MS), líquidos-masas (LC-MS) o líquidos masas-masas o masas tándem (LC-MS/MS), además de la cromatografía de líquidos de interacción hidrófila (HILIC) (García *et al.*, 2014), electroforesis capilar (CE) y métodos basados en la radiación ultravioleta (UV) (Bermudo *et al.*, 2006; El-Ziney *et al.*, 2009; Geng *et al.*, 2011; Shi *et al.*, 2009; Tezcan & Erim, 2008; Wang *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2012) y la fluorescencia (Schieberle *et al.*, 2005). En la Tabla 1.3 se resumen los métodos más recientes para cuantificar acrilamida en cereales.

Tabla 1.3. Resumen de métodos analíticos para determinar acrilamida en alimentos.

Referencia	Muestra Alimento	Extracción y limpieza	Columna	Detector, LD y LC
Cromatografía líquida				
Brandl <i>et al.</i> , 2002	Varios	Extracción acelerada de muestra usando CH ₃ Cl ₂ con 2% de etanol, 2 g de muestra +200 µL H ₂ O en 5 ciclos (10 minutos cada uno a 80°C, 100 bar)	Synergy Polar-RP	MS/MS; LD 10 ng/mL
Rosén & Hellenä, 2002	Puré de papas, harina de centeno, pan tostado, papas fritas	2-4 g de muestra + 40 mL H ₂ O, homogenización (2 min a 9500 × g), centrifugación (3600 rpm, 10 min), extra centrifugación para papas fritas, (10 min a 16,800 × g), precipitar por congelación, pretratamiento con SPE con 1 mL de acetonitrilo y lavar con H ₂ O, filtrar con acrodiscos de 0,22 µm	Hypercarb	MS/MS; LD = < 10 µg/kg; LC = 30 µg/kg
Ono <i>et al.</i> , 2003	Varios	50 g de muestra + 300 mL H ₂ O, homogenización, centrifugación (20 min a 46000 × g), congelar y derretir el sobrenadante, centrifugar (10 min a 21 700 × g) fraccionar de 0,5 a 2 mL de sobrenadante en cartucho de SPE, colectar la fracción y centrifugar (10 min a 27000 × g) filtración de sobrenadante a través de discos de filtración de 0,22 µm, centrifugar el filtrado con exclusión molecular de 3 kDa (50 min a 1400 × g)	Atlantis C ₁₈	MS/MS; LD = 0,2 ng/mL LC = 0,8 ng/ mL
Roach <i>et al.</i> , 2003	Cereal, pan, papas fritas, café	1 g MTA + 9 mL H ₂ O, mezclar 20 min centrifugación 15 min 9000 rpm, centrifugación de 5 mL de la alícuota en un tubo de filtración para centrifuga (2 a 4 min a 9000 rpm) precondicionar SPE, 3,5 mL MeOH y después 3,5 mL H ₂ O	Synergy Hydro- RP	ESI/MS/MS; LD = 10 µg/kg

Tabla 1.3. (Continuación)

Becalski <i>et al.</i> , 2003	Papas fritas, cereal tostado, pan y café	16 g de mta + 80 mL de H ₂ O + 10 mL CH ₃ Cl ₂ , mezclar (15 min) centrifugar (2 h a 24000 × g), centrifugar en filtro de 5 kDa, 10 mL de sobrenadante (4 h a 4000 × g), pasar 5 mL del filtrado a través de cartucho Oasis MCX en tándem. Cargar el eluido en un cartucho ENVI-Carb precondicionado	Hypercarb	MS/MS, LD= 6,0 µg/kg
Riediker & Stadler, 2003	Cereal y galletas	Extracción con agua, homogenizar, usando una herramienta de dispersión, mezclar con acetonitrilo centrifugar, evaporar acetonitrilo y resuspender con H ₂ O, precondicionamiento de cartuchos SPE ISOLUTE Multimode y Accubond II SCX con MeOH y H ₂ O, cargar y colectar 2 mL del extracto, cargar y colectar 1 mL del extracto en el segundo cartucho, colectar eluido. Filtrar con acrodiscos	Shodex RS pak, columna de gel de polimetacrilato	ESI-MS/MS; LD=20-15 µg/kg; LC=70-45 µg/kg
Mestdagh <i>et al.</i> , 2004	Papas a la francesa	1 g de mta + 10 mL hexano agitar 10 min y centrifugar (10 min a 4000 rpm), retirar hexano adicionar 10 mL de H ₂ O, centrifugar 20 min a 4000 rpm, ultrafiltración a través de filtro de membrana de 0,45 µm, precondicionar cartuchos Oasis HLB y Varian Bond Elute Accurate con 5 mL de MeOH y 5 mL de H ₂ O y cargar muestra	Altantis dC 18	MS/MS
Andrzejewski <i>et al.</i> , 2004	Varios	Extracción con H ₂ O, en tubos para centrifuga y agitar con vortex (30 s). Transferir alícuota a tubos de filtración de 0,45 µm y centrifugar. Acondicionar cartucho (Oasis HLB con 3,5 mL de MeOH y H ₂ O) cargar 1,5 mL de extracto, eluir con 1,5 mL de H ₂ O transferir al segundo cartucho (AcBond Elut/Accucat acondicionado con 2,5 mL de MeOH), eluir con 1 mL de MeOH	Synergy Hydro-RP	MS/MS; LD = 10 µg/kg

Tabla 1.3. (Continuación)

Gökmen <i>et al.</i> , 2005	Papas fritas.	2 g de mta + 10 mL de MeOH, mezclar por centrifugación (10 min a 1180 × g), clarificar el sobrenadante con Carrez I y II y centrifugar, secar 2 mL de sobrenadante con nitrógeno, resuspender en 1 mL de H ₂ O, preacondicionar el cartucho Oasis HLB con 1 mL de MeOH y 1 mL de H ₂ O, llenar con el extracto (1 mL) y coleccionar, filtrar a través de acrodisco de 0,45 µm.	Atlantis dc 18, Atlantis HILIC, ZORBAX SIL, Zorbax StableBond, Hichrom 5 C18, Luna C18, Synergi Max RP.	DAD; LD = 2,0 µg/ mL; LC = 4,0 µg/kg
Zhang <i>et al.</i> , 2007	Varios.	1,5 g de muestra, adicionar 20 mL de éter de petróleo, reposar 10 min, mezclar 10 min, retirar el éter de petróleo y repetir la extracción de grasa, adicionar 7 mL de NaCl (2 M) y agitar por 20 min, centrifugar 15 min a 1500 rpm, extraer el residuo con 8 mL de NaCl, extraer la solución de NaCl.	Atlantis dc 18	ESI-MS/MS; LD = 1 µg/kg; LC = 4-5 µg/kg
Kim <i>et al.</i> , 2007	Arroz, pan, frituras de maíz, papas fritas, dulces y café.	10 g de muestra + 98 mL de H ₂ O, agitar 20 min, centrifugar (10 min a 9000 rpm) acondicionar cartucho de SPE C ₁₈ (5 mL de MeOH y 5 mL de H ₂ O) cargar y coleccionar, filtrar a través de filtro de membrana de 0,45 µm.	Aqua C18	MS/MS; LC = 2 µg/kg
Genga <i>et al.</i> , 2008	Frituras de papas, comida china frita, comida horneada.	2 g de muestra + 10 mL de MeOH 75%, tratar con Carrez I y II, agitar (45 min a 100 rpm), centrifugar (10 min a 100 rpm), evaporar 5 mL de sobrenadante a 1 mL con nitrógeno. Preacondicionar cartucho Oasis HLB (5 mL de MeOH y 5 mL de H ₂ O), cargar y eluir con 2 mL de MeOH 10% filtrar con acrodisco de jeringa de 0,45 µm.	HC-75 H+	DAD; LD = 30 µg/kg

Tabla 1.3. (Continuación)

Liu <i>et al.</i> , 2008	Té.	1 g de muestra + 9 mL de H ₂ O, agitar 20 min adicionar 10 mL de acetonitrilo + 4 g de sulfato anhídrido de magnesio + 0,5 g de NaCl, mezclar 1 min, centrifugar (5 min a 5000 rpm). Separar la capa de acetonitrilo y secar con nitrógeno, disolver el residuo en 0,5 mL de H ₂ O, filtrar a través de acrodisco de 0,45 µm. Preacondicionar cartucho Oasis MCX (2 mL de MeOH y 2 mL de H ₂ O) cargar y colectar. Filtrar a través de acrodisco de 0,22 µm. ODS C18.	ODS C18	MS/MS; LD = 1 ng/mL; LC = 5 mg/mL
Granados, 2007	Tortillas tostadas.	4 g de muestra + 40 mL de MeOH, agitar 2 min en vortex y 20 min en agitador rotatorio, centrifugar (15 min 4600 rpm). Filtrar en filtros 0,45 µm (5 min a 4600 rpm). Evaporar MeOH del filtrado, resuspender en 8 mL de H ₂ O, cargar muestra en cartucho WCX y eluir con MeOH, pasar eluido a ENV+, eluir con MeOH, descartar 9,5 mL y colectar 2 mL, evaporar y reconstituir en 0,1 mL de H ₂ O, filtrar en acrodiscos 0,45µm e inyectar en HPLC Tándem ISRP GFF II e Intersil PH.	Tándem ISRP GFF II e Intersil PH	UV 210 nm. LD=0,017 µg/g LC= 0,058 µg/g
Cromatografía de gases				
Tareke <i>et al.</i> , 2000	Comida frita.	10 g de muestra + 10 mL de H ₂ O, filtración de extracto a través del filtro de fibra de vidrio, purificación en columna de carbograph, formar derivado bromado.	HP PAS 1701	MS; LD = 5 µg/kg
Tareke <i>et al.</i> , 2002	Alimentos ricos en proteínas y carbohidratos.	10 g de muestra + 10 mL de H ₂ O, filtrar el extracto a través de filtro de fibra de vidrio, purificación en columna de carbograph, formar derivado bromado.	BPX-10	MS; LD = 5 µg/kg

Tabla 1.3. (Continuación)

Ono <i>et al.</i> , 2003	Varios.	50 g de mta + 300 a 400 mL de H ₂ O, homogenizar, centrifugar (20 min a 48000 × g) congelar y derretir el sobrenadante, centrifugar 10 min a 21700 × g, fraccionar 0,5 a 2 mL de sobrenadante en cartucho de SPE, colectar la fracción y centrifugar (10 min a 21700 x g), filtrar el sobrenadante a través de acrodisco de 0,22 μm, centrifugar el filtrado con exclusión de 3 kDa (50 min a 14000 × g).	CP-Sil 24 CB	MS; LD = 0,2 ng/ mL
Hamlet <i>et al.</i> , 2004	Pan.	5 g de mta + H ₂ O desionizada, agitar 1 min, adicionar 0,3 mL de ácido acético glacial, tratar con Carrez I y II, centrifugar por 20 min a 1942 × g.	Rtx-50	MS/MS; LD = 0,01 ng/10 mL
Pittet <i>et al.</i> , 2004	Cereales.	15 g de muestra, en un recipiente para centrifuga de 250 mL, suspender en 150 mL de H ₂ O homogenizar por 30 s, acidificar la suspensión a un pH de 4 y 5 adicionado ácido acético glacial (aprox. 1 mL), tratar sucesivamente con Carrez I y II (2 mL de cada uno), centrifugar a 16000 × g por 15 min, bromar transferir el extracto a una columna cromatográfica de vidrio que contenga sulfato calcinado de sodio y Florisil activado (5 g de cada uno), usando pequeñas alícuotas diluidas en hexano (50 mL) evaporar aproximadamente 2 mL y después secar con nitrógeno, redisolver en acetato de etilo (400 μL), adicionar trietilamina (40 μL), filtrar a través de microfiltros de 0,2 μm	ZB -WAX	MS; LD= 2 μg/kg
Dunovska <i>et al.</i> , 2006	Papas, tostadas, cereales de desayuno, pan tostado.	3 g de muestra + 4,5 mL de H ₂ O desionizada, sonicar 30 min, adicionar 24 mL de propanol, centrifugar 5 min a 11000 × g, adicionar 5 gotas de aceite de oliva, secar. Disolver el residuo en 2 mL de acetonitrilo, extraer grasas con 10 y 5 mL de hexano, mezclar 1 mL de acetonitrilo con 50 mg de absorbente PSA, centrifugar por 1 min a 11000 rpm.	INNOWax	HRTOF MS, LC = 15 a 40 μg/kg

Tabla 1.3. (Continuación)

Serpen & Gokmen, 2007	Papas fritas.	2 g de muestra + 20 mL de MeOH, clarificar con Carrez, centrifugar 10 min a 10000 rpm, usando tubos de filtros para centrifuga de 0,45 µm.	HP INNOWax	MS; LD = 15 ng/g; LC = 50 ng/g.
Zhang <i>et al.</i> , 2007	Varios.	1.5 g de muestra adicionar 20 mL de éter de petróleo, agitar 10 min, remover el éter de petróleo y repetir la extracción de grasas, adicionar 7 mL de NaCl (2 M), agitar 20 min, centrifugar 15 min a 15000 rpm, extraer el residuo con 8 mL de NaCl.	HP INNOWax	MECD; LD = 10 µg/kg
Lee <i>et al.</i> , 2007	Papas a la francesa.	10 g de muestra + 100 mL de H ₂ O, centrifugar 10 min a 5000 rpm, diluir alícuota de 1,5 mL a 15 mL con agua, mezclar con 15 mL de buffer a pH 7, extraer con fibra de SPME.	DB-WAX Silica	PCI-MS/MS; LD = 0,1 µg/L

Keramat *et al.* (2011).

1.4.1 Método de cromatografía de gases (GC)

La cromatografía de gases es un método físico de separación que se compone de fase móvil, puerto de inyección, horno de la columna, columnas, fase estacionaria, detector y sistema de registro de datos (Olguín *et al.*, 2004). Este método describe cómo se distribuye el analito entre una fase móvil gaseosa y una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido, y la separación del analito se produce en función de cómo las sustancias químicas se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria (Duque *et al.*, 2015).

En cromatografía de gases la muestra se inyecta en la fase móvil, la cual es un gas inerte. En esta etapa los distintos componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra fijada en una columna dentro de un horno con programación de temperatura, siendo actualmente, las columnas capilares las más empleadas.

La velocidad de migración de cada componente (tiempo de retención en la columna) ocurre en función de su distribución entre la fase móvil y la fase estacionaria (Sogorb & Vilanova, 2004). Cada soluto presente en la muestra tiene una diferente afinidad hacia la fase estacionaria, lo que permite su separación: los componentes fuertemente retenidos por esta fase se moverán lentamente en la fase móvil, mientras que los débilmente retenidos lo harán rápidamente. Un factor clave en este equilibrio es la presión de vapor de los compuestos (en general, a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Como consecuencia de esta diferencia de movilidad, los diversos componentes de la muestra se separan en bandas que pueden analizarse tanto cualitativa como cuantitativamente mediante el empleo de los detectores seleccionados (Olguín *et al.*, 2004). El análisis de acrilamida puede llevarse a cabo de forma directa sin derivatización de la molécula o mediante bromación (Zhang *et al.*, 2005).

1.4.1.1 Método de cromatografía de gases-masas (GC-MS)

La asociación de la cromatografía de gases (GC) y la espectrometría de masas (MS) es una técnica para separar, identificar y cuantificar los

componentes volátiles y semivolátiles. Permite también la separación e identificación de mezclas complejas (Garrido *et al.*, 2008).

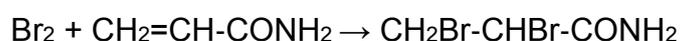
Cuando una mezcla de compuestos es inyectada en el cromatógrafo de gases se separa en la columna cromatográfica, obteniendo la elución sucesiva de los componentes individuales aislados que pasan inmediatamente al espectrómetro de masas. Cada uno de estos componentes se registra en forma de pico cromatográfico y se identifica mediante su respectivo espectro de masas.

1.4.1.2 Cromatografía de GC-MS y análisis directo de acrilamida

Algunos autores proponen el análisis directo de acrilamida por GC-MS (Amrein *et al.*, 2005; Ellenberg *et al.*, 2004, Hoenicke *et al.*, 2004; Jezussek & Schieberle, 2003; Swiss Federal Office of Public Health, 2002). Debido a la alta polaridad de las columnas de acrilamida, se utilizan con fases polares, como polietilenglicol. En el análisis de GC su mayor problema sin derivatización es la falta de picos característicos no derivatizados en el espectro de masas de la acrilamida. Los fragmentos principales son iones de m/z 55 y 72, utilizados también para la cuantificación. Las sustancias con tiempos de retención cerca de acrilamida, por ejemplo, el maltol o ácido heptanoico, también producen sustancialmente los mismos iones, por lo tanto, pueden interferir con la cuantificación (Biedermann *et al.*, 2002; Shalini *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2008).

1.4.1.3 Cromatografía de GC-MS y análisis de acrilamida por derivatización con bromación

Los métodos mediante derivatización se remontan a la década de 1990 (Castle, 1993) y se componen de una extracción acuosa a partir de la matriz seguida de la derivatización de la acrilamida en 2,3-dibromopropionamida:



La derivatización se logra con una solución acuosa de bromo elemental o mediante el uso de KBrO_3 y KBr que son más seguros. Posteriormente, el derivado se extrae con acetato de etilo el cual puede ser inyectado directamente mediante GC-MS o bien ser purificado o preconcentrado para conseguir límites de detección más bajos. Aunque la derivatización es larga y tediosa, esta metodología demuestra ventajas de selectividad y sensibilidad, eliminación de los interferentes coextractivos y aumento en la volatilidad. Algunos investigadores optan por convertir el dibromo derivado a 2-bromopropenamida con tratamiento con trietilamina. Este paso adicional evita el riesgo de una deshidrobromación en el inyector o en la fuente de iones del MS sin disminuir la selectividad o la sensibilidad del método (Shalini *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009).

En cuanto a la separación, se realiza en columnas capilares de polaridad media-alta. El empleo de GC-MS/MS o con acoplamiento a un espectrómetro de masas de alta resolución puede disminuir la interferencia y obtener buen límite de detección en ciertos alimentos (Cheng *et al.*, 2006; Hoenicke *et al.*, 2004).

1.4.1.4 Cromatografía de GC-MS y análisis de acrilamida por derivatización con N, O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BTMSA)

Además de la bromación, se han propuesto otros métodos de derivatización de acrilamida. Lagalante & Felter (2004) propusieron un método para el análisis cuantitativo de fase sólida basado en microextracción (SPME) de la acrilamida y se analiza mediante GC-MS. En este método, la acrilamida se silila con N,O-Bis (trimetilsilil) Trifluoroacetamida (BSTFA) para dar el compuesto volátil N,O-Bis (trimetilsilil) acrilamida (BTMSA). Una vez formado, el BTMSA es fácil de extraer con una fibra de SPME de 100 μm de poli (dimetilsiloxano). El método se ha aplicado a muestras de cereales, pero de acuerdo con diferentes autores (Hoenicke *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2007 y Wenzl *et al.*, 2003) es necesario realizar mejoras adicionales para permitir su aplicación a otras matrices.

1.4.1.5 Método de cromatografía de gas con impacto de electrones (GC-IE)

Este método de ionización, el reactivo que crea los productos iónicos es un haz de electrones enérgicos calentados en un filamento incandescente que viajan a través de la cámara de iones hasta un ánodo en el lado opuesto (trampa de iones). El flujo de moléculas vaporizadas de la muestra que entra a la fuente, a una presión de aproximadamente 10^{-3} Pa (10^{-5} torr), interactúa con el flujo de iones para formar una variedad de productos, incluyendo los iones positivos. Con la IE se pueden introducir muestras de moléculas largas usando la técnica de haz de partículas (Mc Lafferty, 1994).

En el método de cromatografía de gases-masas con impacto de electrones (GC-MS-IE), se pueden presentar errores durante el proceso de extracción que se consideran un riesgo cuando se utiliza un disolvente (metanol o propanol) después de la evaporación de la grasa, lo que causa una extracción incompleta a través de la precipitación de sólidos. Para la cuantificación de la acrilamida se recomienda utilizar como estándares internos D₃-acrilamida y metacrilamida (Biedermann, 2003).

1.4.2 Método de cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas-masas (LC-MS/MS)

El análisis de la acrilamida requiere un método confiable que permita cuantificar muy pequeñas cantidades de este compuesto, y se ha recomendado el método de cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas-masas o masas tándem (LC-MS/MS), desarrollado a principios de 2002 por Rosen & Hellenas, para verificar los resultados iniciales obtenidos de la bromación de acrilamida por el método GC-MS.

La técnica LC-MS/MS tiene alta selectividad en cuanto al sistema de detección; la mayoría de los trabajos publicados emplean la espectrometría de masas con un analizador de triple cuadrupolo con ionización positiva por electrospray (Electrospray ionization, ESI) en el modo Monitorización de Reacción Múltiple o MRM (Wenzl *et al.*, 2003 y 2007; Zhang, *et al.*, 2005).

Los iones monitorizados para el análisis de acrilamida por LC-MS/MS son $(\text{CH}_2 = \text{CHC} = \text{O})^+ = 55$ y $(\text{CH}_2 = \text{CHC} = \text{NH})^+ = 54$, $(\text{CH}_2 \text{CHCONH}_2) = 72$ m/z.

La transición $72 > 55$ siempre se selecciona para cuantificar, ya que tiene alta abundancia relativa (Ahn *et al.*, 2002; Hoenicke *et al.*, 2004; Murkovic, 2004; Rosen & Hellenas, 2002). En algunos casos se han utilizado otras transiciones como $72 > 54$, $72 > 44$ y $72 > 27$ para confirmar la presencia de acrilamida (Becalski *et al.*, 2003; Delatour *et al.*, 2004; Granby & Fagt, 2004; Konings *et al.*, 2003; Leung *et al.*, 2003; Nielsen *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005). Para la detección de isótopos de acrilamida se usa como patrón interno la transición de $75 > 58$ en el caso de ($^2\text{H}_3$) acrilamida y ($^{13}\text{C}^3$) acrilamida (Kim *et al.*, 2007; Ono *et al.*, 2003) y $73 > 56$ de ($^{13}\text{C}_1$) acrilamida (Petersson *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005) y una relación de iones de transición de 55/58 de iones para cuantificar la acrilamida (Cheng *et al.*, 2009).

A pesar de la alta selectividad proporcionada por el modo MS-MS, que permite una buena separación de los analitos, inevitablemente pueden producirse interferencias, en especial cuando la matriz es muy compleja (Becalski *et al.*, 2003); así, se pueden observar picos con tiempos de retención idénticos a la acrilamida y la acrilamida deuterada. Para evitar estos solapamientos, se recomienda volver a extraer el extracto acuoso de acrilamida obtenido de la muestra con un disolvente orgánico de carácter polar, por ejemplo, acetato de etilo. De este modo se pueden extraer componentes de interferencia como sales, azúcares, almidones o aminoácidos, que permanecen en la fase acuosa. El extracto obtenido se puede analizar por LC-MS/MS (Becalski *et al.*, 2003; Claus *et al.*, 2005; Hoenicke *et al.*, 2004; Jiao *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2005). También hay compuestos de interferencia en la transición $72 > 55$, y para separar estas interferencias, se debe utilizar una columna de intercambio iónico (Cavalli *et al.*, 2004).

No obstante, debido al alto costo de este sistema ha sido necesario desarrollar métodos basados en un único cuadrupolo en modo SIM, con los que se han obtenido buenos límites de detección para la mayoría de las matrices alimentarias. Hay que tener en cuenta que, debido al bajo peso molecular de la acrilamida y sus fragmentos iónicos, la confirmación se logra

monitorizando más de una transición característica. Sin embargo, ya que la acrilamida es una molécula muy polar con escasa retención en los rellenos convencionales de fase inversa, y a pesar del uso de un espectrómetro de masas en tándem operando mediante monitorización de reacciones seleccionadas, la identificación se basa en el tiempo de retención cromatográfica y en la presencia y abundancia relativa de los iones característicos (Arribas, 2013).

El desarrollo de este método tiene como objetivo incrementar la sensibilidad hasta 10 veces más que el método de GC, y además, se puede aplicar en una amplia variedad de muestras de alimentos, mejora el procedimiento de limpieza y evita el empleo de filtros que puedan contener acrilamida (Becalski *et al.*, 2005; Lagalante & Felter, 2004; Mottram *et al.*, 2002; Nemoto *et al.*, 2002; Tareke *et al.*, 2002).

La mayoría de los métodos publicados con las diferentes técnicas describen problemas y falta de certeza en la selectividad del analito en un alimento complejo para confirmar en la matriz la presencia de una molécula pequeña como la acrilamida (Paleologos & Kontominas, 2005; Pittet *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2005). Sin embargo, han logrado una buena selectividad, sensibilidad y límites de detección, al utilizar técnicas cromatográficas acopladas a masas-masas (Bermudo *et al.*, 2006; Khoshnam *et al.*, 2010; Ozer *et al.*, 2012).

A la fecha se puede concluir que, entre los estudios metodológicos de alto rendimiento en la detección de acrilamida, LC-MS/MS es el más utilizado y reconocido para la determinación de acrilamida, con la ventaja que la cromatografía líquida no se necesita derivación (Cheng *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2011; Küttinga *et al.*, 2009; Mastovska & Lehotay, 2006; Mikulikova & Sobotova, 2007; Pittet *et al.*, 2004; Wenzl *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2007).

1.5 Toxicidad de la acrilamida

Existen diversos factores involucrados en la exposición a la acrilamida, determinados por la dosis, duración, vía de contacto, edad, sexo, dieta, características personales, estilo de vida y condición de salud (Lema & Rojas, 2010). De acuerdo a las nuevas conclusiones acerca de la presencia de acrilamida en los alimentos, según dictamen del Comité Científico de Alimentos (2012), la exposición a esta sustancia se presenta cuando se absorbe a través de la piel, o bien, por inhalación, o ingestión.

Las propiedades físicas y químicas hacen de la acrilamida un agente tóxico capaz de reaccionar con varias biomoléculas (Stadler, 2016). Su bajo peso molecular y alta polaridad le facilita su distribución en tejidos, lo cual se ha demostrado en experimentos en los que se emplearon isótopos en animales (Claus *et al.*, 2008). Se ha constatado en diferentes estudios que dosis mayores a 203 mg/kg causan efectos adversos en el desarrollo y reproducción de roedores, por ejemplo, degeneración neural, deficiencia de enzimas intestinales, fertilidad reducida y espermias anormales (El-Ziney *et al.*, 2009).

La acrilamida está catalogada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (International Agency of Research on Cancer) dentro del grupo 2A como probable carcinógeno para el ser humano, además se sabe que tiene efectos neurotóxicos y genotóxicos (Küttinga *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2008). Una vez ingerida, la acrilamida se distribuye por todo el cuerpo vía el torrente sanguíneo, y así se puede encontrar en el timo, hígado, corazón, cerebro, riñones e inclusive en la leche materna. La conjugación de acrilamida a glutatión, así como su epoxidación a glicidamida en el hígado vía citocromo P450, representa la mayor ruta metabólica. Los estudios toxicocinéticos, revelan que la epoxidación a gliciamida es considerado un paso crítico para los efectos genotóxicos de la acrilamida y sus metabolitos. Acrilamida y gliciamida a una mayor proporción pueden reaccionar con macromoléculas como la hemoglobina y algunas enzimas; adicionalmente, la gliciamida puede reaccionar con el ADN, promoviendo mutaciones puntuales y, eventualmente, cáncer (Kocadagli & Gokmen, 2016).

Aunque los efectos nocivos sólo han sido demostrados en bioensayos *in vitro* e *in vivo* en modelos animales y dosis experimentales, la acrilamida permanece catalogada como potencialmente cancerígena para humanos hasta que otros estudios provean evidencia clara de lo opuesto. Por lo tanto, la exposición a acrilamida debe permanecer tan baja como sea razonablemente posible (Claus *et al.*, 2008).

1.6 Estimación de la ingesta de acrilamida en la dieta

La evaluación de la exposición dietética a contaminantes puede realizarse mediante métodos directos o indirectos, y la elección del procedimiento depende de los objetivos de la evaluación y de los recursos disponibles (Lineback *et al.*, 2012).

Un enfoque común para estimar la exposición de la población a la acrilamida es el método indirecto, ya que combina las concentraciones del contaminante en determinados alimentos con las cantidades consumidas por una población de interés en un tiempo definido. Los datos de consumo de los alimentos son obtenidos de las encuestas dietéticas; éstas están diseñadas principalmente para evaluar el estado nutricional de la población, como es el caso de la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición-Nuevo León 2011/2012 (EESN-NL 2011/2012).

En algunos países se han realizado estudios en donde determinaron los niveles de acrilamida en varios alimentos y se ha estimado su ingesta alimentaria en la población (Claeys *et al.*, 2016; Mills *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2013; Sirot *et al.*, 2012; Yunfeng *et al.*, 2016). En Europa, la FAO/OMS y el Comité de Aditivos Alimentarios (JECFA) evaluó en el 2011 los datos de la ingesta alimentaria de acrilamida de ocho países representativos. En este estudio se demostró que no hay cambios significativos en la exposición de alimentos para la población en general. Considerando el promedio de exposición dietética, que se estima en 1 µg/kg de peso corporal por día, se sugiere un valor de 0,2 mg/kg de peso corporal por día como referencia para el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) (JECFA, 2006). Con base en los últimos experimentos con animales de laboratorio, la JECFA propuso en

el 2011 dos diferentes valores de referencia (BMDL 10) para el riesgo cancerígeno de 0,31 mg/kg de peso corporal por día para la inducción de tumores mamarios en ratas, y de 0,18 µg/kg de peso corporal por día para tumores de la glándula de Harder en ratones (Gao *et al.*, 2016).

1.7 Maíz en México

México es uno de los países más importantes en la ingesta de maíz, siendo la base de la alimentación de su población, y de los múltiples productos obtenidos de este cereal, las tortillas son el principal (Contreras & Flores, 2014; Luna *et al.*, 2012).

El hombre prehispánico comenzó a guardar el grano de cada cosecha para su consumo posterior. Así, transformó el grano duro y seco en una masa con la que debió hacer las primeras tortillas. Hasta la actualidad sigue siendo el alimento más importante para la gran mayoría de la población en México. La tortilla acompaña, envuelve, revuelve y prensa otros alimentos y “es la única cuchara que se puede comer después de usarla” (Cruz & Verdalet, 2007; Daza, 2013).

Otros derivados del maíz son las tostadas, gordas, garnachas, memelas, martajadas, picadas, pellizcadas, tlayudas, enfrijoladas, enchiladas, chalupas, quesadillas, peneques, papadzules, totopos, sopos, molotes, esquites, chilmore, además de diversas botanas. El aumento en la preferencia entre el público y el crecimiento continuo colocan a las tortillas y otros productos de maíz en el mercado internacional (INEGI, 2014).

1.7.1 Definición de tortilla de maíz

La tortilla se define como un disco aplanado de masa de maíz nixtamalizado, cuyas dimensiones varían entre 10 a 12 cm de diámetro y de 1 a 2 mm de espesor. Se le cuece sobre una superficie caliente, generalmente metálica, denominada comal, en temperaturas por encima de 160 °C, por un

tiempo aproximado de 60 s. Pueden consumirse directamente o se empacan en bolsas de polietileno para su distribución y venta (Morales & Vélez, 2011).

Las tortillas siguen usándose como principio, medio y fin de las comidas; de su inagotable especie surgirán los llamados “antojitos”, para después llegar a lo que conocemos como totopos o *tortilla chips*, botanas a base de tortilla. A la masa se le da forma para convertirla primero en tortillas y posteriormente se le transforma en tostadas mediante varios procesos, lo que permite que se conserve fresco durante seis meses sin necesidad de conservadores (Retes, 2010).

1.7.2 Valor nutritivo y consumo de tortilla

Una pieza de tortilla aporta 1,4 g de proteínas, 0,5 g de lípidos, 13,6 g de carbohidratos, 0,6 g de fibra, 58,8 mg de calcio y presenta un índice glicémico de 52,0 mg, aportando un total de 64 kcal (Pérez, 2014).

De acuerdo al Instituto Nacional de Estadística, y Geografía (INEGI, 2010), se estima que el consumo diario de tortilla por persona en las zonas rurales mexicanas es de 217,9 g (considerando un peso aproximado de 27 g por tortilla resulta en 8 tortillas al día), mientras que en las zonas urbanas este indicador es de 155,4 g (6 tortillas al día). Su consumo es mayor en la población masculina que femenina, aumenta con la edad y está asociado con el ingreso económico: a menor ingreso, mayor ingesta de tortillas (Rodríguez *et al.*, 2008).

1.7.3 Subproductos de tortillas de maíz: tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas

Desde tiempos precolombinos, los aztecas realizaban el *totopochtli*, es decir, tostaban las tortillas en un comal caliente. Después se hizo una práctica común entre las amas de casa freír las tortillas sobrantes de la comida para mejorar su sabor; a las tortillas fritas se les dio el nombre de tostadas cuando mantenían su forma original y totopos si se moldeaban o seccionaban en partes (Medina & Juan, 2016; Vivek *et al.*, 2008).

1.7.3.1 Tostada

Se le conoce como tostada al producto elaborado a partir de tortilla o masa que puede ser mezclada con ingredientes opcionales, sometido a un proceso de horneado, fritura, deshidratado u otro, hasta obtener una consistencia rígida y crujiente (Norma Oficial Mexicana NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba).

1.7.3.2 Tostada de maíz frita

Las frituras producidas a partir de maíz tienen gran aceptación en el mercado mexicano debido a la gran diversidad de productos que se pueden desarrollar en relación a textura, forma, sabor y considerable vida de anaquel. La masa para la fritura de tortilla se moldea en tiras, triángulos o círculos antes de ser cocidas. Los alimentos fritos gozan de una popularidad cada vez mayor; su preparación es fácil, rápida, y su aspecto y sabor corresponden a los deseos del consumidor (Peña, 2006).

La fritura es el proceso fisicoquímico complejo en el cual el producto se somete a temperaturas altas con el propósito de modificar su superficie, impermeabilizándolo de alguna manera para controlar la pérdida de agua desde su interior. La fritura por inmersión en aceite es uno de los métodos de cocinado más usados a nivel mundial, el aceite desempeña un papel crítico en la transferencia de calor y medio de impregnación, y es el componente decisivo del proceso de fritura (Helen, 2004). Las temperaturas de fritura y los intervalos de tiempo van de 165 a 195 °C y de 50 a 90 s (Plasencia, 1998).

1.7.3.3 Tostada de maíz horneada

La cocción y horneado tienen la función de cocer la tortilla y secar parcialmente la masa, impartir una apariencia ligeramente tostada y desarrollar la textura final de la tortilla. La combinación de la humedad y el tamaño de partícula de la masa con la temperatura y tiempo de residencia en el horno deben optimizarse para productos específicos (Almeida, 1996).

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo es desarrollar y validar un método analítico para determinar la presencia de acrilamida en tostadas de tortilla de maíz horneadas y fritas que se consumen en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (México), con la finalidad de analizar las concentraciones y establecer la ingesta y el riesgo asociado al consumo. Para lograrlo se establecieron los siguientes objetivos específicos:

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Seleccionar un método analítico capaz de cuantificar los niveles de acrilamida encontrados en los productos a base de cereales

Al hacer una revisión bibliográfica no se encontró un método establecido en México para el análisis de acrilamida en tortillas de maíz. Por esta razón, se buscaron procedimientos analíticos basados en la cromatografía de gases y la cromatografía líquida que determinaran y cuantificaran los niveles de acrilamida hallados en los productos a base de cereales para poder después aplicarlo a nuestra matriz de estudio: tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas.

2.2.2 Adaptar y validar el método analítico de cuantificación de acrilamida seleccionado (LC-MS/MS) en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas

Se adaptó y validó un método de cuantificación de acrilamida por LC-MS/MS en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, ya que esta metodología permitió cuantificar concentraciones bajas de acrilamida en matrices complejas como son las tostadas de tortillas de maíz.

2.2.3 Cuantificar la presencia de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas comercializadas en el área metropolitana de Monterrey, Nuevo León (México) mediante el método de LC-MS/MS

Se realizó un muestreo de los productos de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas comercializados en supermercados y tiendas de conveniencia, y se determinó la concentración de acrilamida por LC-MS/MS.

2.2.4 Relacionar la presencia de acrilamida según tipo de tortillas de maíz y proceso de fabricación

Se cuantificó la acrilamida en diferentes tipos de tostadas de tortillas de maíz para poder identificar una posible relación de la formación de acrilamida con los parámetros utilizados de elaboración, y tamaño de las tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas.

2.2.5 Determinar la ingesta diaria de acrilamida por peso corporal en la población de Monterrey, Nuevo León (México) estimando la exposición a este contaminante y el riesgo asociado por consumo de tortillas de maíz

Se analizaron los datos reportados en la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición-Nuevo León 2011/2012 (EESN-NL 2011/2012) tomando de aquí los correspondientes al consumo de tortillas, que conjuntamente con el conocimiento del nivel de contaminación de las tortillas, permite realizar la estimación de la exposición de la población a la acrilamida, y el riesgo asociado a su consumo.

III. DISEÑO EXPERIMENTAL

3.1 Diseño experimental: actividades, motivos y justificación.

3.1.1 Estudios de acrilamida

La industria alimentaria y algunos países han investigado los niveles de acrilamida en varios alimentos por ser un compuesto genotóxico, es decir, con capacidad para modificar el ADN. Los ensayos ya han demostrado que la acrilamida produce cáncer en ratas y ratones (Kocadagli & Gokmen, 2016), pero existen pocos estudios en seres humanos que confirmen los efectos carcinogénicos. Está clasificada por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como potencial cancerígeno de categoría 2A, esto es, una sustancia probablemente cancerígena en humanos.

En 2002, estudios suecos revelaron por primera vez la formación de acrilamida al freír, asar y hornear, particularmente en alimentos ricos en carbohidratos y bajos en proteína, como papas fritas, café, galletas y pan tostado.

En México, la tortilla es el producto de mayor consumo susceptible a generar acrilamida, ya que el maíz es rico en carbohidratos y preparado a altas temperaturas.

Los laboratorios de la Dirección General de Salud y Protección del Consumidor en Europa han publicado los métodos analíticos oficiales utilizados para la detección y cuantificación de acrilamida, los más utilizados, como se ha comentado anteriormente son la GC-MS y la LC-MS/MS.

En México no existen publicaciones de una metodología oficial, tampoco estudios de determinación de acrilamida en alimentos regionales que permitan valorar el consumo de acrilamida, por lo que para esta investigación se decidió realizar la determinación de acrilamida en un producto comercial de gran consumo en la región, utilizando el método de LC-MS/MS y validando este método en el laboratorio de la Unión Ganadera Regional de Nuevo León, en el Departamento de Residuos Tóxicos. Esta validación se ha realizado de acuerdo al funcionamiento de métodos analíticos declarados en la Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011): linealidad (curva de calibración), precisión (Repetibilidad y

reproducibilidad), exactitud y límite de detección, para así obtener datos confiables y medir el riesgo o exposición de acrilamida.

3.1.2 Selección de muestra de matriz para el análisis de acrilamida

El maíz es un factor de identidad nacional mexicana, y es el único alimento al que sin distinción somos afectos todos; más allá de las diferencias por estratos económicos, sociales, culturales o por región, todos los mexicanos comemos maíz.

Las tortillas de maíz son especialmente importantes en la gastronomía mexicana y con ellas se hacen los populares tacos, flautas, quesadillas, burritos, enchiladas, tostadas y chilaquiles, entre muchos otros productos.

Para esta investigación se eligió un alimento de la cocina tradicional de México: la tostada de tortilla de maíz horneada o frita, que es una tortilla dura y crujiente. Pierde su humedad mediante el tostado en una plancha caliente, o bien, por freído en aceite, sometida a una temperatura de 120 a 180 °C hasta adquirir la textura deseada. Suele consumirse en compañía de frijoles, salsas o guacamole. Proviene de las culturas precolombinas, de la cual se origina la palabra *totopochtli*, que en náhuatl significa dorar o tostar.

Hoy las tostadas son fáciles de conseguir en cualquier supermercado o tienda del área metropolitana de Monterrey, Nuevo León, México. Existen varias marcas comerciales, cada una con sus características particulares de tamaño, de grosor, dureza y más o menos crujientes; estos rasgos son importantes también en la formación de la acrilamida. En este estudio se han obtenido un total de 45 muestras de diferentes marcas comerciales más habitualmente consumidas y de distintos lotes, y su concentración en acrilamida ha sido determinada por el método de LC-MS/MS.

3.1.3 Determinación de la ingesta diaria de acrilamida por grupo de edad

Para determinar la exposición de la población a la acrilamida, se determinó la ingesta diaria por consumo de tortillas y grupos de edad; los datos de la ingesta promedio de tortillas y el peso corporal por grupos de edad se

obtuvieron de la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición-Nuevo León 2011-2012 (EESN-NL 2011-2012).

3.2 Plan de trabajo.

De acuerdo con los objetivos establecidos, la Figura III.1 representa el diseño experimental utilizado para la realización de esta investigación.

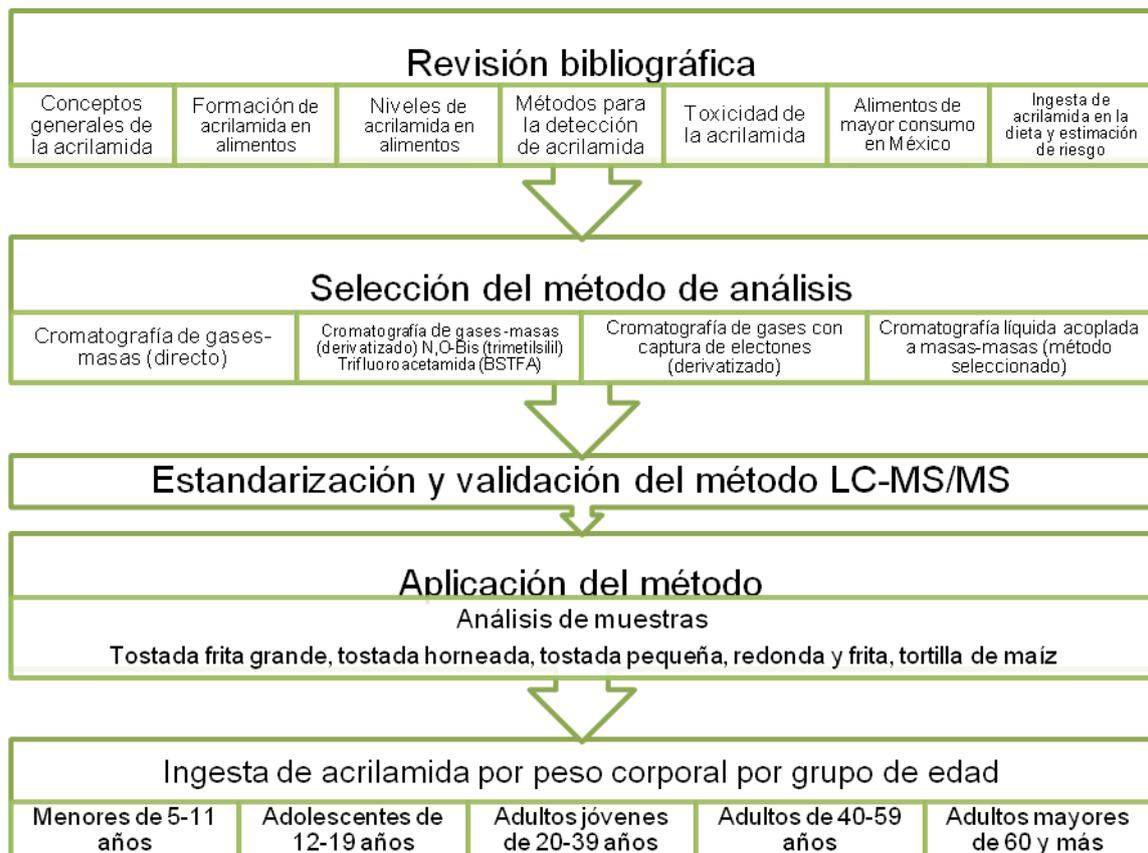


Figura III.1. Plan de trabajo realizado para la determinación de acrilamida en las tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, y la estimación de la exposición a la acrilamida en la población por grupos de edad.

En la primera fase del trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica sobre la acrilamida y los métodos de detección y cuantificación en productos con características similares a las de la tortilla de maíz. A partir de esta información se seleccionaron diferentes métodos cromatográficos basados en GC y LC para ser testados.

Se seleccionó el método por cromatografía líquida acoplada a masas-masas (LC-MS/MS), el cual se estandarizó y se validó, para posteriormente realizar el análisis en muestras de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, que se consumen en el área metropolitana de Monterrey, N.L. y relacionar el riesgo potencial asociado al consumo de este producto.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Equipos

- Cromatógrafo de Gases (Perkin Elmer Clarus 680, Massachusetts, EE. UU.).
- Cromatógrafo de gases (Perkin Elmer Auto System XL, 7000A) /Detector selectivo de masas (Perkin Elmer).
- Cromatógrafo de líquidos acoplado con un detector de masas-masas (Waters, LC-MS/MS Xevo TQD, Milford, Massachusetts, EE. UU.).
- Agitador magnético horizontal (Eberbach Corporation, Ann Arbor, Michigan, EE. UU.).
- Balanza analítica (Sartorius CUBIS MSA125S100DI, Göttingen, Alemania).
- Equipo de purificación de agua Easy Pure RF compact ultra-pure (Water system Barhstead/Thermo Scientific D7031, Waltham Massachusetts, EE. UU.).
- Procesador T-Fal 1,2,3, pica lica 650 W (Modelo MI002MX, D.F México).
- Baño de ultrasonido Vicking, (Modelo Masson, San Miguel de Tucumán, Argentina).
- Centrífuga Beckman (Coulter Allegra® X-15R, Marsella, Francia).
- Campana de extracción de gases (GV-C-120, Toluca, México).
- Agitador vórtex (Genie 2 Thermolab, Burgwedel, Alemania).
- Rotaevaporador Buchi (Model R-200, Cinnaminson, EE. UU.).
- Placa de calentamiento de 20 × 25 cm (modelo PC - 2025, Marca FIGURSA, D.F. México).

4.2 Material

- Columna Elite-5MS (5% difenil 95% dimetil polisiloxano) (30 m × 0,32 mm id × 0,25 µm) (Perkin Elmer).
- Columna HP-INNOWax (60 m × 0,32 mm id × 0,25 µm) (Agilent, Palo Alto, California, EE. UU.).
- Columna DB-5MS Polar (15 m × 0,25 mm id × 0,50 µm) (Agilent).
- Columna DB-WAX (30 m × 0,32 mm id × 0,25 µm), (Perkin Elmer).
- Columna DB-5 (30 m × 0,32mm id x 0,25 µm) (Perkin Elmer).
- Columna Acquity UPLC BEH C18 (100 mm × 2,1 mm id × 1,7 µm) (Waters, Milford).
- Filtros Millex-HPF 0,45 µm (Merck KGaA, Darmstadt, Alemania).
- Filtros de filtración de 22 µm (Acrodiscos, Merck).

4.3 Material de seguridad

- Campana de gases tipo 1 (Labconco, Kansas, EE. UU.).
- Bata blanca de laboratorio (Barco, para dama Modelo 1343, Monterrey N.L.).
- Máscaras de protección contra gases y humo tóxico (Mascarilla Facial Moldex Serie 8000, Querétaro. México).
- Cubre boca Plisado 3 Capas Blanco 2000, (Grupo Alyger, Guadalupe N.L, México).
- Guantes de nitrilo (Ambiderm, Guadalupe N.L, México).
- Lentes de seguridad (Jackson expo mica clara, Guadalupe N.L, México).

4.4 Reactivos

- Acrilamida, ≥ 99 % pureza (Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EE. UU.).
- Acetona grado reactivo (JT Baker, Pennsylvania, EE. UU.).
- Acetonitrilo HPLC (JT Baker).
- Acetonitrilo spectranal $\geq 99,9\%$, (Sigma-Aldrich).
- Acetonitrilo HPLC (Thermo Fisher Scientific, Alcobendas, Madrid, España).
- Ácido fórmico HPLC, 98 -100% (Merck, KGaA).
- Ácido hidrobromico $\geq 40,0\%$ (Sigma-Aldrich).
- Agua HPLC, Pure Lab UHQII (Elga, Illinois, EE. UU.).
- Acetato de etilo (Thermo Fisher Scientific).
- N,O-Bis (trimetilsilil) Trifluoroacetamida (BSTFA) y TMCS (trimetilclorosilano) (Thermo Fisher Scientific).
- Bromato de potasio (Sigma-Aldrich).
- Bromo (Br₂) (Fluka, Sigma-Aldrich).
- Bromuro de potasio (Sigma-Aldrich).
- 2,3 DBPA, 2,3-dibromopropanol (Sigma-Aldrich).
- Cloruro de Sodio grado analítico (Thermo Fisher Scientific).
- Florisil (Supelco, Sigma-Aldrich).
- Hexano $\geq 99,0\%$ (Fluka, Sigma-Aldrich).
- Hexano HPLC (JT Baker).
- Heptano (Thermo Fisher Scientific).
- Metacrilamida $\geq 98,0\%$ HPLC (Fluka Sigma-Aldrich).

- Metanol HPLC (JT Baker).
- Sulfato de magnesio (Sigma-Aldrich).
- Metanol HPLC (Fermont, Productos Químicos Monterrey, Monterrey, México).
- Mezcla PSA y MgSO₄, (Thermo Fisher Scientific).
- Nitrógeno (Gases Industriales INFRA, Monterrey, Nuevo León, México)
- Propanol HPLC (JT Baker).
- Sulfato de amonio para biología molecular $\geq 99.0\%$ (Sigma-Aldrich).
- Sulfato de sodio HPLC (Thermo Fisher Scientific).
- Sulfato de magnesio anhidro (Thermo Fisher Scientific).
- Trietilamina HPLC (Fluka, Sigma-Aldrich).
- Tiosulfato de sodio, $\geq 99,5\%$ (Sigma-Aldrich).

4.5 Metodología

Con el objetivo de seleccionar un método analítico que cuantificara los niveles de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz se testaron varios métodos basados en cromatografía de gases con detector de masas (GC-MS) o captura de electrones (GC-ECD). Primero, se probó el método de Tateo & Bononi (2003), posteriormente se testó el propuesto por Lagalante & Felter (2004), y por último el de Zhu *et al.* (2008). Finalmente, por los resultados obtenidos se empleó el método de cromatografía líquida acoplada a masas-masas (LC-MS/MS) desarrollado por la Food and Drug Administration (FDA).

4.5.1 Determinación de acrilamida por cromatografía de gases-masas

Se utilizó el método de Tateo & Bononi (2003) con los siguientes equipos, columna y condiciones cromatográficas:

- Cromatógrafo de Gases Perkin Elmer Autosystem XL.
- Detector Selectivo de Masas Perkin Elmer.
- Fuente de ionización por impacto de electrones y analizador cuádruple.
- Columna polar HP-INNOWax (60 m × 0,32 mm id × 0,25 μm).
- Inyector
 - Temperatura de inyector: 250 °C.
 - Modo: Split.
 - Volumen de inyección: 10 μL.
- Horno
 - Temperatura del horno: 60 °C por 1 min incrementando 10 °C por min hasta 250 °C.
 - Tiempo de corrida: 21 min.
 - Gas acarreador: nitrógeno.
 - Flujo de 2,0 mL / min.
- Detector de Masas
 - Temperatura de la fuente de ionización: 230 °C.
 - Temperatura de interface: 230 °C.
 - Temperatura de cuádruplo: 150 °C.
 - Modo de adquisición de datos: SIM.

4.5.2 Determinación de acrilamida empleando N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) por cromatografía de gases-masas (GC-MS)

Después de probar el método de Tateo & Bononi (2003), se trabajó con el método de sililación propuesto por Lagalante y Felter (2004). Para ello se tomaron 2 mL de la solución de trabajo anterior y se llevó a evaporación con nitrógeno a 50 °C; después se le agregó el BSTFA (N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida) a una temperatura de 80 °C por 20 min. Finalmente se recuperó con 200 μL de metanol y se llevó a inyectar.

Se trabajó con el mismo equipo GC-MS del apartado 4.5.2 y sólo se cambió de columna utilizando una columna Elite-5MS (5 % difenil 95 % dimetil polisiloxano) (30 m × 0,32 mm id × 0,25 μm).

4.5.2.1 Preparación del estándar de acrilamida

Se prepararon una solución de stock de acrilamida de 100 mg/L (ppm) y una solución de trabajo de 10 ppm, pesando 10 mg del estándar, y se llevó a aforo con metanol en un matraz aforado de 100 mL (solución stock). Se tomó 1 mL de la solución stock y se llevó a aforo de 10 mL con metanol (solución de trabajo). Esta última se inyectó directamente en el cromatógrafo de gases-masas (GC-MS).

4.5.3 Determinación de acrilamida por cromatografía de gases con captura de electrones

Posteriormente se trabajó con el método propuesto por Zhu *et al.* (2008) empleando un cromatógrafo de gases con detector de captura de electrones (GC-ECD), utilizando un método de adición de estándar. En esta técnica se determina la acrilamida mediante la identificación del pico con el mismo tiempo de retención del compuesto estándar 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA) y es confirmado por GC-MS. El análisis de GC-MS confirma que el 2,3-DBPA se convierte en 2-BPA casi por completo en la columna capilar polar empleando trietilamina. Para la aplicación del método se realizaron los siguientes pasos:

1. Se preparó una solución de 2000 ppm de acrilamida en agua pureza HPLC pesándose 2 mg de acrilamida y se aforó a 10 mL.
2. En un balón de fondo redondo cubierto con papel aluminio y en un baño de hielo a 0 °C (temperatura controlada) se añadió la solución de acrilamida preparada, más 0,1 g de KBr y 5 gotas de HBr. La adición se realizó con un agitador magnético para mantener la agitación constante. Se mide la T^a (0 °C) y el pH = 0-3, la recomendación fue dejarlo a pH = 0.
3. Luego se goteó 2 mL de agua saturada de Br₂.
4. Esperar 4 h manteniendo la $T_a = 0$ °C y siempre en agitación.
5. Para eliminar el exceso de bromo, se le adicionó unas pocas gotas de solución de tiosulfato de sodio 1 M hasta que se observe un color blanco (transparente).

6. En un embudo de separación se colocó la mezcla de reacción y se adicionó una porción de 10-15 mL de acetato de etilo, y se agitó vigorosamente por 3 min.
7. Se repitió la extracción (numeral 6) dos veces más, y se recogió cada porción de acetato de etilo (fase orgánica) en un erlenmeyer con una cama de sulfato de sodio anhidro previamente calentado a 80 °C.
8. Se transfirió el extracto a un balón de fondo redondo y se lavó el residuo de sulfato con aproximadamente con 8 mL de acetato de etilo preparado al momento. Los lavados se juntaron con el extracto.
9. Los extractos se evaporaron en rotavapor hasta reducir el volumen a 3 mL.
10. Se transfirió el extracto a un tubo de ensayo y se lavó el balón con 3 mL de acetato de etilo.
11. Se concentró con N₂ hasta tener un volumen de aproximadamente de un 1 mL. Nota: si se utilizan concentraciones altas y se produce precipitado sólido blanco en el numeral 9, omitir los numerales 10 y 11.
12. Se preparó la columna de florisil (3 cm de florisil).
13. Se acondicionó la columna de florisil con 10 mL de hexano.
14. Se pasó la muestra por la columna de florisil, se lavó el recipiente que contenía la muestra con acetato de etilo (1 mL) y el eluyente se recogió en un balón previamente tarado.
15. Se adicionó a la columna de florisil 10 mL de una solución hexano acetona (9:1) y se recogió todo en el mismo recipiente.
16. Se lavó la columna de florisil con 10 mL de una solución hexano acetona (8:2) y se recogió todo el mismo recipiente del numeral 14.
17. Se concentró con N₂ hasta la sequedad.
18. En el fondo del recipiente deberá quedar un sólido blanco en forma de agujas que corresponde al 2,3-DBPA. Esperar a que se seque completamente el solvente y pesar el recipiente más el sólido. Calcular el peso del sólido.

19. Se recogieron unos cuantos cristales para correr por GC-MS.
20. Se reconstituyó el sólido del numeral 18 con 1-2 mL de acetato de etilo.
21. Se adicionó trietilamina para obtener el compuesto 2-BPA.
22. Se agitó por 7 min hasta precipitación de una sal blanca.
23. Se filtró a través de un filtro Millex-HPF 0,45 μm .
24. Concentrar con nitrógeno hasta sequedad.
25. Se agregaron 10 mL de heptano y se calentó hasta punto de ebullición; cuando se disolvió la mayor cantidad de sólido, se pasó el sobrenadante a un vaso de precipitados limpio (recristalización).
26. Se repitió el numeral 25 una vez más, pero adicionando el heptano en otro vaso limpio.
27. Se dejó enfriar el vaso a temperatura ambiente y se esperó a la formación de cristales blancos brillantes en forma de láminas.
28. Una vez formados los cristales, se desechó el heptano sobrenadante, y se secaron los cristales en un embudo Büchner empleando vacío.
29. Finalmente se almacenó en condiciones de oscuridad y refrigeración, y se intentó utilizar lo más rápido posible.

4.5.3.1 Preparación de la solución stock

El sólido seco obtenido en el numeral 28 corresponde a BPA. Se pesó 1 mg de este producto y se aforó a 1 mL con acetato de etilo para obtener una concentración stock de 1000 ppm (1 mg/mL).

4.5.3.2 Solución de trabajo

Se tomaron 5 μL de la solución stock y se aforaron en 1 mL con acetato de etilo para obtener una concentración de solución de trabajo de 5 ppb.

4.5.3.3 Soluciones de la curva externa

De la solución de trabajo se inyectaron en el cromatógrafo de gases 9 niveles con un volumen de 1,5; 2; 5; 10; 15; 20; 50; 100; 150 y 200 μL para obtener en la curva de calibración externa una concentración de 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 y 1000 ppb, respectivamente.

4.5.3.4 Condiciones cromatográficas del método con captura de electrones

Se utilizó la siguiente columna y condiciones cromatográficas:

- Columna polar HP-INNOWax (60 m \times 0,32 mm id \times 0,25 μm)
- Inyector
 - Temperatura de inyector: 230 $^{\circ}\text{C}$.
 - Modo: *Splitless*.
 - Volumen de inyección: 1 μL .
- Horno
 - Temperatura del horno: 45 $^{\circ}\text{C}$ (2 min) 150 $^{\circ}\text{C}$ (6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$) 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ / 240 $^{\circ}\text{C}$ a 8 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 270 $^{\circ}\text{C}$ durante 20 min.
 - Tiempo de corrida: 20 min.
 - Presión: Flujo de 2,0 mL/min.
 - Gas acarreador: Nitrógeno a una velocidad de flujo de 1 mL/min.
- Detector de Masas
 - Temperatura de la fuente de ionización: 230 $^{\circ}\text{C}$.
 - Temperatura de interface: 270 y 250 $^{\circ}\text{C}$.
 - Temperatura de cuádruplo: 150 $^{\circ}\text{C}$.
 - Modo de adquisición de datos: SIM.

4.5.3.5 Curva de calibración

De la solución de trabajo se inyectaron en el cromatógrafo de gases 9 niveles con un volumen de 1,5; 2; 5; 10; 15; 20; 50; 100; 150 y 200 μL , para obtener en la curva de calibración externa una concentración de 7,5; 10; 25; 50; 75; 100; 250; 500; 750 y 1000 ppb, respectivamente.

4.5.3.6 Preparación de la muestra

Se realizó de la siguiente manera:

1. En un tubo de ensayo se pesó un gramo de muestra previamente triturada en una licuadora.
2. Se le colocó un agitador magnético y se enriqueció con la solución de trabajo de una concentración de 10 ppb de acrilamida preparada en agua HPLC.
3. Luego se le adicionaron 10 mL de agua HPLC.
4. Se agitó el tubo en un baño de 60 °C por una hora.
5. Posteriormente, se centrifugó por 3 min a 1000 rpm.
6. Se extrajo la fase acuosa en un tubo de ensayo y se le adicionaron 8 mL de n-hexano, se centrifugó por 2 min a 2500 rpm y luego se eliminó el hexano. Este paso se repitió 2 veces.
7. Luego se retiró la fase acuosa y se siguió el tratamiento descrito en el punto 4.5.4 a partir del paso 2, sustituyendo la solución de acrilamida preparada por la solución acuosa del tratamiento de la muestra.

4.5.4 Determinación de acrilamida por el método de cromatografía líquida acoplada a masas-masas (LC-MS/MS)

Con los métodos mencionados anteriormente no se pudo detectar la acrilamida en tostadas de tortillas de maíz. Sin embargo, la aplicación del método de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS/MS), basado en el método desarrollado por la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos, permitió la detectar y cuantificar la acrilamida en tortillas de maíz tostadas. A continuación, se describe el proceso realizado.

4.5.4.1 Preparación de soluciones de acrilamida y metacrilamida

Se prepararon una serie de soluciones de acrilamida y metacrilamida según se muestra en las Tablas 4.1 y 4.2.

4.5.4.2 Establecimiento de las condiciones para el análisis de acrilamida por LC-MS/MS

4.5.4.2.1 Validación del sistema

Para validar el sistema cromatográfico, se evaluaron la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación, de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011) para el contenido de contaminantes en alimentos.

Tabla 4.1. Preparación de soluciones de acrilamida.

Nombre de la solución	Cantidad tomada	Unidad	Procedencia	Volumen aforado (mL)	Concentración (ppb)
Stock	0,1	g	Material de referencia	100	1 000 000
Intermedia	1	mL	Stock	100	10 000
Trabajo I	10	mL	Intermedia	100	1 000
Trabajo II	10	mL	Trabajo I	100	100

Tabla 4.2. Preparación de soluciones de metacrilamida como estándar interno.

Nombre de la solución	Cantidad tomada	Unidad	Procedencia	Volumen aforado (mL)	Concentración (ppb)
Stock	0,1	G	Material de referencia	100	1 000 000
Intermedia	0,5	mL	Stock	100	5 000
Trabajo	10	mL	Intermedia	100	500

4.5.4.2.2 Linealidad del sistema

Se construyó una curva de calibración con 5 estándares de acrilamida por triplicado en concentraciones entre 10 y 1000 ppb. Utilizando el método de mínimos cuadrados, se obtuvo la ecuación de la recta para el área en función de la concentración y se verificó la linealidad considerando el coeficiente de correlación (Secretaría de Salud, 2011).

4.5.4.2.3 Precisión

Para evaluar la precisión, se calculó en función del porcentaje de desviación estándar relativa (% DER) de los factores de respuesta de los estándares de la curva de calibración.

4.5.4.2.4 Exactitud

Para evaluar la exactitud, se calculó la concentración de los estándares de la curva de calibración utilizando la ecuación obtenida por regresión lineal. Utilizando el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para la concentración calculada en función de la concentración teórica. La concordancia entre ambas se evaluó a través del valor de la pendiente y del coeficiente de correlación.

4.5.4.2.5 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)

El LD se determinó considerando una relación señal/ruido de 3 y el LC se determinó considerando una relación señal/ruido de 10 (Miller & Miller, 2002).

4.5.4.2.6 Curva de calibración de acrilamida

De la solución de trabajo II de acrilamida se inyectaron 6 niveles para la curva de calibración externa en concentraciones de 1, 2, 5, 10, 20 y 50 ppb, utilizando metacrilamida como estándar interno en concentración de 5 ppb para cada uno de los niveles estudiados. La preparación de las soluciones empleadas en la curva de calibración se resume en la Tabla 4.3.

Tabla 4.3. Soluciones de acrilamida para curva de calibración en el sistema LC-MS/MS.

Identificación de la solución	Volumen tomado de solución de trabajo (mL)	Volumen aforado (mL)	Concentración (ppb)
LC1	5	100	50
LC2	2	100	20
LC3	1	100	10
LC4	0,5	100	5
LC5	0,2	100	2
LC6	0,1	100	1
Se adiciona 1 mL de solución de trabajo de metacrilamida de 500 ppb.			5

4.5.4.3 Determinación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas por LC-MS/MS

Dado que no existe un procedimiento oficial para la cuantificación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, se adoptó la técnica de cuantificación en galletas, pan y cereales descrita por la FDA de los EE. UU. para determinar y cuantificar la acrilamida en estos alimentos.

El procedimiento para la cuantificación de acrilamida se trabajó en dos etapas: extracción y limpieza. Para la extracción de la muestra se empleó una mezcla de sulfato de magnesio ($MgSO_4$) y cloruro de sodio ($NaCl$), con el fin de reducir el contenido de agua. En la etapa de limpieza se usó PSA (amina primaria y secundaria) para eliminar ácidos orgánicos, pigmentos polares y otros productos, con la finalidad de purificar la muestra.

4.5.4.3.1 Fortificación de la muestra

El procedimiento empleado consiste en fortificar muestras de productos de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas con estándar certificado de acrilamida a distintas concentraciones.

La validación del sistema se realizó empleando una curva de calibración de 6 niveles, y la validación del método se trabajó también con 6 niveles de adición de estándar a la matriz. En la Tabla 4.4 se resume la preparación de las soluciones utilizadas, con la adición de 100 μL de solución de trabajo de metacrilamida de 500 ppb., para obtener una concentración final de 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 4.4. Fortificación de la muestra para la validación del método.

Identificación de la muestra	Cantidad tomada (μL)	Tomada de la solución de	Matriz (g)	Concentración final ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
N1	500	Trabajo I	1	500
N2	200	Trabajo I	1	200
N3	100	Trabajo I	1	100
N4	500	Trabajo II	1	50
N5	200	Trabajo II	1	20
N6	100	Trabajo II	1	10

4.5.4.4 Validación del método para la determinación de acrilamida

Para la validación del método se emplearon los criterios de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación de acuerdo a las Recomendaciones de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para Validación de Métodos Fisicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (2011) para el contenido de contaminantes en alimentos.

4.5.4.4.1 Linealidad

Para evaluar la linealidad del método, se construyó una curva de calibración con estándares de acrilamida a 6 niveles de concentración de 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por triplicado, utilizando el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para el área en función de la concentración y se verificó la

linealidad considerando el coeficiente de correlación (Secretaría de Salud de México, 2011).

4.5.4.4.2 Exactitud y precisión

La exactitud del método desarrollado se evaluó determinando el porcentaje de recuperación de acrilamida adicionada a muestras de tortillas tostadas. Las muestras adicionadas se prepararon de acuerdo al siguiente procedimiento: se tomaron 4 bolsas 800 g cada una y de cada bolsa el 10 %, equivalente a 80 g, se trituró en un procesador T-Fal 1,2,3, pica lica 650 W (Modelo MI002MX, Cd. de México, México). Del polvo obtenido se pesó 1 g y se adicionó 100 µL de la solución de trabajo del estándar interno de metacrilamida de una concentración de 500 µg/L. Posteriormente se agregaron 10 mL de agua pureza HPLC, 5 mL de hexano, 10 mL de acetonitrilo, 4,5 g de sales de sulfato de magnesio y cloruro de sodio. El tubo se agitó vigorosamente por 15 min y se centrifugó a 2000 rpm por 10 min. La capa de hexano se eliminó y 2 mL de acetonitrilo se transfirieron a un tubo de 15 mL con 50 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄; el tubo se agitó por 30 s para después centrifugarse a 2000 rpm por 10 min. El sobrenadante se filtró en filtros de 0,22 µm y se transfirió a un vial de 2 mL para el análisis de LC-MS/MS.

Para evaluar la exactitud se calculó el porcentaje de recuperación con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Valor verdadero o de referencia}} \times 100$$

Para evaluar la precisión se calculó el % Desviación Estándar (DER) de los porcentajes de recuperación obtenidos.

4.5.4.4.3 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)

El LD se determinó considerando una relación Señal/Ruido de 3 y el LC considerando una relación de 10 (Miller & Miller, 2002). Se emplearon los cromatogramas de muestras de tortilla adicionada con acrilamida.

4.5.4.5 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas de tostadas horneadas y fritas

El método desarrollado se empleó en el análisis de acrilamida presente en muestras comerciales de tortillas tostadas. Se examinaron 45 muestras de diferentes marcas comerciales más habitualmente consumidas, de diferente tamaño, tipos (11 fritas grandes, 14 horneadas, 16 pequeñas-redondas-fritas, y 4 tortillas) y de distintos lotes.

La cuantificación se realizó con una curva de calibración de 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ preparada fortificando un blanco con una solución de estándar de acrilamida.

El blanco de tostada se eligió analizando tortillas que no fueron sometidas al proceso de tostado o fritura, por lo que no contenían acrilamida.

4.5.4.6 Preparación de la muestra

Se realizó en dos etapas: la extracción con solvente acetonitrilo y la limpieza y purificación de la muestra con una mezcla dispersiva (Figura IV.1).

4.5.4.6.1 Extracción

Se pesó 1 g de muestra (tostada molida) en un tubo de centrifuga de 50 mL. Después se le agregaron 5 mL de hexano y se agitó 1 min en el vórtex; luego se adicionaron 10 mL de agua pureza HPLC más 10 mL de acetonitrilo para precipitar los componentes de la matriz y, posteriormente, se fortificó la muestra con 100 μL de la solución de trabajo del estándar interno de metacrilamida de una concentración de 500 $\mu\text{g}/\text{L}$ y se agitó en el vórtex por 1 min para homogenizarla. Finalmente, se le agregó una mezcla de 4 g de MgSO_4 y 0,5 g de NaCl , se agitó manualmente hasta que se disolvieron las sales para después colocarlo en el agitador mecánico por 10 min, y centrifugarse por 10 min a 2000 rpm, eliminándose así el hexano.

4.5.4.6.2 Limpieza y purificación

Se tomaron 2 mL del extracto y se transfirieron a otro tubo de centrifuga de 15 mL, que contenía 0,4 g de la mezcla dispersiva (150 mg $MgSO_4$ /50 mg PSA). Después se agitó en el vórtex por 1 min, se centrifugó por 5 min a 2000 rpm, se filtró el extracto con filtros de $0,22 \mu m$ y se trasfirió a viales de 2 mL para su cuantificación por LC-MS/MS.

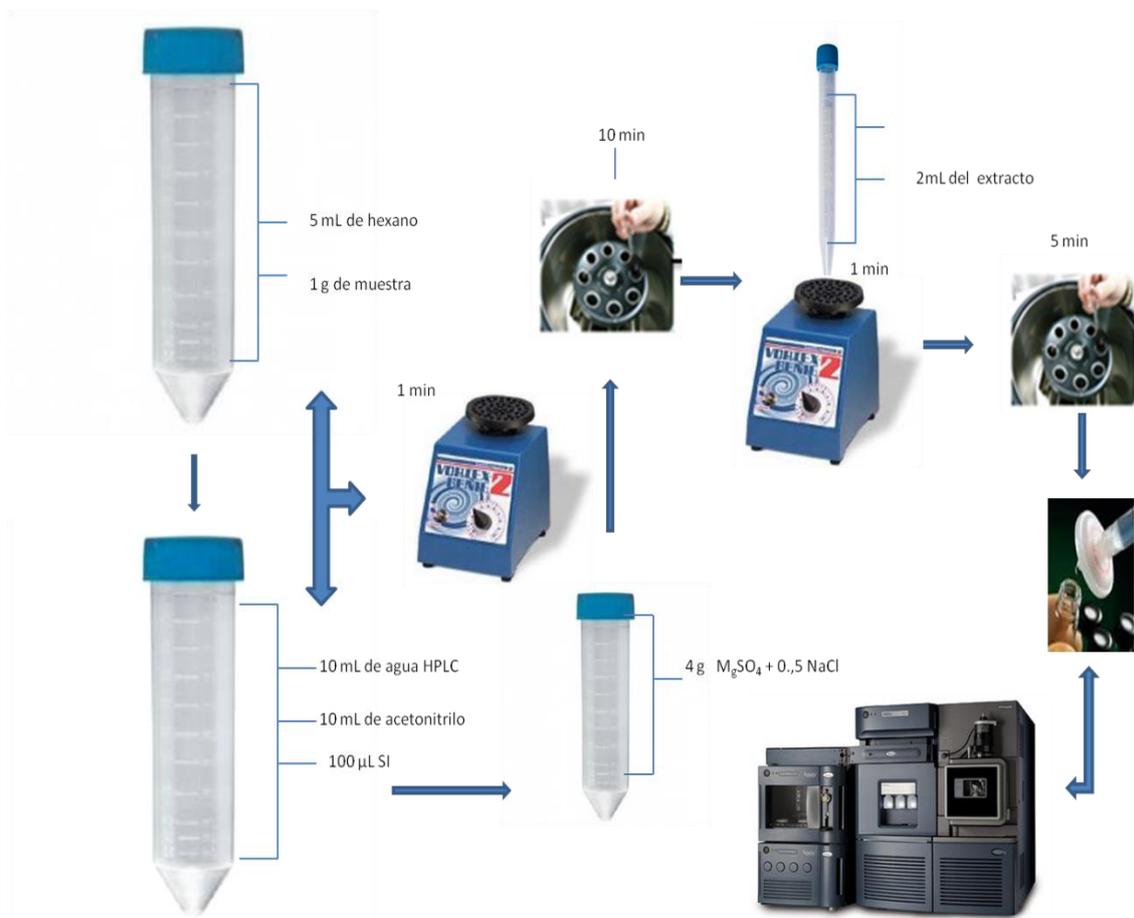


Figura IV.1. Procedimiento de preparación de muestras de tostadas para la determinación de acrilamida por LC-MS/MS.

4.5.4.7 Condiciones de cromatografía del método LC-MS/MS

Se utilizaron los siguientes equipos, columnas y condiciones cromatográficas:

- Equipo Waters XEVO TQ UPLC MS/MS.

- Columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 mm \times 100 mm).
- Condiciones cromatográficas.
 - Temperatura de columna: 30 °C.
 - Volumen de inyectado: 10 μ L.
 - Flujo de 0,2 mL/min.
 - Modo isocrático.
 - Fase móvil A: Agua + 0,1% ácido fórmico (97,5%).
 - Fase móvil B: Metanol + 0,1% ácido fórmico (2,5%).
 - Tiempo de ciclo: 10 min.
 - Tiempo de elución: 7 min.
 - Tiempo de registro: 3 min.
- Espectrómetro de masas-masas
 - Modo de ionización electrospray: ion positivo ESI+.
 - Modo de adquisición del ion: MRM (Monitoreo de Reacción Múltiple).
 - Voltaje capilar: 0,70 (kV).
 - Voltaje cono: 70,0 (V).
 - Rango de voltaje: 22 kV.
 - Rango de colisión: 8 eV.
 - Temperatura de la fuente: 150 °C.
 - Temperatura del gas desolvatación: 350 °C.
 - Flujo del gas de desolvatación: 1000 (L/h) nitrógeno.
 - Flujo de gas de colisión: 0,18 (mL/min).

4.5.4.8 Procedimiento de cuantificación

Se estabilizó y optimizó el equipo con las condiciones cromatográficas especificadas anteriormente. Antes de cada análisis cromatográfico se verificó la calibración del equipo y la adecuabilidad del método para obtener datos seguros y precisos.

Se usó un análisis de regresión de una curva de calibración obteniéndose la pendiente y el coeficiente de correlación.

Se inyectaron el blanco de reactivo, el blanco de matriz, las soluciones para la curva, las recuperaciones y las muestras.

Tabla 4.5. Parámetros MS-MS utilizados en el método LC-MS/MS.

Analito	Ion Padre	Ion Precursor	Voltaje del cono CV (V)	Energía de colisión (eV)
Acrilamida	71,50	27,10	20	12
Acrilamida	71,50	44,05	20	11
Acrilamida	71,50	*55	20	9
Metacrilamida	85,45	41,05	22	12
Metacrilamida	85,45	*58,10	22	10

* Ion de cuantificación.

4.5.4.8.1 Cálculos del analito

Se calcula la concentración ($\mu\text{g}/\text{kg}$) de acrilamida de acuerdo a

$$y = m x + b$$

$$x = \frac{y - b}{m}$$

Donde:

x = Concentración de acrilamida en la muestra, en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

y = (Área de acrilamida/área SI) concentración del SI.

b = Intersección con el eje.

m = Pendiente de la curva.

Se reporta en $\mu\text{g}/\text{kg}$ del compuesto encontrado.

4.5.4.8.2 Control de calidad

Se realiza en cada etapa del procedimiento, siguiendo las Buenas Prácticas de Laboratorio y los controles de calidad establecidos en este procedimiento.

Se verificó el cumplimiento de los criterios de aceptación de los controles de calidad para la aceptación de los resultados del análisis que se recogen en la Tabla 4.6.

Tabla 4.6. Criterios de aceptación de los resultados de análisis según la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura (Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos, Secretaría de Salud de México 2011).

Proceso	Control de Calidad	Criterio de Aceptación	Criterio de Rechazo
1	Adecuabilidad del sistema cromatográfico	$\%CV \leq 20\%$ en respuesta y tiempo de retención	$\%CV > 20\%$
2	Linealidad	Coefficiente de correlación mayor o igual a 0,995	Coefficiente de correlación menor a 0,995
3	Precisión	$\%CV \leq 20\%$	$\%CV > 20\%$
4	Exactitud	70 a 120%	< 60% o >120% de recobro
5	Muestra duplicada	$\leq 10\%$ DPR (Diferencia porcentual relativa)	DPR > 10%
6	Blanco de matriz	Se trabajó con tortilla de maíz libre de acrilamida.	
7	Blanco de reactivos	Se trabajó todo el proceso de extracción sin muestra sin estándar.	

4.5.5 Determinación de la exposición a la acrilamida en la población

La determinación de la exposición de la población regiomontana a la acrilamida por el consumo de tostadas se realizó considerando los datos sobre consumo promedio diario de tostadas por grupos de edad, con la concentración promedio de acrilamida encontrada en este trabajo, así como el peso promedio de la población por grupos de edad. Para ello se aplicó la siguiente fórmula:

Ingesta diaria de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) =

$$\frac{\text{Concentración de acrilamida en tostadas } (\mu\text{g}/\text{kg}) \times \text{Consumo } (\text{kg}/\text{día})}{\text{Peso corporal } (\text{kg})}$$

Donde:

Concentración de acrilamida es el promedio de acrilamida que contienen las muestras analizadas, expresadas en $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Consumo es la cantidad de tostadas de tortilla de maíz que se ingieren en un día por grupos de edad, expresada en $\text{kg}/\text{día}$.

Peso corporal es el promedio de peso corporal en la población por grupos de edad, expresado en kilos.

Los datos correspondientes al consumo diario de tostadas por grupos de edad se obtuvieron de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT, 2012), en la sección correspondiente al estado de Nuevo León. Además, de la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición-Nuevo León 2011/2012 (EESN-NL 2011/2012) se obtuvieron los pesos promedios por edades.

Con los resultados obtenidos se realizó el estudio de análisis de riesgo.

4.5.6 Análisis estadístico

Para conocer la relación de los resultados obtenidos en la cuantificación de acrilamida en las tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, en función de las variables del proceso de elaboración, se hicieron las pruebas estadísticas de carácter descriptivo, que involucraron medidas de tendencia central y variación. Los datos obtenidos se examinaron mediante un análisis de varianza (ANOVA) a través del programa SPSS 20, así como la prueba de Tukey para comparar las medias.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Métodos probados para determinar acrilamida

En la presente investigación se experimentaron varios métodos y técnicas para determinar el más adecuado para cuantificar la acrilamida en tostadas de tortillas de maíz hornadas y fritas, tomando en cuenta la disponibilidad de los equipos de los laboratorios en que se trabajó.

El objetivo fundamental fue seleccionar una técnica con las características analíticas requeridas, como sensibilidad, especificidad, exactitud y precisión, parámetros pertinentes para garantizar que con el método empleado se logre determinar los niveles de acrilamida. A continuación, se describen las técnicas probadas y los resultados obtenidos.

5.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas

Durante los últimos años, diversos investigadores han desarrollado y descrito la validación de métodos analíticos basados en la cromatografía de gases/masas para la determinación de acrilamida. Estos procedimientos han sido publicados por revistas científicas, instituciones gubernamentales y universidades. Entre ellos hay métodos directos y otros que utilizan diferentes derivatizaciones para mejorar la cuantificación de la acrilamida (Ono et al., 2003; Pittet et al., 2004; Serpen & Gokmen 2007; Tareke et al., 2000).

5.1.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (método directo)

Uno de los métodos testados en este estudio fue el de cromatografía de gases con espectrometría de masas que utilizaron la Food Standards Agency (FSA, 2002), la Oficina Federal Suiza de Salud Pública (OFSP, 2002) y autores de trabajos de investigación como Tateo & Bononi (2003).

El método descrito por Tateo & Bononi (2003) aplica un análisis directo en el que se usa un solo solvente (metanol), para la determinación de acrilamida en una concentración de 100 a 4000 µg/L (ppb) con una columna polar Supelcowax (30 m × 0,25 mm id × 0,20 µm; Supelco; Milán, Italia),

utilizándose un equipo GC-MS QP210 (Shimadzu, Milán, Italia) en modo splitless por 1 min.

En nuestro laboratorio se aplicó esta técnica empleando las condiciones cromatográficas señaladas por los autores, pero utilizando una concentración de 100 µg/L (ppb) y una columna polar HP-INNOWax, (60 m × 0,32 mm id × 0,25 µm) con fase similar a la Supelcowax utilizada originalmente. Sin embargo, no se logró la detección ni la identificación del pico de acrilamida, tanto del estándar interno como el de la curva de calibración.

De acuerdo con diversos autores como Levine *et al.* (2009), Shalini *et al.* (2010) y Zhu *et al.* (2008), éstos refieren la complejidad de este método para detectar acrilamida a niveles bajos de µg/kg (ppb), y comentan que no es conveniente para el análisis en alimentos cocidos o procesados. En particular, carece de selectividad y grado de certeza del analito, lo que dificulta la identificación de iones característicos en el espectro de masa requerida para confirmar la presencia de una molécula pequeña como la acrilamida, indicando la interferencia o señal de ruido en los cromatogramas que impiden obtener información de la detección, ya sea por los solventes utilizados o por la composición de la matriz.

Existen otros autores como Biedermann *et al.* (2002) que también utilizaron un método directo similar al de Tateo & Bononi (2003), no obstante, este grupo de investigadores trabajó con una columna Carbowax 20M de 10 m × 0,25 mm i.d. recubierta de film de 0,4 µm, y empleando una precolumna de Carbowax 20M de 40 cm × 0,53 mm i.d. En este estudio se destaca la importancia de usar una precolumna, ya que facilita una buena identificación del pico de acrilamida.

Sin embargo, un estudio más reciente, realizado por Pascali *et al.* (2014), demostraron que el análisis directo de acrilamida es posible utilizando diferentes columnas (Agilent DB-5MS UI 30 m × 0,25 mm × 0,50 µm; Agilent VF-WAXms 30 m × 0,25 mm × 0,25 µm; Agilent CP-Wax 58 FFAP CB 25 m × 0,20 mm × 0,30 µm; Agilent DB-624 UI 30 m × 0,25 mm × 1,40 µm) para obtener el pico de acrilamida, evaluando solo la linealidad y las respuestas absolutas de área, sin aplicar estándar interno, y considerándose solo las especificaciones de temperatura que se adaptaron a cada columna. Además,

en aquel trabajo no se estimaron más parámetros de evaluación, como la especificidad, exactitud y precisión del método.

Otros investigadores, por ejemplo Ahn *et al.* (2002), Nemoto *et al.* (2002) y Ono *et al.* (2003) sugieren que el análisis de acrilamida no se realice de manera directa y se derivatice para obtener buenos resultados e identificación de este compuesto, y que, para confirmar la eficiencia del método, se utilice un detector de captura de electrones (ECD) o un MS/MS.

Dunovská *et al.* (2006) también confirmaron en su estudio que el análisis directo por GC-MS muestra una baja eficiencia en el pico de separación cromatográfico y la fragmentación de masas es baja, por lo cual sugieren la derivatización para determinar y cuantificar la acrilamida.

5.1.1.2 Empleo de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) por cromatografía de gases-masas (GC-MS)

Se continuaron probando otras técnicas cromatográficas, entre ellas la de sililación, empleada por Lagalante & Felter (2004) en donde se utilizó N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA), reactivo económico que permite una rápida derivatización y la sililación de acrilamida formando N,O-Bis (trimetilsilil) acrilamida (BTMSA). En esta investigación no se logró obtener la fragmentación del patrón de masas para BTMSA ni detectar el pico específico correspondiente a la acrilamida. Lagalante & Felter (2004), en sus resultados del análisis utilizando los mismos reactivos, mencionan que cuando la extracción es incompleta, los agentes de sililación pueden someterse a reacciones adicionales, esto hace que disminuya la sensibilidad analítica para la acrilamida y se observa que el ion padre (M^+) es débil o inexistente debido a la incapacidad para extraerlo o la presencia de acrilamida a niveles bajos. El uso excesivo de BSTFA también inhibe las reacciones de sililación.

La temperatura óptima de reacción de sililación por BTMSA se produce a 70 °C, pero si se aumenta la temperatura de ionización por encima de este valor se disminuye la respuesta de acrilamida, posiblemente debido a la autopolimerización, que causa pérdida de señal. Se recomienda que la detección de ionización de llama (FID) sea en el modo SIM, ya que el pico de acrilamida y el patrón interno están libres de cualquier compuesto coeluyente.

5.1.2 Cromatografía de gases con captura de electrones (GC-ECD)

La cromatografía de gases con captura de electrones (ECD), es el método para determinar acrilamida en agua recomendado y utilizado por la Agencia de Protección del Medio Ambiente (Método 8316, 1994) y la Agencia de Salud Alemana (BGVV), Seminario 2002 (www.bfr.bund.de/cm/343/wittkowski02.pdf). Sin embargo, este procedimiento no es fácil de aplicar para determinar acrilamida en una gran variedad de productos alimenticios de matrices complejas.

Zhu *et al.* (2008) desarrollaron un método de determinación de acrilamida por GC-ECD utilizando la adición estándar, basándose en el empleo de 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA) para convertirlo a 2-bromopropionamida (2-BPA) e identificar y cuantificar este contaminante en alimentos. Este procedimiento, aplicado en nuestro estudio, se describe con detalle en el punto 4.5.3 de la metodología. Este método se basa en la derivatización y bromación del doble enlace de la acrilamida para producir el producto 2,3-dibromopropionamida (2,3-DBPA), que se extrae de la mezcla de reacción con acetato de etilo en presencia de sulfato sódico como agente de fuerza iónica, para convertirla a 2-bromopropionamida (2-BPA), más estable (Andrawes *et al.*, 1987; Arikawa & Shiga 1980; Castle *et al.*, 1991; Castle, 1993; EPA 1996; Nemoto *et al.*, 2002; Takata & Okamoto, 1991; Takatsuki *et al.*, 2003).

5.1.2.1 Validación del sistema

Una vez probadas las condiciones del método, se inyectó la solución bromada para detectar el pico del 2,3-DBPA. Mediante la curva de calibración externa se determinó la linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación (Tabla 5.1), dentro de los criterios de validación de métodos fisicoquímicos propuestos por la Secretaría de Salud en México (2011).

Tabla 5.1. Criterios de aceptación y resultados obtenidos en la validación de la determinación de acrilamida por curva externa.

Parámetros de Validación	Criterios de aceptación	Resultados
Linealidad	$r \geq 0,995$	Logró un coeficiente de correlación de 0,9963, por lo tanto, se cumple con este parámetro.
Precisión	$\%CV \leq 20\%$	Obtuvo 1,96 %, por lo tanto, cumple con el parámetro.
Límite de detección	10 ppb	Se obtuvo un límite de detección de 2 ppb. Cumple con el límite de detección.
Límite de cuantificación	10 ppb	Se obtuvo un límite de cuantificación de 5 ppb. Cumple con el límite de cuantificación.

Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (Secretaría de Salud, 2011).

5.1.2.2 Optimización del equipo

La optimización del cromatógrafo de gases con captura de electrones para determinar la curva externa se realizó modificando la metodología propuesta por Zhu *et al.* (2008). Se empleó una columna DB-5MS no polar (15 m \times 0,25 mm id \times 0,50 μ m), nitrógeno como gas portador, y en modo de inyección *splitless*. Por otra parte, se modificó la programación de temperatura inicial que era de 65 °C x min, 15 °C/min/230 °C (5 min) a una de 45 °C/2min/150 °C (6 min), 6 °C/min/270 °C (20 min), logrando confirmar el 2,3-DBPA convertido en 2-BPA, al ser tratado con trietilamina, como se observa en la Figura V.1.

En este estudio se confirmó la identificación del analito por el pico del estándar 2,3-DBPA con el mismo tiempo de retención, a pesar de emplear otra columna y cambiar la programación de temperatura propuesta por Zhu *et al.* (2008) que emplearon una columna polar Supelcowax-10 (polietilenglicol, 30 m \times 0,25 mm id \times 0,25 μ m), mostrando buena retención y respuesta del analito, el cual era identificado con el mismo tiempo de retención que el estándar 2,3-DBPA.

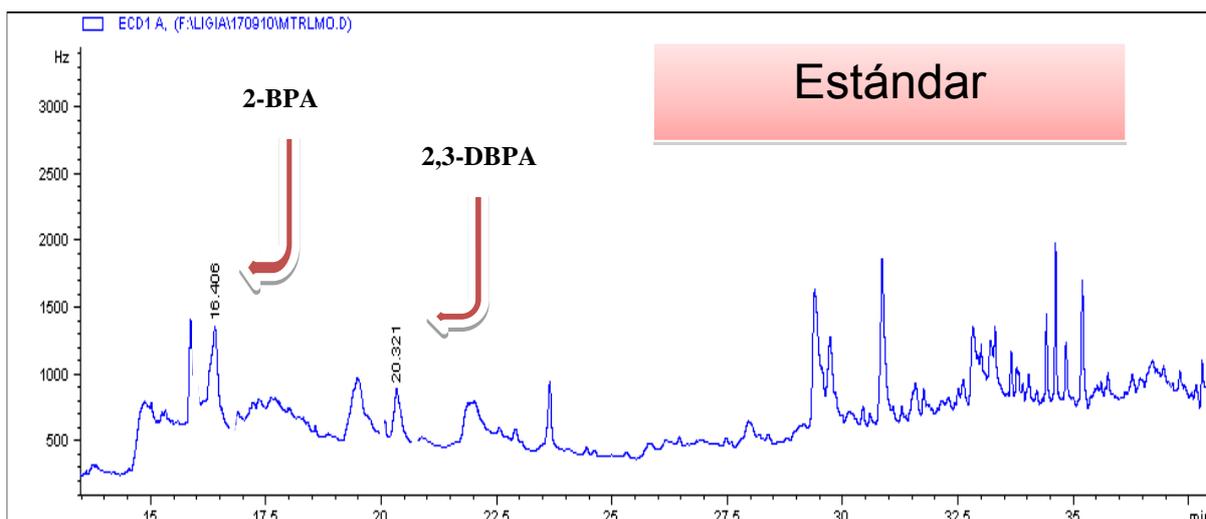


Figura V.1. Derivado dibromado de la acrilamida 2,3-DBPA, y del bromado, 2-BPA, analizado por GC-ECD.

Una vez acondicionada la técnica, se realizaron modificaciones en nuestro estudio, particularmente en relación con el pretratamiento de la muestra de tostadas para la extracción en fase sólida, cuidando sobre todo la limpieza y la adición de trietilamina. Los pasos del pretratamiento de la muestra incluyen la extracción de acrilamida con una solución de cloruro de sodio, eliminación de grasa con hexano y derivatización con bromato de potasio y bromuro de potasio, limpiando con florisil antes del análisis por CG.

No se obtuvo señal del analito en las matrices analizadas. La Figura V.2 muestra una comparación de cromatogramas del analito en la matriz y el estándar, donde se comprueba que no hay presencia de acrilamida en la matriz.

Con el objetivo de verificar los resultados obtenidos y descartar que la extracción de acrilamida fuese incorrecta o ésta estuviese presente en trazas no detectables en las tortillas, hecho poco probable, se hizo una serie de pruebas con adición de patrón interno.

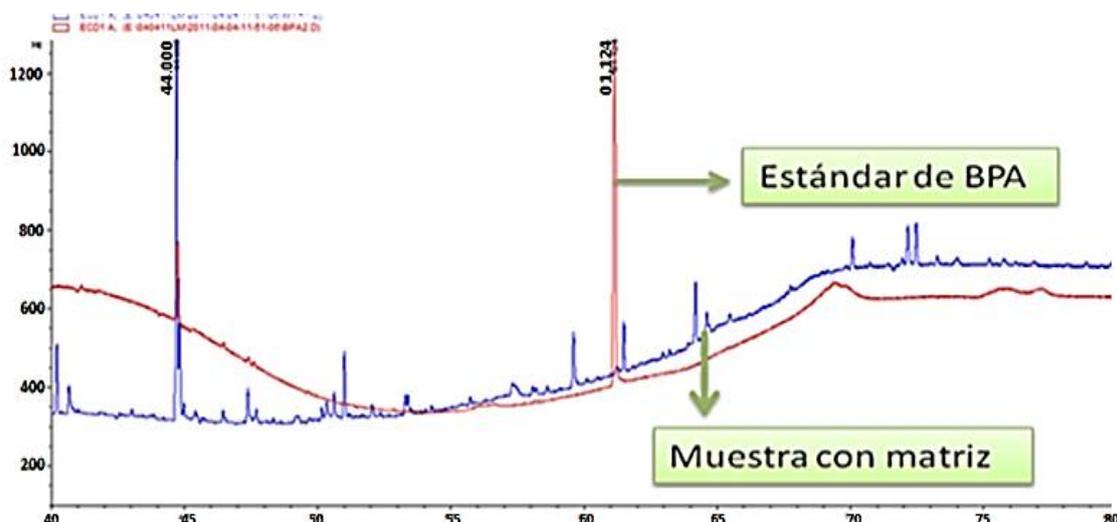


Figura V.2. Cromatograma del estándar de acrilamida a una concentración de 75 ppb y el cromatograma de la muestra de presencia desconocida de acrilamida en tortilla de maíz horneada.

Durante el tratamiento de la muestra para el análisis de acrilamida se homogeneizó, se adicionó el estándar interno (IS) y se llevó a sequedad, realizando las operaciones de extracción, concentración y limpieza. La extracción y limpieza de la muestra fueron pasos críticos para la recuperación, debido a que la acrilamida puede perderse con facilidad si no hay una buena homogeneización (Biedermann *et al.*, 2002; Rufián-Henares & Morales, 2006; Yusa *et al.*, 2006). Finalmente, se confirmó que sí existieron problemas en la recuperación a partir de la matriz ensayada, ya que se obtuvo de 130 a 185% más de la cantidad de analito utilizado. Debido a que las pruebas de recuperación y repetibilidad no fueron satisfactorias, este método no fue considerado idóneo para detectar y cuantificar el contenido de acrilamida en tortillas de maíz tostadas.

En un estudio realizado en China por Geng *et al.* (2011), y trabajando con el método de Zhu *et al.* (2008), en el cual la extracción y derivatización fueron muy similares, con la excepción que la confirmación del analito fue por el 2-BPA en un cromatógrafo de gases utilizando una columna ODS-3 C18 y acoplado a espectrometría de masas-masas, obtuvieron buenos resultados de cuantificación de acrilamida en tortillas de maíz. En nuestro laboratorio no contábamos con un equipo semejante para realizar la confirmación de la acrilamida por GC masas-masas.

5.1.3 Determinación de acrilamida por el método de cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS)

Debido a que con los métodos probados anteriormente no se obtuvieron resultados satisfactorios, se continuó en la búsqueda de otro método analítico capaz de determinar acrilamida en tortillas tostadas con los equipos instrumentales a nuestro alcance. En esta ocasión se testó un método basado en LC-MS/MS (ver sección 4.5.4 de materiales y métodos).

Para la validación del método se siguieron las normas de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011), Normas de Calidad del Laboratorio Central Regional de Monterrey, ubicado en Guadalupe, N. L., y se consideró la Recomendación de la Comisión Europea (2013/647/UE), relativa a la investigación de los niveles de acrilamida en los alimentos.

5.1.4 Desarrollo y validación del método analítico para determinar acrilamida por LC-MS/MS

Para validar el método analítico en nuestro estudio, se tomó como fundamento el método de la Food and Drug Administration (FDA) de los Estados Unidos, al cual se le realizaron ciertas modificaciones en nuestro estudio, utilizando metacrilamida como estándar interno, tal como se menciona en el punto 4.5.4.1 de la metodología

Uno de los ajustes que se tuvo que realizar de esta técnica fue el tratamiento de la muestra utilizando acetonitrilo como solvente en la extracción, utilizándose para la limpieza y purificación de la muestra una mezcla dispersiva descrita en la metodología en el punto 4.5.4.4.2. Se decidió usar el acetonitrilo por ser un compuesto miscible en agua y soluble en disolventes orgánicos.

Con el uso de un estándar interno garantizamos que la cuantificación fuese más precisa, se eliminaron errores en la pérdida de la muestra evaluando porcentaje real de recuperación y su correlación con el estándar interno, mejorando de esta manera la retención de la acrilamida. La mayoría de las

investigaciones publicadas han empleado como estándar interno la $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida (Chih *et al.*, 2009; Douny *et al.*, 2012), mientras que otros han usado D_3 -acrilamida (Delatour *et al.*, 2004; McHale *et al.*, 2009). También hay reportes en los que describen la utilización de $^{13}\text{C}_1$ -acrilamida, *N*, *N*-dimetilacrilamida y metacrilamida (Laso *et al.*, 2015; Becalski *et al.*, 2004; Oracz *et al.*, 2011; Roach *et al.*, 2003; Wenzl *et al.*, 2003; Zhang *et al.*, 2005; Zyzak *et al.*, 2003). En el presente estudio se eligió metacrilamida como patrón interno por tener un comportamiento parecido a la acrilamida (Paleologos & Kontominas, 2005).

La preparación de la muestra se trabajó de acuerdo con lo descrito en el apartado de la metodología.

5.1.5 Técnica LC-MS/MS

5.1.5.1 Condiciones instrumentales

Con el objetivo de obtener una señal sensible y de buena resolución cromatográfica, se procedió a la optimización de las condiciones de detección de los estándares de acrilamida y metacrilamida, tanto instrumentales como experimentales. Los criterios empleados para seleccionar los valores óptimos fueron la resolución, el área de pico y la relación señal/ruido, tomando en cuenta las especificaciones al método definidas por los Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (2011).

5.1.5.2 Optimización de los parámetros del espectrómetro de masas

Para la calibración del equipo se utilizó una conexión en "T" para la introducción del analito junto con el flujo utilizado en la fase móvil, a una velocidad de 20 $\mu\text{L}/\text{min}$. Se adquirió el espectro de masas en modo barrido (*scan*), entre 10 y 100 m/z , estableciendo el ion m/z 71,5 $[\text{M}+\text{H}]^+$, como precursor de los iones 27,1; 44,05 y 55,0. La acrilamida fue detectada en modo ionización positivo (ES+). Una vez establecido el ion precursor, se obtuvo el voltaje del cono de 20 V.

5.1.5.3 Optimización de las transiciones de fragmentación y de las energías de colisión

Después de aislar el ion precursor, se trabajó con las mejores transiciones en modo monitoreo de reacciones múltiples (MRM). Las transiciones de ion padre a ion acrilamida y metacrilamida fueron seleccionadas en función de los resultados obtenidos durante las pruebas y los voltajes óptimos para la mayor respuesta. Éstas fueron m/z 71,5 > 27,1, 71,5 > 44,05, 71,5 > 55 para la acrilamida y m/z 85,45 > 58,1 para el patrón interno de metacrilamida. La energía de colisión fue optimizada para cada transición MRM.

Estos resultados evidencian que los criterios para confirmar las condiciones instrumentales fueron precisos por detectar el ion más característico de acrilamida, y al trabajar en modo MRM se obtuvo mayor selectividad (Zhang *et al.*, 2005).

Algunos autores (Ahn *et al.*, 2002; Becalski *et al.*, 2003; Özer *et al.*, 2012) sugieren vigilar la transición para la cuantificación y las transiciones de m/z 72, 55, 54, 44, y 27 para confirmar la identidad de acrilamida, así como observar los criterios sugeridos por la FDA (2002) para el análisis de alimentos. Sin embargo, otros investigadores han utilizado la energía de colisiones optimizando las transiciones m/z 72 > 55, 72 > 54, 72 > 44, donde el valor óptimo seleccionado fue 75 > 58, ya que el reactivo que emplearon fue $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida (McHale *et al.*, 2009; Karaseca *et al.*, 2009; Peter *et al.*, 2004; Wei *et al.*, 2009). Comparado con otras investigaciones, como las de Bermudo *et al.* (2008) y Therry *et al.* (2004), el valor óptimo fue de 72 > 55, al igual que en la presente investigación, donde el reactivo fue acrilamida pura.

5.1.5.4 Optimización de la separación cromatográfica

Se emplearon las columnas disponibles en el laboratorio para compuestos polares, utilizando una Waters Acquity UPLC BEH C_{18} (100 mm × 2,1 mm id × 1,7 μm) obteniéndose una buena resolución del pico cromatográfico, al igual que la mayoría de los métodos de separación cromatográfica descritos en los estudios recientes donde se usaron columnas inversas diseñadas para analitos altamente polares (Douny *et al.*, 2012;

Soares, 2010; Alves *et al.*, 2010), aunque algunos grupos de investigación han optado por un relleno de carbono grafitico poroso (Wenzl *et al.*, 2003).

5.1.5.5 Optimización de la fase móvil

La separación cromatográfica se llevó en modo isocrático empleando las fases móviles A: agua + 0,1% ácido fórmico (97,5%) y B: metanol + 0,1% ácido fórmico (2,5%). Estas condiciones se definieron después de varias pruebas de disolución de acrilamida en diferentes concentraciones de ácido fórmico. Se mantuvo un flujo constante de 0,2 mL/min durante todo el desarrollo cromatográfico.

En cuanto a la fase móvil, Wang *et al.* (2013) emplearon el modo isocrático con 3 fases de disolución, y mostraron que las mezclas de 10% (v/v) de acetonitrilo a 0,40 mL/min, 15% (v/v) de acetonitrilo a 0,40 mL/min y 10% (v/v) de acetonitrilo a 0,50 mL/min dieron buena señal de picos del estándar de acrilamida para una concentración de 10 ng/L. Por otra parte, Abdalla *et al.* (2014) usaron 4,0% (v/v) de acetonitrilo/agua y metanol/agua 15:85 (v/v) como fase móvil, obteniendo buena señal de pico en una concentración de 66 ng/L, así como un porcentaje favorable de recobro utilizando el acetonitrilo. Algunos autores, como Cavalli *et al.* (2003) y Xu *et al.* (2012), indican que este solvente facilita la optimización, permite reducir el tiempo de ciclo cromatográfico y evita interferencias con componentes de la matriz. En nuestro estudio, sin embargo, se empleó en su lugar el ácido fórmico como fase móvil, con lo que logramos una buena señal de picos, se evitaron interferencias en la matriz de estudio y se obtuvieron buenos recobros.

5.1.5.6 Optimización del tiempo de retención

Para determinar el tiempo de retención se inyectaron diferentes concentraciones de acrilamida y metacrilamida, definiendo 1,38 min para acrilamida con un ciclo total cromatográfico de 10 min. En la Figura V.3 se observa el tiempo de retención y la altura de pico obtenidos para las diferentes concentraciones de acrilamida (1, 5, 10 y 20 ppb). El tiempo de retención de la metacrilamida fue de 1,45 min para una concentración de 50 ppb.

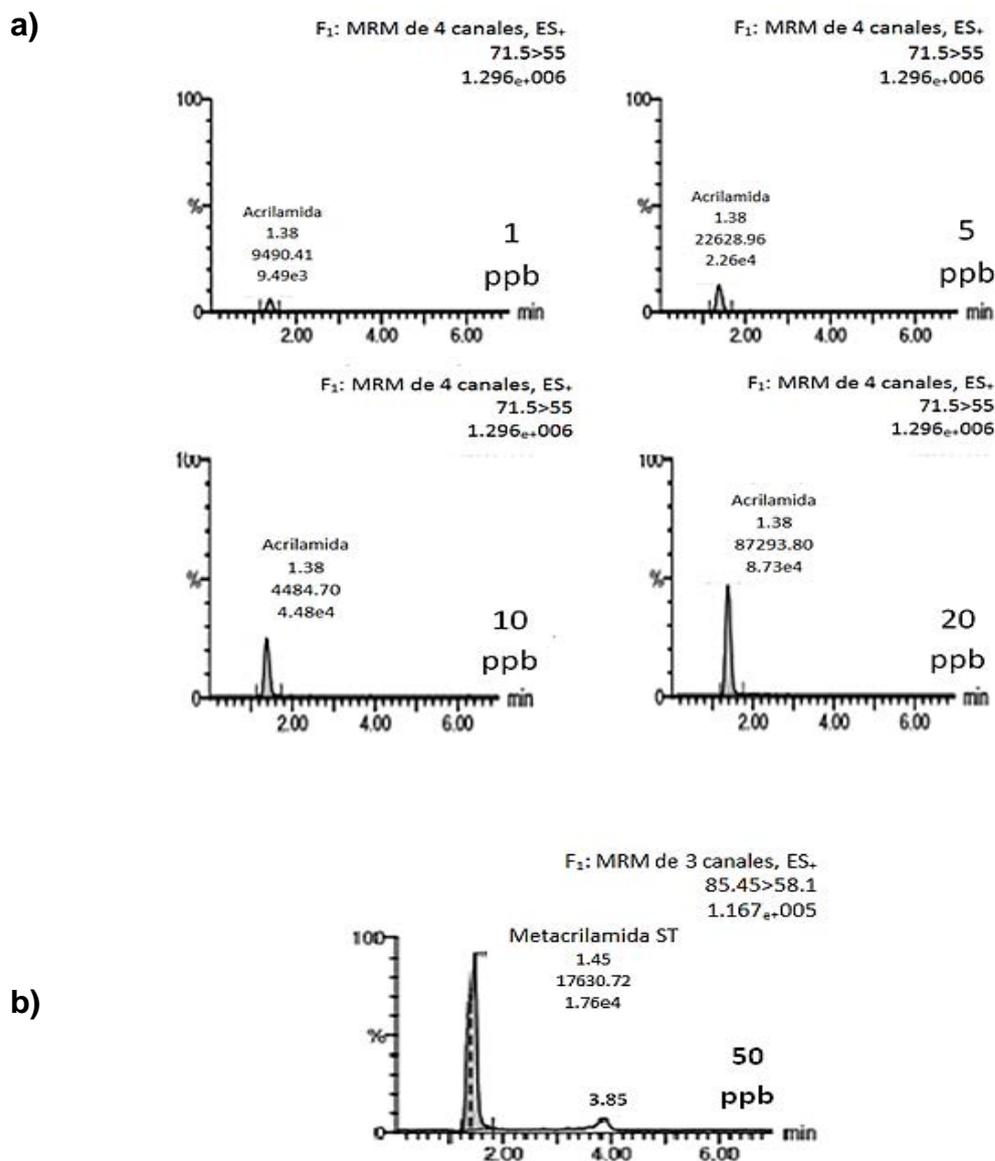


Figura V.3. a) Cromatogramas (LC-MS/MS) de la inyección de la acrilamida a diferentes concentraciones (1, 5, 10 y 20, ppb); **b)** Cromatograma de la inyección de la de metacrilamida a concentración de 50 ppb.

En el estudio de Paleologos & Kontominas (2005) el tiempo de retención fue de 1 a 3 min diferente a los obtenidos por nosotros, lo podría ser debido a que ellos trabajaron con diferente columna. Sin embargo, el tiempo de retención obtenido está dentro del intervalo que definieron. Otros investigadores, por ejemplo Taubert *et al.* (2004), también han utilizado la metacrilamina como estándar interno, sin embargo ellos no reportan tiempo de retención.

El tiempo de retención de la acrilamida y el tiempo total del ciclo cromatográfico difieren a los mostrados en los estudios realizados por Hoenicke *et al.* (2004), Karaseca *et al.* (2009), Mastovska *et al.* (2006) y Yusa *et al.* (2006), debido a que ellos emplearon diferentes columnas y fases móviles.

5.1.5.7 Optimización de las condiciones de separación cromatográfica

En cuanto a las condiciones óptimas para la separación cromatográfica se tuvieron en cuenta ciertos parámetros, entre ellos la composición de fase móvil y flujo señalado en la Tabla 5.2, donde se describen los parámetros utilizados y los ajustes del equipo de LC-MS/MS para el análisis de acrilamida. Estos parámetros dependen del equipo, asimismo, la columna es importante para el éxito del análisis (Andrzejewski *et al.*, 2004; Granby & Fagt, 2004; Hoenicke *et al.*, 2004; Shih *et al.*, 2004).

Tabla 5.2. Valores óptimos para la separación cromatográfica LC-MS/MS.

Columna	Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μ m, 2,1 mm \times 100 mm)
Temperatura columna	30 °C
Volumen de inyección	10 μ L
Composición Fase móvil	A: Agua + 0,1% ácido fórmico (97,5%). B: Metanol + 0,1% ácido fórmico (2,5%)
Flujo	0,2 mL/min
Tiempo del ciclo cromatográfico	10 min

5.1.5.8 Optimización del proceso de extracción

Durante la extracción se debe tener extremo cuidado en la preparación de la muestra, de lo contrario puede haber una diferencia significativa en el valor del resultado final o perderse con facilidad el analito de estudio (Biedermann *et al.*, 2002; Delatour *et al.*, 2004; Rufián *et al.*, 2006; Yusa *et al.*, 2006). Por esto, durante el proceso de extracción se realizaron ensayos de recuperación a diferentes niveles de concentración de acrilamida, de acuerdo con el método descrito en el punto de metodología en 4.5.4.6 de preparación de la muestra, y estos resultados se muestran en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Porcentaje de recuperación de acrilamida.

	Concentración $\mu\text{g}/\text{kg}$	% de recuperación
Solución de trabajo 1 de acrilamida	50	100,7
	20	101,1
	10	99,4

(n = 3)

Estas medidas nos permitieron conocer la cantidad de acrilamida recuperada en las concentraciones analizadas y, de esta forma, evaluar la buena eficiencia de la extracción y del proceso de preparación.

5.1.6 Validación del sistema

En la Tabla 5.4 se detallan los resultados satisfactorios para la validación del sistema, con acrilamida pura en un equipo de LC-MS/MS. Se evaluaron los parámetros de linealidad, precisión, repetibilidad y límite de detección.

En cuanto a la validación, se obtuvieron resultados de exactitud similares a los estudios reportados por otros autores: Abdalla *et al.* (2014), 93 - 99%; Hoenicke *et al.* (2004), 80-110%; Mastovska *et al.* (2006), 88 - 113%; Taubert

et al. (2004), 94 - 108 % y Wang *et al.* (2013), 89 - 103%. El valor de parámetro de exactitud obtenido se enmarca en los criterios de validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (2011).

Tabla 5.4. Criterios de aceptación y valores obtenidos en la validación del sistema LC-MS/MS.

Parámetros validados	Criterios de aceptación ¹	Resultados
Linealidad	$r \geq 0,999$	Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,999, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Precisión	$\% CV \leq 20\%$	Se obtuvo un CV de 4,04 %, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Exactitud	60 a 120 %	Se obtuvo % de recobro mínimo de 96,68%, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Límite de detección	10 ppb	Se obtuvo un límite de detección de 3 ppb, considerando que el LD obtenido es mejor que el criterio recomendado debido a la sensibilidad del equipo empleado.
Límite de cuantificación	10 ppb	Se obtuvo un límite de cuantificación de 8 ppb, considerando que el LC obtenido es mejor que el criterio recomendado debido a la sensibilidad del equipo.
Coeficiente de correlación (r)		$r = 0,999$
Intersección al eje (b)		0,018
Pendiente (m)		-0,729

¹Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011).

En cuanto al límite de detección, el valor obtenido de 3 ppb concuerda con los reportados por estos autores, que obtuvieron valores desde 2 a 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$, utilizando diversos estándares internos: ($^{13}\text{C}_3$) acrilamida, ($^2\text{H}_3$) acrilamida o metacrilamida. El valor del límite de cuantificación fue de 8 ppb y está dentro de los valores que estos investigadores reportaron (de 2 a 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

Por tanto, nuestro método analítico propuesto cumple con los parámetros de validación, es sensible, preciso y confiable, y se puede aplicar para analizar acrilamida en diferentes productos alimenticios.

5.1.7 Validación del método

5.1.7.1 Curva de calibración de acrilamida

La curva de calibración se realizó utilizando adición de estándar, con la finalidad de comprobar la señal de acrilamida en una concentración conocida para el análisis y determinar las respuestas tanto de esta sustancia como del estándar interno, calculando el coeficiente de las dos respuestas.

En el estudio realizado por Douny *et al.* (2012) se compararon los resultados de una curva de calibración realizada con estándares puros de acrilamida y los de una curva de calibración en una muestra de papa cruda enriquecida con estándar en las mismas concentraciones. Ambas curvas coincidieron en los valores obtenidos, demostrando que no hay diferencia significativa entre una curva de calibración realizada con o sin matriz para su validación.

En el presente trabajo se prepararon seis niveles de concentración de estándares de acrilamida, tal como se señaló en el método, y se empleó un patrón interno, tanto para las muestras como para los estándares. Las curvas de calibración se construyeron sobre la base de la relación de las áreas del ion m/z 71,5 derivado de la acrilamida y de iones de m/z 85,45 derivados del patrón interno. Los coeficientes de correlación obtenidos fueron por lo general mayores de 0,999.

5.1.8 Linealidad

El método mostró una respuesta lineal de la acrilamida en el intervalo de concentraciones de 10 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con coeficientes de correlación y determinación de $r = 0,9997$. La Figura V.4 muestra una curva de calibración de acrilamida.

Compound name: Acrilamida COMP3
 Correlation coefficient: $r = 0.999746$, $r^2 = 0.999492$
 Calibration curve: $1.57959 * x + 21.7799$
 Response type: Internal Std (Ref 5), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

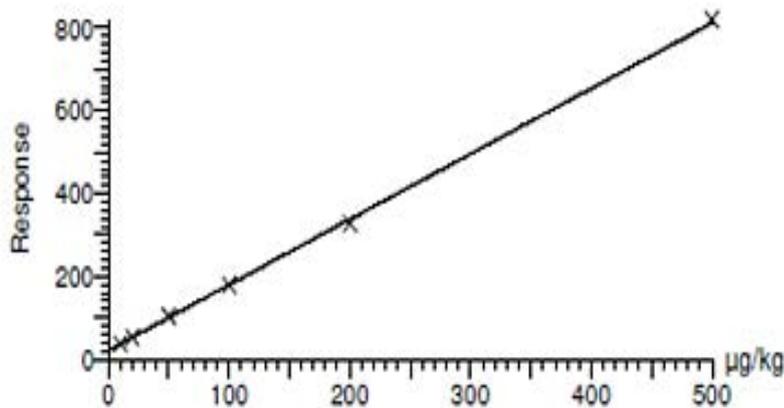


Figura V.4. Curva de calibración de acrilamida en concentraciones de 10 a 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ por LC-MS/MS.

5.1.9 Precisión

Se realizó de acuerdo a los parámetros establecidos por el laboratorio Central Regional de Monterrey. Se calculó la precisión intradía (repetibilidad) y la precisión interdía (reproducibilidad). Presentando valores dentro del rango, con un coeficiente de variación de 5,45% lo que nos indica que el método es preciso.

5.1.10 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)

El límite de detección (LD) se determinó en función de la señal/ruido de la acrilamida el cual debe ser igual a 3.

El límite de cuantificación (LC) se determinó en función de la señal/ruido de la acrilamida el cual debe ser igual o mayor a 10.

5.1.11 Recobro de extracción

Para determinar la eficiencia de la extracción de la acrilamida se determinó el recobro (R%), comparándose el área del pico cromatográfico obtenida de la inyección y matriz de 19 muestras blanco, fortificadas con acrilamida a concentración de 100 µg/kg. Se inyectaron en 3 días diferentes y se calculó el porcentaje de recobro de acrilamida adicionada, con una exactitud del método de 101,32%.

Tabla 5.5. Criterios de aceptación y valores obtenidos en la validación del método LC-MS/MS.

Parámetros validados	Criterios de aceptación ¹	Resultados
Linealidad	$r \geq 0,999$	Se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,9997, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Precisión	$\% CV \leq 20\%$	Se obtuvo un CV de 5,45%, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Exactitud	60 a 120 %	Se obtuvo porcentaje de recobro de 101,32%, por lo tanto, cumple con este parámetro.
Límite de detección	10 ppb	Se obtuvo un límite de detección de 3 ppb validado. Cumple con el límite de detección.
Límite de cuantificación	10 ppb	Se obtuvo un límite de cuantificación de 10 ppb validado. Cumple con el límite de cuantificación.

¹Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (2011).

La Tabla 5.5 muestra los resultados de linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y cuantificación del método LC-MS/MS, los cuales cumplieron con los Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011).

Existen diversos estudios que describen métodos de GC-MS y LC-MS/MS para la determinación de acrilamida como seguros, útiles y aprobados para la cuantificación de esta sustancia (Zhang *et al.*, 2005, 2009; Wenzl *et al.*, 2003, 2007). Sin embargo, la OMS y la FAO, aconsejan más estudios de investigación en la aplicabilidad de estos métodos cromatográficos en las diferentes matrices alimentarias, emplear técnicas de detección de espectrometría de masas y tener mayor incidencia en repetibilidad, sensibilidad y precisión de los métodos desarrollados.

5.1.12 Aplicación del método en muestras comerciales

Una vez validado el método analítico, éste se aplicó para el análisis de acrilamida en muestras comerciales de tortillas de maíz horneadas y fritas compradas en diferentes supermercados del área metropolitana de Monterrey. Todas las muestras fueron analizadas por triplicado.

En cada secuencia analítica, las muestras fueron inyectadas después de correr la curva de calibración, el blanco de reactivo y el blanco de muestra. Asimismo, cada tres días se realizó el análisis de recobro, el cual se consideró satisfactorio para un intervalo comprendido entre 60 y 120%, para cumplir de este modo con los Criterios para Residuos y Contaminantes de Alimentos y Agua establecidos en la Guía de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para la Validación de Métodos Fisicoquímicos de la Secretaría de Salud de México (2011).

Se han realizado una serie de investigaciones en matrices diferentes, como papas fritas, cereales, panes y galletas, entre otros (Acar, 2010; Anese, 2010; Mastovska & Lehotay, 2006; Masson *et al.*, 2007; Capei, 2015). La Tabla 5.6 muestra los resultados que se obtuvieron por técnicas basadas en LC-MS/MS, resultados que se pueden comparar a los que logramos en la validación del método empleado en nuestro estudio como comentaremos a continuación.

Tabla 5.6. Análisis de acrilamida en diferentes matrices alimenticias por el método de LC-MS/MS.

Autor	Concentración de trabajo	CV (%)	Muestra	Recobros (%)	Límite de detección	Límite de cuantificación	Estándar interno	Matriz	Concentración de acrilamida (µg/kg)
Roach <i>et al.</i> 2003	8 - 3,6 µg/kg	10	1 g	92	4 µg/kg	8 µg/kg	200 µg/kg ¹³ C ₃ acrilamida	Pan	65
Kim <i>et al.</i> 2007	10 - 500 µg/kg	9	10 g	99,3	NE	2 µg/kg	2000 ng ¹³ C ₃ acrilamida	Pan	33
Gheng <i>et al.</i> 2009	5 - 500 ng/mL	6,3	1g	113	3 µg/kg	NE	1 µg/mL ¹³ C ₃ acrilamida	Pan	3 - 297 Depende del tipo de pan
Cheng <i>et al.</i> 2009	100 a 500 µg/kg Enriquecida con 10 mg/kg de solución de AA	Menos de 10 %	1 g	86 a 113	3 a 20 µg/kg	0,242 - 1,6 mg/kg	¹³ C ₃ -acrilamida	Pan	< 3 – 12 µg/kg
Burlacu <i>et al.</i> 2009	NE	NE	NE	NE	NE	0,242 - 1,6 mg/kg	< 10 µg/kg	Pan tostado	NE
Rufián <i>et al.</i> 2009	NE	NE	1 g	NE	NE	30 µg/kg	(¹³ C ₃) acrilamida	Pan y galletas	NE

Tabla 5.6. (Continuación)

Autor	Concentración de trabajo	CV (%)	Muestra	Recobros (%)	Límite de detección	Límite de cuantificación	Estándar interno	Matriz	Concentración de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Taubert <i>et al.</i> 2004	30 $\mu\text{g}/\text{kg}$ - 100 mg/kg	NE	NE	91,6-108,4	1 ng/mL	3 ng/mL	Metacrilamida	Papas fritas	20 mg/kg
Rufián <i>et al.</i> 2006	25-1000 $\mu\text{g}/\text{L}$	NE	1 g	98	23, $\mu\text{g}/\text{kg}$	91,8 $\mu\text{g}/\text{kg}$	$(^{13}\text{C}_3)$ Acrilamida Carrez II	Papas	25-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Senyuva & Gokmen 2006	100-1000 ng/g	NE	1 g	92 - 101	2 ng/g	6 ng/g	(1,0 mg/mL) ^{13}C acrilamida	Papas fritas Papas y galletas	250 and 1000 ng/g
Tateo <i>et al.</i> 2010	10-2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	5,8	1,5 g	90,7 - 96,3	6 $\mu\text{g}/\text{kg}$	18 $\mu\text{g}/\text{kg}$	$^{13}\text{C}_3$ acrilamida	Papas fritas	27 -1400
Jackson 2010	50 - 200 ng/mL	5	1 g	116	5 ng/mL	10 ng/mL	500 ng/mL $^{13}\text{C}_3$ -acrilamida	Papas fritas	NE
Douny <i>et al.</i> 2012	0-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$	NE	1 g	NE	25 $\mu\text{g}/\text{kg}$	50 $\mu\text{g}/\text{kg}$	125 $\mu\text{g}/\text{kg}$ $^{13}\text{C}_3$ acrilamida	Papas crudas	1,409 - 2311
Chen <i>et al.</i> 2012	20-200 $\mu\text{g}/\text{L}$	3,5	2 g	91-97	2,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$	NE	NE	Papas fritas	58,40 - 4126,26

Tabla 5.6. (Continuación)

Autor	Concentración de trabajo	CV (%)	Muestra	Recobros (%)	Límite de detección	Límite de cuantificación	Estándar interno	Matriz	Concentración de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
Roach <i>et al.</i> 2003	NE	10%	1 g	92	<10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 ppb	2000 ng $^{13}\text{C}_3$ acrilamida	Galleta salada	13 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Delatour <i>et al.</i> 2004	10 - 2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10	2 g	95	3 $\mu\text{g}/\text{kg}$	10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	d3-acrilamida	chocolate en polvo soluble	2500 $\mu\text{g}/\text{kg}$
Hoenicke <i>et al.</i> 2004	NE	NE	NE	80 - 110	<10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	< 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$	($^2\text{H}_3$) Acrilamida	NE	NE
Zhang <i>et al.</i> 2005	5 – 200 ng/mL	NE	NE	87 - 96	NE	1 $\mu\text{g}/\text{kg}$	($^{13}\text{C}_3$) acrilamida	Alimentos infantiles a base de cereales	NE
Dunovská <i>et al.</i> 2006	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(D_3) acrilamida	NE	NE
Aguas <i>et al.</i> 2006	4,0 – 2000 $\mu\text{g}/\text{L}$	NE	NE	95 - 105	1,5	9,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	($^{13}\text{C}_3$) acrilamida	Café, cocoa	NE
Yusa <i>et al.</i> 2006	1 – 2000 ng/mL	NE	NE	93 - 101	NE	5 $\mu\text{g}/\text{kg}$	($^{13}\text{C}_3$) acrilamida	Alimentos a base de cereales	NE
Mastovska <i>et al.</i> 2006	10 - 2000 ng/g (2,5 - 200 ng/mL en MeCN)	6,6	1g	88 - 113	2 $\mu\text{g}/\text{kg}$	< 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$	500 ng/g (d-3 acrilamida)	Cereal	NE

Tabla 5.6. (Continuación)

Autor	Concentración de trabajo	CV (%)	Muestra	Recobros (%)	Límite de detección	Límite de cuantificación	Estándar interno	Matriz	Concentración de acrilamida (µg/kg)
Kim <i>et al.</i> 2007	1 - 500 µg	9	10 g	97 -102	1 µg/kg	2 µg/kg	(¹³ C3) acrilamida	Alimentos procesados	10 - 500 µg/kg
Liu <i>et al.</i> 2008	NE	NE	NE	NE	1 ng/mL	5 ng/mL	(¹³ C3) acrilamida	NE	NE
Acar & Gokmen 2009	NE	NE	NE	NE	NE	NE	(¹³ C3) acrilamida	NE	NE
Yang <i>et al.</i> 2012	NE	NE	NE	NE	5 mg/L	15 mg/L	[13C3]-AA	NE	NE
Mojska <i>et al.</i> 2012	10 - 1500 µg/L	< 6	2,4 g	94,4	NE	10 µg/kg	200 µg/L AA-d ₃ deuterado	Cereales para bebé	148
Ozer <i>et al.</i> 2012	5 - 200 µg/g	20	1 g	91 - 97	3 ng/g	5 ng/g	NE	Postres turcos	25 - 154 µg/kg
Yang <i>et al.</i> 2012	NE	NE	NE	NE	0,3 µg/kg	1,2 µg/kg	[13C3]-AA	Dieta	NE
Wang <i>et al.</i> 2013	50 - 2000 µg/L	NE	1g	89 - 103	8,0 µg/kg	25 µg/kg	Carrez I, II a 50 µL	Alimentos al horno y fritos	86,3 – 151 µg/kg
Abdalla <i>et al.</i> 2014	NE	NE	NE	93 - 99	10 µg/kg	20 µg/kg	NE	Puré de papas Café y cereales	145 µg/kg

NE: No se Encontró

Para la confirmación de la acrilamida se utilizó el ion $71,5 > 27,1$ para metacrilamida y el ion $85,45 > 58,1$. Las intensidades de los iones detectados correspondieron a los utilizados, tanto para patrón de estándar de calibración, como para muestras enriquecidas, en concentraciones comparables y medidas en las mismas condiciones.

Por su parte, la evaluación de la linealidad del método se realizó a través de una curva de calibración de estándares de acrilamida a niveles de concentración entre 10 y 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$, encontrándose una buena correlación entre el área y la concentración ($r > 0,9997$). Otros autores (Tabla 5.6) trabajando a diferentes concentraciones y empleando diferente estándar interno obtuvieron $r > 0,999$. Los niveles de concentración pueden variar debido a la sensibilidad y selectividad del equipo, así como las concentraciones esperadas de acrilamida en las muestras (Anese, 2010; Burlacu *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2005; Naushad & Khan, 2014; Soares, 2006; Wang *et al.*, 2013).

En cuanto a la precisión y exactitud del método, se evaluaron con muestras de tortillas de maíz tostadas horneas y fritas, adicionadas con acrilamida. El porcentaje de recuperación obtenido fue de 101% y la desviación estándar relativa (%DER) del 5,4%, resultados que están dentro de los parámetros aceptados por los criterios para validación de métodos (Tabla 5.5) y son muy similares a los mostrados en otros estudios (Tabla 5.6). Asimismo, éstos confirman el grado de concordancia entre los resultados de las pruebas individuales cuando se aplica el método repetidamente a múltiples muestreos de una muestra homogénea.

Los límites de detección y de cuantificación, por otro lado, fueron de 3 y 10 ppb, respectivamente, similares a los mostrados en otros estudios (Tabla 5.6).

5.2 Niveles de acrilamida en diferentes tipos de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas.

El maíz en México es consumido principalmente en tortillas, consideradas un producto básico en la dieta mexicana. Acompañan la mayoría de los platillos, ya que se recomiendan por su aporte de nutrientes esencial para una dieta equilibrada; muchas veces, la propia tortilla sirve de plato o

cuchara al momento de comer. Su elaboración se puede clasificar de acuerdo al maíz utilizado, proceso, cocción, tamaño y forma.

Para la clasificación de las tostadas de maíz en este estudio se tomó como referencia la Norma Oficial Mexicana, NOM-187-SSA1/SCFI-2002. “Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan. Especificaciones sanitarias. Información comercial. Métodos de prueba”.

La tortilla es el producto elaborado con masa que puede ser mezclada con ingredientes opcionales y sometida a cocción. Puede consumirse de diferentes formas, una de ellas son las tostadas, elaboradas a partir de tortillas o masa, sometidas a un proceso de horneado, freído, deshidratado u otro, hasta obtener una consistencia rígida y crujiente.

Las tostadas se pueden clasificar en horneadas y fritas, a su vez, pueden variar en tamaño. En la Tabla 5.7 se muestran los tipos de tostadas, diámetro y proceso de elaboración (temperatura y tiempo de tratamiento) de las muestras analizadas.

Tabla 5.7. Parámetros de evaluación de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas.

Tipos de tostadas	n	Diámetro (cm)	Temperatura (°C)	Tiempo (s)
Frita grande	11	18	165	50
Horneadas	14	13	280	40
Pequeñas, redondas y fritas	16	7	190	60
Tortillas	4	13	160	60

n = número de muestras

La formación y la degradación de la acrilamida en otros compuestos se producen durante el tratamiento a temperaturas elevadas. El contenido de esta sustancia se debe principalmente a una mezcla de reacciones que varían de acuerdo a la composición del alimento, contenido de agua, pH, presencia de inhibidores que compiten con los azúcares reductores y aminoácidos producidos en la reacción de Maillard (Baran Das & Prem 2012; Chen *et al.*, 2012; Gokmen *et al.*, 2008; Serpen & Gokmen, 2009).

Durante el proceso de calentamiento por ebullición no se forma la acrilamida, necesitándose para ello condiciones de temperaturas altas y baja humedad durante la cocción, como sucede al freír, hornear y asar en donde el calentamiento y la deshidratación ocurren simultáneamente (Gökmen *et al.*, 2008).

Se analizaron un total de 45 muestras de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas. La Tabla 5.8 muestra los contenidos de acrilamida encontrados en los diferentes tipos de tostadas. Las concentraciones más bajas correspondieron a las clasificadas en el grupo como pequeñas y redondas y fritas, con un intervalo de concentración de 115,66 a 197,34 µg/kg. El mayor contenido del contaminante se encontró en el grupo de tostadas horneadas, que presentó un intervalo de 154,18-266,53 µg/kg, y una media que superó el valor recomendado por la Unión Europea (UE) en productos de maíz. Este dato podría tener relación con que se someten a condiciones más intensas de temperatura, en comparación al resto de tostadas. Aunque hasta el momento no se han establecido límites de acrilamida en alimentos por parte de organismos internacionales, la UE ha publicado una recomendación (Tabla 1.2) al respecto (2013/647/UE), basada en numerosos estudios realizados por la EFSA entre 2007 y 2012. A partir de esta recomendación podemos decir que los resultados de este trabajo mostraron que los niveles de acrilamida en algunas muestras de tostadas de maíz horneadas y fritas se situaron por encima de los 200 µg/kg recomendados por la EFSA. Por otro lado, estos resultados son muy similares a los obtenidos en otras investigaciones (Tabla 5.6) donde se describieron cantidades comprendidas entre 65 y 297 µg/kg de acrilamida en pan (Gheng *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2007; Ozer *et al.*, 2012; Roach *et al.*, 2003).

En las tortillas de maíz horneadas y fritas existe un intervalo de variación entre los valores mínimo y máximo, debido fundamentalmente a las condiciones del proceso aplicado.

Aunque el análisis cromatográfico de acrilamida mostró valores diferentes para los distintos grupos de tostadas examinadas, el método estadístico aplicado (ANOVA) estableció que las variaciones no fueron

significativas entre los diferentes grupos de tostadas evaluadas ($P = 0,471$). La formación de acrilamida en este tipo de producto depende también de la concentración de proteínas en el maíz; en las variedades rojas o negras, su contenido de antocianinas puede reducirla ligeramente, pero el tiempo de fritura sigue siendo determinante (Arámbula *et al.*, 2016). Según estos autores, las muestras preparadas a partir de harina de maíz amarillo nixtamalizado contienen más acrilamida ($> 600 \mu\text{g}/\text{kg}$) que las de granos de maíz pigmentados. Los resultados podrían ser consecuencia de la composición de aminoácidos de maíz y azúcares reductores (Salazar *et al.*, 2016).

Tabla 5.8. Contenido de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas fritas.

Tipos de tostadas	Número de muestras	Concentración media de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Intervalo ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Desviación estándar
Frita grande	11	196,73	114,26 - 279,19	122,75
Horneada	14	210,36	154,18 - 266,53	97,29
Pequeñas, redondas y fritas	16	156,50	115,66 - 197,34	76,64
Tortillas	4	174,92	45,86 - 303,98	81,11

El caso de las tostadas horneadas con alto contenido de acrilamida, este nivel se puede deber a su riqueza de carbohidratos conjuntamente a que fueron sometidas a una alta temperatura de cocción (Tateo *et al.*, 2010). Si bien este valor supera los límites señalados por la UE en su Recomendación 2013/647/UE en la que se sugiere $200 \mu\text{g}/\text{kg}$ en productos de maíz, este valor está muy por debajo de lo encontrado en tortillas de maíz por Salazar *et al.* (2016) que fue de $> 600 \mu\text{g}/\text{kg}$.

En el caso de las tostadas pequeñas, redondas y fritas, que presentaron menor contenido de acrilamida, algunos estudios mencionan que cuando el calentamiento se aplica en tiempos más cortos, similar al proceso para elaborar

papas fritas en tiritas, se puede reducir la cantidad de acrilamida. La existencia de una zona crítica de temperatura/tiempo de procesamiento produce la disminución de humedad en el producto, y como resultado, la formación de la acrilamida se concentra en la región exterior (Senyuva & Gökmen, 2005). Por otra parte, Bent *et al.* (2012) mencionan que cuanto más grande sea el alimento más tiempo se requiere para dorarlo, formándose así la acrilamida en la parte exterior, más cercana a la superficie caliente.

La pérdida de agua en los alimentos deshidratados representa una gran eliminación de energía durante el calentamiento, por lo tanto, la mayor parte del producto se encuentra a una temperatura más baja que la cocción media. El contenido de humedad determina el estado físico y la movilidad de los componentes químicos en la matriz alimentaria; el agua sólo afecta la ruta química y su mecanismo para la formación de acrilamida (Castle & Eriksson, 2005). Así los valores más elevados de acrilamida encontrados en las tostadas horneadas podrían ser explicados por la pérdida de agua y a que son sometidas a una temperatura constante.

Por otra parte, en el proceso de fritura la temperatura aumenta rápidamente, excediendo el punto de ebullición del agua y del aceite de freír. La transferencia de calor se produce más rápidamente en la superficie que en el resto del producto (debido también a la grasa), razón por la cual el exterior alcanza mayor temperatura y se forma más acrilamida en esa zona (Gökmen *et al.*, 2008).

Gran parte de los estudios realizados en panes y papas obtuvieron resultados sobre el contenido de acrilamida comparables a los de este trabajo, coincidiendo también en que la acrilamida no es una ocurrencia natural en los alimentos, sino que se forma durante el tratamiento térmico a temperaturas por encima de 100 °C (Bent *et al.*, 2012). También se ha demostrado en diferentes estudios que la acrilamida se origina principalmente a partir de la reacción de Maillard de la asparagina y otros aminoácidos con azúcares reductores (Calderón, 2015; Mottram *et al.*, 2002). Por otra parte, algunos trabajos han demostrado que los azúcares (sobre todo la glucosa) podrían jugar un papel importante en la creación del contaminante en algunos alimentos (Koutsidis *et al.*, 2008; Summa *et al.*, 2007).

El conocimiento actual de las diferentes concentraciones de acrilamida encontradas en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas indica que es importante tomar en cuenta el contenido de azúcares reductores, de asparagina, el proceso de preparación y el tipo de maíz (blanco, colorido o amarillo), para la formación de la acrilamida en estos alimentos.

5.3 Ingesta diaria de acrilamida y evaluación del riesgo a su exposición (riesgo carcinogénico).

La acrilamida ha sido clasificada como probable carcinógeno para los humanos (Grupo 2A) por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, 1994). Además, la acrilamida ha mostrado neurotoxicidad en los seres humanos, así como toxicidad reproductiva y genotoxicidad en animales de laboratorio (Friedman, 2003).

El Comité Mixto de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación, y la Organización Mundial de la Salud (FAO/OMS) y Expertos en Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los alimentos se reunió en febrero de 2002 para determinar los riesgos para la salud asociados al consumo de acrilamida en animales. El principal efecto toxicológico que se determinó fue el cáncer, lo que convirtió en una preocupación de salud pública el conocer las concentraciones de ese contaminante en alimentos y su consumo.

Instituciones como la FDA en EE.UU., FAO/OMS, la Comisión Europea, la Oficina Federal de Salud Pública de Suiza, la Agencia Nacional de Alimentos de Suecia, la Autoridad Noruega de Control de Alimentos y el Instituto Federal Alemán para la Evaluación de Riesgos, entre otros, establecieron los alimentos que más contribuyen a la exposición a la acrilamida a nivel mundial: las papas fritas y otros productos a base de este tubérculo, cereales para el desayuno, productos horneados, como panes, galletas, tartas y pasteles, y el café (EFSA 2011, 2012; USFDA 2002 a, b; OMS 2002, 2005).

Los EE.UU. y la Unión Europea han publicado estudios sobre la exposición a acrilamida a través de la dieta, determinando el riesgo por el consumo habitual de alimentos en personas. El patrón de consumo de los alimentos varía entre países, regiones y a nivel local, de acuerdo a las

costumbres culturales, hábitos nutricionales y la forma en que se procesan y preparan los alimentos (Konings *et al.*, 2003; Mills *et al.*, 2008; Powers *et al.*, 2013; Rufian-Henares *et al.*, 2007; Sirot *et al.*, 2012).

El Comité de Expertos de Aditivos Alimentarios (JECFA) de la FAO/OMS evaluó recientemente los datos sobre la ingesta alimentaria de acrilamida de ocho países representativos de todas las regiones, excepto África (JECFA, 2011). Los resultados proporcionados por la última evaluación en la sexagésima cuarta reunión no indicaron cambios significativos a la exposición alimentaria para la población en general, aunque la exposición para algunos subgrupos de la población podría reducirse de manera significativa. La exposición dietética media se estima en 1 µg/kg de peso corporal por día, mientras que la exposición de los consumidores en el alto percentil (95 al 97,5), fue de 4 µg/kg de peso corporal por día. Comparando estas exposiciones con los valores toxicológicos de referencia, indican que los márgenes de exposición de acrilamida son preocupantes para la salud humana.

También en la sexagésima cuarta reunión del JECFA, el Comité observó que el Efecto Adverso No Observado (NOAEL) para acrilamida indujo cambios morfológicos en sistema nervioso desde 0,2 mg/kg de peso corporal por día. No han habido nuevos estudios en animales de laboratorio en los que se observaran efectos neurotóxicos a una dosis por debajo de 0,2 mg/kg de peso corporal por día en los últimos años (JECFA, 2011). Por otra parte, el JECFA propuso dos diferentes BMDL₁₀ (límite inferior de la dosis de referencia para una respuesta de 10%) para acrilamida de 0,31 mg/kg peso corporal por día para la inducción de tumores mamarios en ratas y 0,18 µg día/kg peso corporal por día para los tumores de la glándula de Harder en ratones (JECFA, 2011).

Hasta el momento no existen estudios que refieran al riesgo por ingesta de acrilamida en México, sin embargo, dada la relevancia que tiene el consumo de la tortilla de maíz (de todos los tipos), es necesario conocerlo. De acuerdo a la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición-Nuevo León 2011-2012 (EESN-NL 2011-2012; <http://ensanut.insp.mx/>), la tortilla es uno de los alimentos más consumidos en el estado, con una ingesta de 85% de la población. En este estudio se pretende obtener una estimación de la ingesta diaria de acrilamida en la dieta a partir de tortillas de maíz tostadas, horneadas y fritas. Sin embargo, no se pretende estimar la exposición general a la acrilamida porque

no se han analizado otros alimentos en los que también está presente este contaminante químico, como patatas fritas, cereales de desayuno o café, entre otros.

5.3.1 Estimación de la ingesta diaria de acrilamida por grupos de edad

En la EESN-NL (2011/2012) se estudió el consumo de alimentos de un total de 13409 individuos, de los cuales 1372 pertenecen al grupo de niños de 5 a 11 años, 1319 al grupo de adolescentes de 12 a 19 años y 3125 al grupo de adultos jóvenes de 20 a 39 años y adultos de 40 a 59; el grupo de edad de 60 y más fue de 1474 individuos.

Para el cálculo de ingesta diaria de acrilamida por kilogramo de peso corporal promedio (kg PCP) se aplicó la fórmula descrita en el apartado 4.5.5 para la determinación de la exposición a la acrilamida en la población (Materiales y Métodos), aplicando el consumo promedio de tortilla según grupo de edad, la cantidad promedio de acrilamida de las tortillas, y el peso corporal estándar de cada grupo. El valor de peso corporal por grupo de edad se consideró de acuerdo a la Encuesta Estatal de Salud y Nutrición – N.L. 2011/2012, elaborada por la Secretaría de Salud. En este estudio, como se ha comentado anteriormente, sólo se identifica la estimación de ingesta diaria de acrilamida por consumo de tostada, y se decidió tomar el valor medio de acrilamida perteneciente a las tostadas horneadas (210,36 µg/kg) para el análisis del consumo promedio de acrilamida en los diferentes grupos, por ser el tipo de tostada de mayor preferencia, fácil acceso, disponibilidad, y consumo.

La Tabla 5.9 muestra los valores obtenidos de la ingesta diaria del consumo de tostadas de tortillas de maíz deshidratada por grupo de edad, así como el peso corporal promedio y el consumo de acrilamida por kilogramo de peso por persona.

Tabla 5.9. Valores de ingesta diaria de acrilamida por consumo de tortilla de maíz tostada, deshidratada por grupo de edad y peso corporal promedio.

Grupo Edad (años)	**Consumo promedio de tortillas (g/día)	Consumo promedio de acrilamida (µg)	Peso corporal* 95% (kg)	Consumo promedio acrilamida (µg/kg)	
Menores 5 - 11	27	5,68	28,32 - 29,83	0,19	0,19
Adolescentes 12 - 19	27	5,68	45,49 - 50,19	0,12	0,11
Adultos jóvenes 20 - 39	243	51,12	69,56 - 73	0,73	0,70
Adultos 40 - 59	162	34,08	67,46 -73,21	0,51	0,47
Adultos mayores de 60 y más	54	11,36	61,08 -83,15	0,19	0,14

**EESN-NL (2011/2012), INEGI (2014)

*Intervalo de Confianza de 95%

Los datos de consumo aquí presentados fueron establecidos por la EESN-NL (2011/2012) y reflejan el conjunto de la población de Nuevo León; también son considerados por el Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI) y el sector alimentario en México (2014).

El mayor consumo de acrilamida lo tiene el grupo de adultos jóvenes con 0,73-0,70 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y le sigue el grupo de adultos con 0,51-0,47 $\mu\text{g}/\text{kg}$, después el grupo de menores con 0,19 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y el grupo de adultos mayores que fue de 0,19-0,14 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y finalmente el grupo de adolescentes con 0,11- 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$.

La exposición a la acrilamida por el consumo de tostadas de tortilla de maíz es más alta en los adultos jóvenes, ya que consumen más este producto en comparación a los adultos y adultos de más de 60 años que, con un peso corporal medio muy similar, tienen un consumo promedio de acrilamida mucho menor. Después le siguen el grupo de menores en los que disminuye el peso y consumo, y así su ingestión en acrilamida, y finalmente en el grupo de adolescentes donde mantiene un consumo moderado de tortilla igual que el grupo de menores, pero aumenta su peso, por lo que disminuye aún más el consumo de acrilamida por kilogramo de peso corporal.

Actualmente no hay niveles de acrilamida regulados como seguros. Los estudios muestran diferencias considerables entre los países europeos debido a los patrones de consumo propios de cada país, tradiciones culinarias y la ingesta de acuerdo a sus hábitos alimenticios.

Los estudios realizados por Cengiz & Gündüz (2013), Claeys *et al.* (2016), Delgado *et al.* (2016) y Dybing *et al.* (2005) muestran los niveles de exposición a la acrilamida en algunos países (Tablas 5.10 y 5.11). En estos trabajos se han utilizado los indicadores de edad, total de consumo de alimentos en un día o tiempo de consumo de los alimentos, lo cual dificulta la comparación, ya que los valores reportados varían de un país a otro.

De los resultados que hemos obtenido queda claro que el consumo de tostadas y el contenido de acrilamida determinado da un valor de ingesta de acrilamida elevado para este tipo de producto, ya que al sumarle el consumo de otros alimentos donde se genera acrilamida, como el pan y otros cereales,

patatas, café, etc. durante un día de consumo alimentario, resulta en una exposición alta para la población en general.

Sin embargo, comparando con diversos estudios realizados en diferentes países podemos decir que en Brasil la exposición en adolescentes de 11 a 17 años es similar a la exposición que encontramos en nuestro estudio en adolescentes de 12 a 19 años que es de 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal por día. Sin embargo, la exposición de los adolescentes de nuestro estudio es menor al valor expuesto por EFSA que es de 0,43 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por día (Tabla 5.10).

Tabla 5.10. Niveles de exposición de acrilamida en algunos países.

País	Edad (años)	Exposición media de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso/día)
FAO/OMS	Población general	0,2 - 1
EFSA	1 - 3	1,2 - 2,4
	3 - 10	0,7 - 2,05
	11 - 17	0,43 - 1,4
	> 18	0,31 - 1,1
Países bajos	1 - 97	0,48
	7 - 18	0,71
Países bajos	1 - 6	1,04
	1 - 97	0,5
Suecia	1 - 6	1,1
	6 meses	0,04
Noruega	7 - 12 meses	0,5
	6 meses (niñas)	0,31
	6 meses (niños)	0,29
	12 meses (niñas)	0,36
Brasil	12 meses (niños)	0,33
	11 - 17	0,12
Francia	> 15	0,5
	2 - 14	1,4
Polonia	1 - 96	0,43
	1 - 6	0,75
	7 - 18	0,62
Polonia	6 - 12 meses	2,10 - 4,32
	19 - 96	0 - 33
Alemania	< 1	0,16 - 0,98
	1 - 7	0,19 - 1,79
	7 - 9	0,12 - 1,60

Cengiz & Gündüz (2013).

En los estudios de consumo de acrilamida por la población belga en los años 2008-2013, los adultos presentaron una exposición media de 0,33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por día (Tabla 5.11), valor inferior a lo encontrado en nuestro estudio en adultos de 40 a 59 años que fue 0,51 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por día. En cambio los adolescentes de la población belga presentaron un valor de consumo de acrilamida de 0,48 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso y día, lo cual es muy superior al consumo de los adolescentes de nuestro estudio que fue de 0,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso por día. Sin embargo, de nuevo tenemos que hacer hincapié que los resultados del estudio presente se deben exclusivamente a tortillas de maíz, y se debe tener en consideración otros alimentos como los cereales y patatas que presentan un consumo elevado por este tipo de población.

De los datos obtenidos, podemos observar que quienes se encuentran en mayor riesgo por los niveles de consumo de acrilamida estimados son los grupos de adultos jóvenes y adultos, ya que dentro de sus hábitos alimenticios es común el alto consumo de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, sobre todo por la facilidad para obtenerlas en cada comida que realizan fuera de casa. Los otros grupos disminuyen el riesgo, ya que, en general, el consumo de alimentos lo realizan en casa; se refleja un cambio en la dieta tradicional por grupo de edad, y en el grupo de adultos mayores el consumo de tostada de tortilla de maíz disminuye.

Tabla 5.11. Consumo de acrilamida de la población belga ($\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso corporal al día).

	Media	P50	P75	P90	P95	P97,5	P99	P99,9
2008-2013								
Niños	0,72 (0,56-0,85)*	0,39 (0,34-0,47)	0,85 (0,69-1,02)	1,68 (1,35-2,03)	2,42 (1,97-2,99)	3,21 (2,56-4,12)	4,53 (3,35-6,81)	9,03 (5,08-18,21)
Adolescentes	0,48 (0,42-0,56)	0,27 (0,23-0,32)	0,59 (0,51-0,69)	1,11 (0,94-1,33)	1,58 (1,31-1,91)	2,09 (1,72-2,69)	2,86 (2,17-4,17)	5,36 (3,16-12,22)
Adultos	0,33 (0,29-0,39)	0,19 (0,17-0,21)	0,40 (0,35-0,46)	0,76 (0,65-0,90)	1,08 (0,09-1,31)	1,47 (1,19-1,86)	2,02 (1,56-3,01)	3,88 (2,25-13,55)
2002-2007								
Niños	0,87 (0,74-1,03)	0,53 (0,45-0,62)	1,04 (0,89-1,25)	1,90 (1,56-2,34)	2,73 (2,14-3,51)	3,70 (2,79-4,99)	5,21 (3,58-7,56)	9,76 (5,41-23,44)
Adolescentes	0,64 (0,55-0,76)	0,37 (0,31-0,44)	0,78 (0,65-0,93)	1,47 (1,24-1,77)	2,12 (1,73-2,60)	2,86 (2,22-3,71)	3,93 (2,91-5,54)	7,39 (4,41-17,87)
Adultos	0,35 (0,31-0,42)	0,20 (0,17-0,22)	0,42 (0,36-0,49)	0,81 (0,67-0,97)	1,16 (0,96-1,44)	1,57 (1,26-2,01)	2,17 (1,62-3,17)	4,01 (2,49-14,88)

*Valor medio (extremo menor-extremo mayor)
Claeys *et al.* (2016).

5.3.2 Evaluación del riesgo a la exposición dietética de acrilamida

En la Tabla 5.12 se muestra la estimación del consumo promedio de acrilamida, tomando como base las tostadas deshidratadas (210,36 μg), para conocer si existe el riesgo de generar tumor mamario y tumor de la glándula de Harder, según grupo de población y la dosis de referencia (BMDL₁₀) de exposición de acrilamida propuesta en 2011 por la JECFA para estos procesos tumorales y para problemas neurotóxicos: 0,31 mg/kg PCP/día para la inducción de tumores mamarios, 0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PCP/día para tumores de la glándula de Harder en ratones, y de 0,2 mg/kg PCP/día para problemas neurotóxicos (Gao *et al.*, 2016).

Tabla 5.12. Estimación de la exposición dietética media (MOE) del consumo de tostadas de tortilla de maíz deshidratadas para generar diferentes tumores de acuerdo a las dosis de referencias $\mu\text{g}/\text{kg}$ PCP/día.

Grupo Edad (años)	Consumo promedio Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$ PCP/día)	Tumores mamarios BMDL ₁₀ (0,31 mg/kg PCP/día)	Tumores Harder (0,18 $\mu\text{g}/\text{kg}$ PCP/día)	Tumores NOAEL (0,2 mg/kg PCP/día)
Menores 5-11	0,19	Sin riesgo	Sin riesgo	Sin riesgo
Adolescentes 12-19	0,12 - 0,11	Sin riesgo	Sin riesgo	Sin riesgo
Adultos jóvenes 20-39	0,73 - 0,70	Sin riesgo	Con riesgo	Sin riesgo
Adultos 40-59	0,51 - 0,47	Sin riesgo	Con riesgo	Sin riesgo
Adultos mayores 60 y más	0,19 - 0,14	Sin riesgo	Sin riesgo	Sin riesgo

Los diferentes cálculos de exposición dietética de acrilamida por consumo de tortillas en relación a los valores de BMBL₁₀ establecidos muestran que parte de la población está expuesta a desarrollar algún tipo de tumor.

Debido a las metodologías y los datos utilizados en los diferentes estudios no puede considerarse la estimación de riesgo a tumores mamarios solo con el indicador del consumo de un alimento para una población determinada, además existe gran diferencia entre los estudios realizados con animales y los realizados con humanos, sobre todo por el metabolismo y biomarcadores validados (Ping *et al.*, 2013). Sin embargo, en nuestro estudio existe el riesgo para la población de adultos jóvenes y adultos para desarrollar tumores de Harder.

Es necesario realizar estudios de cuantificación en otros alimentos donde hay formación de acrilamida para así tener la exposición total de acrilamida de la población. Al no contar con estudios en otros países sobre el consumo de acrilamida en tortillas de maíz tostadas, horneadas y fritas nos imposibilita hacer comparaciones. Sin embargo, consideramos que los resultados obtenidos en nuestro estudio es una aportación para conocer el riesgo que corre la población de Monterrey del estado de Nuevo León y, por ende, la población mexicana, debido a que las tortillas de maíz son la dieta base de este país.

VI. CONCLUSIONES

Los estudios sobre los métodos utilizados para la determinación y cuantificación de acrilamida en alimentos presentan complicaciones en la preparación de la muestra antes del análisis en la mayoría de los casos, no existiendo un método analítico específico para cada tipo de alimento, por lo que se debe hacer de acuerdo a la matriz de estudio.

En la presente investigación se experimentaron varias técnicas y métodos para determinar cuál era el más adecuado para cuantificar la acrilamida en tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas, tomando en cuenta la disponibilidad de los equipos y materiales de los laboratorios en donde se trabajó.

El método de cromatografía de gases-masas (GC-MS) propuesto por Tateo & Bononi (2003), utilizado directamente y con un solo solvente, no es un método recomendable para el análisis de acrilamida, ya que no logra identificar el ion de acrilamida, en las condiciones ensayadas, por ser una molécula compleja de bajo peso molecular. Sucede lo mismo empleando el método propuesto por Lagalante & Felter (2004), en el que se utilizó el N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) como agente derivatizante, aun cuando este reactivo logra la derivatización y sililación de acrilamida formando N,O-bis (trimetilsilil) acrilamida (BTMSA).

En cuanto a la aplicación del método de cromatografía de gases con captura de electrones (GC-ECD) para la identificación y cuantificación de acrilamida, propuesto por Zhu *et al.* (2008), empleando bromato y bromuro de potasio como reactivos para la derivatización de acrilamida, tampoco se logró la identificación del analito, en las condiciones ensayadas. Además, se observó que la extracción y derivatización son pasos críticos en la preparación de la muestra, aparte de ser largo, tedioso, tóxico y costoso.

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos por el método de LC-MS/MS de la *Food and Drug Administration* (FDA), se puede concluir que se ha realizado la puesta a punto y validación de un procedimiento analítico para la determinación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz mediante LC-MS/MS

según las normas de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud en México (2011), en colaboración con el Laboratorio Central Regional de Monterrey, Guadalupe, N. L.

El método para la determinación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz se realizó en dos etapas: extracción y limpieza. En la primera etapa, se optimizaron las condiciones de separación para acrilamida, incluyendo muestra de tostada y fortificado con solución de trabajo, metacrilamida y acetonitrilo. Para la etapa de limpieza se utilizó una mezcla dispersante y después se pasó al análisis de LC-MS/MS, utilizando una columna Waters Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 2,1 mm \times 100 mm), a una temperatura 30 °C, 2,5% metanol/97,5% de 0,1 % de ácido fórmico, velocidad de flujo de 0,2 ml/min, volumen de inyección de 10 μl , tiempo de análisis de 7 min, espectrometría de masas ionización positiva con inyección de flujo, y temperatura de gas a 350 °C. Se logró desarrollar un método preciso y exacto capaz de demostrar la presencia y cuantificación de acrilamida a niveles bajos en tostadas de tortillas de maíz. Este método se ha validado evaluando la linealidad en un intervalo de concentraciones de 0,5 a 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$, y se ha obtenido coeficientes de correlaciones mayores a 0,996. La exactitud expresada como porcentaje de error presenta valores de 1,96%. El límite de detección es de 3 ppb, el límite de cuantificación de 10 ppb, y se ha obtenido una recuperación de 101%.

Hasta el momento no existen estudios específicos sobre la exposición de acrilamida a través de la dieta en México enfocados a la tostada de tortilla de maíz, alimento de alto consumo en el estado de Nuevo León.

De las 45 muestras comerciales de analizadas, el 38% de las muestras de tostadas de tortillas de maíz horneadas y fritas analizadas reportaron concentraciones de acrilamida por encima de los 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ recomendados por la Unión Europea (UE) (2013/647/UE), basados en estudios realizados por la EFSA 2007 y 2012.

Conclusiones

La contribución del consumo de tostadas de tortillas de maíz a la ingesta diaria de acrilamida en la dieta de la población de Monterrey (Nuevo León, México) se estimó con el promedio de acrilamida de las tostadas de tortillas de maíz horneadas (210,36 µg/kg), la cantidad de ingesta de tortillas por grupo de edad y el peso corporal estándar de cada grupo. En el grupo de menores (5-11 años) el valor estimado de ingesta de acrilamida es de 0,19 µg/kg, en adolescentes (12-19 años) es de 0,11-0,12 µg/kg, en adultos jóvenes (20-39 años) es de 0,70-0,73 µg/kg, para adultos (40-59 años) es de 0,47- 0,51 µg/kg y en adultos mayores (60 + años) es de 0,14-0,19 µg/kg.

De acuerdo con la estimación realizada y comparado con el BMDL₁₀ de 0,31 mg/kg de peso corporal/día para la inducción de tumores mamarios en ratas hembra y de 0,2 mg/kg para procesos neurotóxicos, los niveles de consumo de acrilamida a partir de tostadas de tortilla de maíz horneada y frita en la población de Monterrey son bajos en toda la población. Sin embargo, si consideramos los valores de esta estimación por edad y la comparamos con el BMDL₁₀ de 0,18 µg/kg de peso corporal/día para la inducción de tumores de la glándula de Harder, las poblaciones de adultos jóvenes con una exposición de acrilamida de 0,70-0,73 µg/kg, de adultos (0,51-0,47 µg/kg) y adultos mayores (0,19 µg/kg), son poblaciones con riesgo de padecer este tipo de tumores.

Estos resultados de índice de riesgo según grupos de edad pone de manifiesto las dificultades inherentes al establecimiento de consumo máximo de alimentos con contenido de acrilamida, teniendo en cuenta los distintos patrones dietéticos de los diversos países, los aspectos tecnológicos y de mercado implicados, por lo cual es necesario realizar un control exhaustivo en todos los alimentos ricos en carbohidratos sometidos al proceso de cocción por encima de 120 °C a fin de disminuir la presencia de acrilamida en dichos alimentos y conocer la ingesta total de acrilamida.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdalla, A., Elbashir, A., Oliver, J., & Schmitz, C. (2014). Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, (44), 107-141.
- Acar O.C. & Gokmen V. (2010). A new approach to evaluate the risk arising from acrylamide formation in cookies during baking: Total risk calculation. *Journal of Food Engineering*, (100), 642-648.
- Acar, O.C. & Gokmen, V. (2009). Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Molecular Nutrition and Food Research*, (53), 1521-1525.
- AECOSAN. (2016). *Seguridad Alimentaria*. Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición. Recuperado de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/detalle/contaminantes.htm
- Aguas, P., Fitzhenry, M., Giannikopoulos, G. & Varelis, P. (2006). Analysis of Acrylamide in Coffee and Cocoa by Isotope Dilution Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, (385), 1526-1531.
- Ahn, J., Castle, L., Clarke, D., Lloyd, A., Philo, M. & Speck, D. (2002). Verification of the Findings of Acrylamide in Heated Foods. *Food Additives and Contaminants*, (19), 1116-1124.
- Ahrné, L., Andersson, C. G., Floberg, P., Rosén, J. & Lingnert, H. (2007). Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. *LWT- Food Science and Technology*, (40), 1708-1715.
- Almeida, D. H. & Rooney, W. L. (1996). Avances en la manufactura y calidad de productos de maíz nixtamalizado. *Excelencia en calidad de tortillas y botanas de maíz y trigo. Asociación Americana de Soya. United Soybean Board. México*. 14-19.
- Almeida, D., H. D., Cepeda, M. & Rooney, L. W. (1996). Properties of comercial nixtamalized corn flours. *Cereal Food World*, (41), 624-630.
- Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernández, J. & Oliveira, M. (2010). Acrylamide in espresso coffee: influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemical*, 119, 929-934.

- Amrein, T., Lukac, H., Andres, L., Perren, R., Escher, F. & Amado, R. (2005). Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (53), 7819-7825.
- Andrawes, F., Greenhouse, S. & Draney, D. (1987). Chemistry of acrylamide bromination for trace analysis by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, (399), 269-275.
- Andrzejewski, D., Roach, J., Gay, M. & Musser, S. (2004). Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LCMS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 1996-2002.
- Anese, M., Suman, M. & Nicoli, M. (2010). Acrylamide removal from heated foods. *Food Chemistry*, (119), 791-794.
- Anthony, F. & Lagalante, M. (2004). Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12), 3744-3748.
- Arikawa, A. & Shiga, M. (1980). Determination of trace acrylamide in the crops by gas chromatography. *Bunseki Kagaku*, 29 (7), T33-T39.
- Arribas, G. (2013). *Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos*. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de química analítica de la Facultad de Ciencias Químicas. Madrid. España.
- Backe, W. J., Yingling, V. & Johnson, T. (2014). The determination of acrylamide in environmental and drinking waters by large-volume injection-hydrophilic-interaction liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, (1334), 72-78.
- Badui, S. (2013). *Química de los alimentos (5ta. Ed.)*. México, D.F., México: Pearson.
- Bagdonite, K., Derler, K. & Murkovic, M. (2008). Determination of acrylamide during roasting of coffee. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 6081-6086.
- Baran, A. & Prakas, P. (2012). Acrylamide in snack foods. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 22 (3), 163-169.

- Barlow, S. & Kroes, R. (2009). *Threshold of Toxicological Concern (TTC) – A tool for assessing substances of unknown toxicity present at low levels in the diet*. Brussels: International Life Sciences Institute.
- Barutcu, I., Sahin, S. & Sumnu, G. (2009). Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *Food Science and Technology*, 42, 17-22.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S. & Sun, W. (2005). Determination of acrylamide in Various Food Matrices. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 271-284.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis D., Seaman, S.W. & Sun W. F. (2005) Determination of acrylamide in various food matrices. *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 271-283.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D., Seaman, S.W., Hayward, S., Sahagian, M. & Leclerc, Y. (2004). Acrylamide in French Fries: influence of free amino acids and sugars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (12), 3801-3806.
- Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D. & Seaman, S. (2003). Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 802-808.
- Bello, J. (2000). *Ciencia Bromatológica: Principios Generales de Los Alimentos (1ra. Ed.)*. Madrid, España, España: Ediciones Díaz de Santos.
- Bent, G., Maragh, P. & Dasgupta, T. (2012). Acrylamide in Caribbean foods-residual levels and their relation to reducing sugar and asparagine content. *Food Research International*, (133), 451-457.
- Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L. & Galceran, M. T. (2008). Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products. *Talanta*, 76 (2), 389-394.
- Bermudo, E., Nuñez, O., Puignou, L. & Galceran, M. (2006). Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1120 (1), 199-204.
- Biedermann, M. & Grob, K. (2003). Model studies on acrylamide formation in potato, wheat, flour and corn starch; ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, (94), 406-422.

- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A. & Grob, K. (2002). Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, 93 (6), 653-667.
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P. & Mandli, H. (2002). Two GC-MS, Methods for the analysis of acrylamide in foodstuffs. *Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene*, (93), 638-652.
- Brandl, F., Demiani, S., Ewender, J., Franza, R., Gmeiner, M. & Gruber, L. (2002). A rapid and convenient procedure for the determination of acrylamide in foodstuffs. *Electronic Journal of Environmental. Agricultural and Food Chemistry*, (1), 137-144.
- Breathen, E. & Knutsen, S. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry*, (92), 693-700.
- Bull, R., Robinson, M. & Stober, J. (1984). Carcinogenic activity of acrylamide in the skin and lung of Swiss-ICR mice. *Cancer Letter*, (24), 209-212.
- Burlacu, I., Sahin, S. & Sumnu, G. (2009). Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *Food Science and Technology*, (42), 17-22.
- Burley, V., Greenwood, D., Hepsworth, S., Fraser, L., de Kok, T. & Va Breda, S. (2010). Dietary acrylamide intake and risk of breast cancer in the UK women's cohort. *British Journal of Cancer*, 103, 1749-175. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2994225>.
- Busk L. (2010). Acrylamide-A case study on risk analysis. *Food Control*, 21 (12), 1677-1682.
- Calderón, J. (2015). *A revision on acrylamide aspects: formation, quantification, mitigation and future considerations*. Corporación Universitaria Lasallista, 10, 100-105.
- Capei, R., Pettini, L., Nostro, A. L., & Pesavento, G. (2015). Occurrence of acrylamide in breakfast cereals and biscuits available in Italy. *Journal Of Preventive Medicine and Hygiene*, 56 (4), 190.
- Castle, L. & Eriksson, S. (2005). Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC International*, (88), 274-284.

- Castle, L., Campos, M. J. & Gilbert, J. (1991). Determination of acrylamide monomer in hydroponically grown tomato fruits by capillary gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (54), 549–555.
- Castle, L. (1993). Determination of acrylamide monomer in mushrooms grown on polycrylamide gel. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (41), 1261-1263.
- Cavalli, S., Maurer, R. & Hofler, F. (2003). Fast determination of acrylamide in food samples using accelerated solvent extraction followed by ion chromatography with UV or MS Detection. *LCGC Europe*, (16), 9-11.
- Cavalli, S., Polesello, S. & Sacconi, G. (2004). Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, (1039), 155-159.
- Cengiz, F. M. & Gunduz, C.P.B. (2013). Acrylamide exposure among Turkish toddlers from selected cereal-based. *Food and Chemical Toxicology*, (60), 514–519.
- Center for Food Safety and Applied Nutrition-Food Safety Modernization. (2002). Exploratory data on acrylamide in foods. Recuperado de www.cfsan.fda.gov/dms/acrydata.html.
- CFSAN/FDA. (2002). *Exploratory data on acrylamide in foods*. Obtenido de <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrydata.html>
- Chen, M., Hsu, H. & Lin, W. (2012). A statistical regression model for the estimation of acrylamide concentrations in French fries for excess lifetime cancer risk assessment. *Food and Chemical Toxicology*, (50), 3867-3876.
- Cheng, K., Shi, J., Ou, S., Wang, M. & Jiang, Y. (2009). Effects of fruit extracts on the formation of acrylamide in model reactions and fried potato crisps. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, (58), 309-312.
- Cheng Chih, W., Kao Min, Y., Shih Chih, D. Y., Chou Shou, S., & Yeh, A. (2009). Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17 (3), 190-197.
- Cheng, W., Hsiao, S., Chou, S., Hwang, L., Lu, T. & Yeh, A. (2006). Determination of acrylamide in Chinese foods by GC-Ion trap MS using 2-

- Bromopropenamide and 2-Bromopropenamide-13C3. *Journal of Food and Drug Analysis*, (14), 207-214.
- Cheong, K., Eun, H. & Hyong, L. (2007). An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. *Food Chemistry*, (101), 401-409.
- Chih, W., Min, Y., Chih, D., Shou, S., & Yeh, A. (2009). Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 17 (3), 190-197.
- Claeys, W.L. (2010). Assessment of the acrylamide intake of the Belgian population and the effect of mitigation strategies. *Food Additives and Contaminants- Part A Chemistry, Analysis, Control, Expo Risk Assessment*, 27 (9), 1199-207.
- Claeys, W., De Meulenaer, B., Huyghebaert, A., Scippo, M., Hotet, P. & Matthys, C. (2016). Reassessment of the acrylamide risk: Belgium as a case-study. *Food Control*, (59), 628-635.
- Claeys, W. L., DeVleeschouwer, K. & Hendrickx, M. E. (2005). Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (53), 9999-10005.
- Claus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: review. *Journal of Cereal Science*, (47), 118-133.
- Comisión Europea. (2013). *Recomendación de la comisión (8 Nov de 2013) relativa a investigación sobre las investigaciones sobre los niveles de acrilamida en los alimentos, 2013/647/EU*. Diario Oficial de la Unión Europea, 2013, L 301/15.
- Comisión Europea. (2010). *Recomendación de la Comisión (2 de junio de 2010) relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos, 2010/307/UE*. Diario Oficial de la Unión Europea, 2010, L137/4.
- Comisión Europea. (2005). *Directorate General Joint Research Centre, Institute for Reference Materials and Measurements*. Recuperado de <http://www.irmm.jrc.be>.
- Comisión Europea. (2002). *Commission decision implementing council directive 96/23/EC, concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results*. Brussels: European Commission.

- Contreras, M. D. L. A., & Flores, M. I. (2014). *Cuantificación de aminoácidos esenciales en tortilla nixtamalizada de maíz (Zea Mays) Germinado*. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. México.
- Costa, L., Deng, H. & Gregotti, C. (1992). Comparative studies on the neuro and reproductive toxicity of acrylamide and its epoxide metabolite glycidamide in the rat. *Neurotoxicology*, (13), 219-224.
- Croft, M., Tong, P., Fuentes, D. & Hambridge, T. (2004). Australian survey of acrylamide in carbohydrate-base foods. *Food Additives and Contaminants*, 21 (8), 721-736.
- Cruz, E., & Verdalet, I. (2007). Tortillas de maíz: una tradición muy nutritiva. *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la UV*, 20 (3).
- Cuevas, D., Moreno, C., Martínez, E., Moreno, E. & Méndez, A. (2010). Nutrition and texture evaluation of maize-white common bean nixtamalized tortillas. *Revista Interciencia*, (35), 11.
- Daza, B. Y. (2013). *Historia del proceso de mestizaje alimentario entre España y Colombia*. Doctoral dissertation, Universitat de Barcelona.
- Dearfield, K., Abernathy, C., Ottley, M., Brantner, J. & Hayes, P. (1988). Acrylamide: Its metabolism, developmental and reproductive effects, genotoxicity, and carcinogenicity. *Mutation Research*, (195), 45-77.
- Dearfield, K., Douglas, G., Ehling, U., Moore, M., Segal, G. & Brusick, D. (1995). Acrylamide: A review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutation Research*, (330), 71-99.
- Delatour, T., Périsset, A., Goldmann, T., Riedeker, S. & Stadler, R. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 4625-4631.
- Delgado, R., Arambula, G., Luna, G., Flores, V., Veles, J., Azuara, E. & Salazar, R. (2016). Contenido de acrilamida en frituras de tortilla preparadas a partir de maíces pigmentados. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, (15), 69-79.
- Douny, C., Widart, J., Maghuin-Rogister, G., De Pauw, E. & Scippo, M. (2012). Quantification of acrylamide in various belgian potato products using solid phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *Food and Public Health*, 2 (5), 137-141.

- Dunovská, L., Cajka, T., Hajslová, J. & Holadová, K. (2006). Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography high resolution time of flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta-Journal*, 578 (2), 234-240.
- Dunovska, L., Hajlova, J., Aajka, T., Holadova, K. & Hajkova, K. (2004). Changes of acrylamide levels in food products during technological processing. *Czech Journal of Food Sciences*, (22), 283-286.
- Duque, Z., Arango, L. & Arrubla, J. (2015). *Desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (gc-fid) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos*. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- Dybing, E., Farmer, P. B., Andersen, M., Fennell, T. R., Lalljie, S. P. D., Müller, D. J. G. & Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association*, 43 (3), 365-410.
- E, K. J. (2008). Acrylamide carcinogenicity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 5984-5988.
- EFSA. (2011). Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2009 and exposure assessment. *In Scientific report of EFSA*. Recuperado de <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2133.htm>.
- EFSA. (2012). Scientific Committee on Food. *Acrylamide in food is a public health concern*. Recuperado de <https://www.efsa.europa.eu/en/press/news/150604>.
- EFSA. (2012). *Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010*, (10), 2938–2976.
- EFSA. (2015). Output of the public consultation on the draft EFSA scientific opinion on acrylamide in food. *Panel on Contaminants in the Food Chain*, 3 (6), 4104, 321.
- El-Ziney, M., Al-Turki, A. & Tawfik, M. (2009). Acrylamide status in selected traditional Saudi food and infant milk and food with estimation of daily exposure. *America Journal of food Technology*, (4), 171-191.
- Ellenberg, B. A. (2004). *General and fast methodology for the extraction and GC-MS analysis of acrylamide from carbohydrate-rich food samples*. Application Note 77. Germany: Varian.

- EPA. (1993). *Integrated risk information system (IRIS) on acrylamide*. Cincinnati, OH, USA: US Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development.
- EPA. (1984). *Health and environmental effects profile for acrylamide*. EPA/600/x-85/270. Cincinnati, OH, USA: US Environmental Protection Agency, Environmental Criteria and Assessment Office, Office of Health and Environmental Assessment, Office of Research and Development.
- FAO/OMS. (2002). *Consultation of the health implications of acrylamide in food*. Recuperado de FAO/OMS: <http://www.who.int/fsf/Acrylamide>
- FAO/OMS. (2006). *Evaluation of Certain Contaminants in Food: Sixty-fourth*.
- FAO/OMS. (2011). *Evaluation of Certain Contaminants in Food: Seventy-second*.
- FAO/WHO. (2004). *Discussion paper on acrylamide*. Thirty-sixth session Rotterdam, 22-26.
- FAO/WHO. (2010). *Expert Committee on Food Additives, sixty-fourth meeting, summary and conclusions*. FAO/WHO. Recuperado de <http://www.who.int/ipcs/food/jecfa/summaries/summary>
- Field, E., Price, C., Sleet, R., Marr, M., Schwetz, B. & Morrissey, R. (1990). Developmental toxicity evaluation of acrylamide in rats and mice. *Fundamental and Applied Toxicology*, (14), 502-512.
- Flores, H. D., Jiménez, S. J. & Luna, J. G. (2012). New ecological nixtamalization process for tortilla production and its impact on the chemical properties of whole corn flour and wastewater effluents. *International Journal of Food Science and Technology*, (47), 564-571.
- Freisling, H., Moskal, A., Ferrari, P., Nicolas, G., Knaze, V., Clavel, F. & Grote, V. (2013). Dietary acrylamide intake of adults in the European prospective investigation into cancer and nutrition differs greatly according to geographical region. *European Journal of Nutrition*, 52, 1369-1380.
- Friedman, M. & Levin, C. (2008). Review of methods for the reduction of dietary content and toxicity of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 6113-6140.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 4504-4526.

- Fellows, P. (1998). *Food Processing Technology. Principles And Practice (2da. Edición)*. New York: Woodhead.
- Gao, J., Zhao, Y., Zhu, F., Ma, Y., Miao, H. & Wu, Y. (2016). Dietary exposure of acrylamide from the fifth Chinese total diet study. *Food and Chemical Toxicology*, (87), 97-102.
- García, M., Rodríguez, A. & Ortiz, M. (2014). Análisis de carbohidratos bioactivos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). *Cromatografía y Técnicas Afines*, (35), 47-57.
- García, M., Rodríguez, A. & Ortiz, M. (2014). Análisis de carbohidratos bioactivos mediante cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC). *Cromatografía y Técnicas Afines*, (35), 47-57.
- Garrido, A., Plaza, P. & Martínez, J. (2008). Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: Application to simple and complex food samples. *Journal of Chromatography A*, 229-238.
- Geng, Z., Wang, P. & Liu, A. (2011). Determination of acrylamide in starch-based foods by HPLC with pre-column ultraviolet derivatization. *Journal of Chromatography Science*, (49), 818-824.
- Genga, Z., Jiang, R. & Chen, M. (2008). Determination of acrylamide in starch based foods by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, (21), 178-182.
- Gertz, C. & Klostermann, S. (2002). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, (104), 762-771.
- Gertz, C. & Klostermann, S. (2003). Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *European Journal of Lipid Science and Technology*, (104), 762-771.
- Gimer, K. (2006). *Coordination chemistry of acrylamide and n-pyrazolylpropanamide; syntheses and structures*. Universitat Magdeburg Alemania, 1-22.
- Girma, K.B., Lorenz, V., Blaurock, S. & Edelmann, F.T. (2005) Coordination chemistry of acrylamide. *Coordination Chemistry Reviews*, 249 (11–12), 1283-1293.

- Glaus, A., Carle, R. & Schieber, A. (2005). Acrylamid in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, (47), 118-133.
- Glaus, A., Carle, R. & Schierber, A. (2008). Acrylamid in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*, 118-133.
- Gobierno de España. (2010). Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición. Recuperado de http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/home/aecosan_inicio.htm.
- Godnic, M. (2010). *Acrilamida en los alimentos*. Recuperado de www.nutrinfo.com/pagina/info/graficos/acrila.gif.
- Gokmen, V. (2005). Relation between the acrylamide formation and time - temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*, (77), 972-976.
- Gokmen, V., Palazoglu, T. & Koraya. (2008). Acrylamide formation in foods during thermal processing with a focus on frying. *Food and Bioprocess Technology*, (1), 35-42.
- Gokmen, V., Palazoglu, T. & Senyuva, H. (2006). Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *Journal of Food Engineering*, (77), 972-976.
- Gokmen V., Senyuva H, Z., Acar J. & Sarioglu, K. (2005). Determination of acrylamide in potato chips and crisps by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, (1088), 193-199.
- Government Offices of Sweden. (2015). *Swedish National Food Authority*. Recuperado de <http://www.government.se/government-agencies/swedish-national-food-agency/>
- Granby, K., Pedreschi, F. & Kaack, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT- Food Science and Technology*, (37), 679-685.
- Granados, G. (2007). *Desarrollo y evaluación de un método analítico para la determinación de acrilamida en tortillas tostadas de maíz*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. México.
- Green Facts. (2002). Comité Científico de la Comisión Europea sobre la Alimentación Humana. Recuperado de <http://www.greenfacts.org/es/glosario/def/ec-scf.htm>.

- Grob, K. & Neukom, H. (1985). Method for testing retention gaps and data on the GC retention power of differently deactivated capillary tubes. *Journal of Chromatography*, (323), 237-246.
- Grob, K., Grob, K. & Grob, G. (1978). Preparation of apolar glass capillary columns by the barium carbonate procedure. *Journal of High Resolution Chromatography and Communications*, (1), 149-155.
- Gutiérrez, M. & Droguet, M. (2002). *Identificación de compuestos volátiles por cg-ms*. UPCommons (122). Recuperado de <http://upcommons.upc.edu/bitstream/handle/2099/2733/5CROMGASES.pdf>.
- Hagmar, L., Tornqvist, M., Nordander, C., Rosén, I., Bruze, M., Kautiainen, A. & Axmon, A. (2012). *Ealth effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose*. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), 11. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11560335>
- Hamlet, C., Jayaratne, S. & Sadd, P. (2004). Rapid, sensitive and selective analysis of acrylamide in cereal products using bromination and GC-MS/MS. *Czech Journal of Food Sciences*, (22), 290-293.
- Hashimoto, K., Sakamoto, J. & Tanii, H. (1981). Neurotoxicity of acrylamide and related compounds and their effects on male gonads in mice. *Archives of Toxicology*, (47), 179-189.
- Helen, C. (2004). *Tecnología de alimentos*. Editorial Limusa, 305, 309-311, 324.
- Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W. & Hartig, L. (2004). Analysis of acrylamide in different food stuffs using liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 520, 207-215.
- Hu, Q., Xu, X., Fu, Y. & Li, Y. (2015). Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods. *Food Control*, (56), 135-146.
- Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática (INEGI). (2014). *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2014*. Recuperado de <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/enchogares/regulares/enigh/tradicional/2014/default.html>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). (2014). El sector alimentario en México 2014. *Serie estadísticas sectoriales*, 304. Recuperado de <http://internet.contenidos.inegi.org.mx/contenidos/>

productos/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/nueva_estruc/SAM/702825066574.pdf

Instituto Nacional de Geografía, Estadística e Informática (INEGI). (2010). *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2010*. Recuperado de <http://www.beta.inegi.org.mx/proyectos/enchogares/regulares/enigh/tradicional/2010/>

Instituto Nacional de Salud Pública. (2012). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012*. Recuperado de <http://ensanut.insp.mx/informes/Nuevo Leon-OCT.pdf>

Instituto de Salud Pública Seguridad Alimentaria. (2013). *Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición*, (5), 2-126.

Integrated Risk Information System. (2010). *Environmental Protection Agency*. United States. Recuperado de <http://www.epa.gov/iris/subst/0286.htm>.

Jackson, L. & Al, T. (2010). Processing issues: acrylamide, furan and trans fatty acids. Chapter 23. *Ensuring Global Food Safety*, 383-410.

Jackson, L. & Al T. (2009). Processing issues: acrylamide, furan and trans fatty acids. *Ensuring Global Food Safety: Exploring Global Harmonization*. 384 - 394.

Jackson, L. & Al, T. (2009). Acrylamide, furan and trans fatty acids. *Ensuring Global Food Safety: Exploring Global Harmonization*, 384-394.

Jairo, M. (2008). *La acrilamida en alimentos, un peligro potencial para la salud humana*. IX Congreso Colombiano de Ciencia y tecnología en Alimentos. Acta.

JECFA. (2005). Joint FAO/WHO expert committee on food additives: Sixty-fourth meeting. Recuperado de <http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>

Jezussek, M. & Schieberle, P. (2003). A new LC/MS- method for the quantification of acrylamide based on a stable isolate dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC-MS methods. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (51), 7866-7871.

Jiao, J., Zhang, Y., Ren, Y., Wu, X. & Zhang, Y. (2005). Development of a quantitative method for determination of acrylamide in infant powdered milk and baby foods in jars using isotope dilution liquid chromatography / electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, (1099), 198-202.

- Jiménez, S., Morales, F., Gema, L. & Marti, E. (2007). *Formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de alimentos*. Instituto del Frio Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Madrid, España.
- Johnson, K., Gorzinski, S., Bodner, K., Campbell, R., Wolf, C., Friedman, M. & Mast, R. (1986). Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, (85), 154-168.
- Journal, E. (2015). Scientific opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13, 321.
- Jung, M., Choi, J. & Ju, J. (2003). A novel technique for limitation of acrylamide formation in fries and baked corn crisps and in French fries. *Journal Food Science*, 68 (4), 1287-1290.
- Kaplan, O., Kaya, G., Ozcan, C., Ince, M. & Yaman, M. (2009). Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchem Journal*, 173-179.
- Karaseka, L., Wenzla, T. & Anklam, E. (2009). Determination of acrylamide in roasted chestnuts and chestnut-based foods by isotope dilution HPLC-MS/MS. *Food Chemistry*, (114), 1555-1558.
- Keramant, J., Le Bail, A., Pros, C. & Soltanizadeh, N. (2011). Acrylamide in foods: chemistry and analysis. *Food Bioprocess Technology*, (4), 340-368.
- Khoshnam, F., Zargar, B., Pourrez, N. & Parha, H. (2010). H. acetone extraction and HPLC determination of acrylamide in potato chips. *Journal of the Iranian Chemical Society*, (7), 853-858.
- Kim, S., Hwang, J. & Lee, K. (2011). Analysis of acrylamide using gas chromatography nitrogen phosphorus detector (GC-NPD). *Food Science and Biotechnology*, (20), 835-839.
- Kim, C., Hwang, E. & Lee, H. (2007). An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed food. *Food Chemistry*, (101), 401-409.
- Konings, E., Hogervorst, J., Van, R., Schouten, L., Sizoo, E. & Van, E. (2010). Validation of database on acrylamide for use in epidemiologic studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, (64), 534-540.
- Konings, E., Ashby, P., Hamlet, C. & Thompson, G. (2003). Acrylamide in cereal and cereal products: a review on progress in level reduction. *Food Additives and Contaminants*, 1 (24), 47-59.

- Konings, E., Baars, A., Van Klaveren, J., Spanjer, M., Rensen, P., Hiemstra, M. & Peterse, P. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessments of the consequent risks. *Food Chemistry*, (41), 1569-1579.
- Konings, E., Hogervorst, J., Van, R., Schouten, L., Sizoo, E. & Van, E. (s.f.). Validation of a catabase on acrylamide for use in epidemiologic studies. *European Journal of Clinical Nutrition*, (64), 534-540.
- Kocadagli T. & Gokmen V. (2016). Chapter 6. Metabolism of Acrylamide in Humansand Biomarkers of Exposure to Acrylamide. *Acrylamide in Food. Academi Press*, 109 -128.
- Koutsidis, G., Elmore, J.S., Oruna-Concha, M.J., Campo, M.M., Wood, J.D. & Mottram, D.S. (2008). Water-soluble precursors of beef flavour: I. Effect of diet and breed. *Meat Science*, 79 (1), 124-130.
- Krokida, M., Oreopoulou, V., Maroulis, Z. & Marinos-Kouris, D. (2001). Effect of pre-drying on quality of French fries. *Journal of Food Engineering*, (49), 347-354.
- Küttinga, B., Schettgen, T., Schweglerc, U., Frommec, H., Uterd, W., Angerera J. & Drexlera, H. (2009). Acrylamide as environmental noxious agent a health risk assessment for the general population based on the internal acrylamide burden. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, (212), 470-480.
- Lagalante, F.A., M. A. (2004). Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion-trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 12 (52), 3744-3748.
- Lasekan, O. & Abbas, K. (2010). Analysis of volatile flavour compounds and acrylamide in roasted malaysian tropical almond (*terminalia cat-appa*) nuts using supercritical fluid extraction. *Food Chemistry*, (48), 2212-2216.
- Lasso, J., Pérez, Y., Suárez, F., & Caballero, L. (2015). Determinación de acrilamida en el procesamiento de la panela por cromatografía líquida.(Acrylamide Determintion in the Sugar Cane Juice Process by the Liquid Chromatography Technique.). *Ciencia en Desarrollo*, 5 (2), 99-106.
- Lauren S., J. & Fadwa, A.T. (s.f.). Acrylamide, furan and trans fatty acids. *Ensuring Global Food Safety*, (23), 383-410.

- Lee, M., Chang, L. & Dou, J. (2007). Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analítica Chimica Acta*, 19-23.
- Lema, I. & Zuk, M. (2010). *Introducción al análisis de riesgos ambientales*. México: Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales Instituto Nacional de Ecología.
- Lema, I. & Rojas, L. (2010). *Introducción al análisis de riesgos ambientales*. Universidad Nacional Autónoma de México. Cd. de México, México.
- Leung, K.S., Lin, A., Tsang, C.K. & Yeung, S.T. (2003). Acrylamide in Asian foods in Hong Kong. *Food Additives and Contaminants*, 20, 1105–1113.
- Levine, R. & Ryan, S. (2009). Total Diet and Pesticide Research Center, U.S. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, (57), 6823-6829.
- Lineback, D. R., Coughlin, J. R. & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, (3), 15-35.
- Lineback, D., Wenzl, T., Ostermann, O., De la Calle, B., Anklamm, E. & Taeymans, D. (2005). Overview of acrylamide monitoring databases. *Journal of AOAC International*, (88), 246-252.
- Lingnert, H. & Wailer, G. (1983). Stability of antioxidants formed from histidine and glucose by the Maillard reaction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (31), 27-30.
- Liu, J., Zhao, G., Yuan, Y., Chen, F. & Hu, X. (2008). Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, (108), 760-767.
- Lopachin, R. & Lehning, E. (1994). *Neurotoxicology*, (15). US.
- López, J. (2008). *Estandarización de la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de metilésteres de ácidos*. Repositorio Universidad Tecnológica de Pereira. Recuperado de <http://repositorio.utp.edu.co/dspace/bitstream/handle/11059/1058/66028423L864.pdf;jsessionid=47F24CFEA4D90A8A3C24C60C961AE524?sequence=1>
- Low, M., Koutsidis, G., Parker, J., Elmores, J., Dodson, A. & Mottram, D. (2006). Effect of citric acid and glycine addition on acrylamide and. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54), 5976-5983.

- Luna, M., Ma, H. R., OJ, A., F, C. & Mejia, J. (2012). Perspectiva de desarrollo de la industria semillera de maíz en México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, (35), 1-7.
- Martins, S., Jongen, W. & Van, B. (2001). A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends in Food Science and Technology*, (11), 364-373.
- Masson, L., Muñoz, J., Romero, N., Camilo, C., Encina, C., Hernández, L. & Robert, P. (2007). Acrilamida en patatas fritas. *Grasas y Aceites*, 58 (2), 185-193.
- Mastovska, K. & Lehotay, S. (2006). Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54 (19), 7001-7008.
- Mastovska, K., Hajslova, J. & Lehotay, S. (2004). Ruggedness and other performance characteristics of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in food crops. *Journal of Chromatography*, (1054), 335-349.
- Mastovska, K., Lehotay, S. & Hajslova, J. (2001). Optimization and evaluation of low-pressure gas chromatography-mass spectrometry for the fast analysis of multiple pesticide residues in a food commodity. *Journal of Chromatography*, (926), 291-308.
- Matthaus, B., Haase, N. & Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, (106), 793-801.
- McHale, K. J., Winnik, W., & Paul, G. (2009). Quantitation of acrylamide in food samples on the TSQ Quantum Discovery by LC. APCI-MS/MS. *Thermo Scientific Application Notebook*, (1), 20-22.
- Mc Lafferty, F. & Turecek, F. (1994). Interpretation of mass spectra. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23 (6), 379.
- Medeiros Vinci, R., Mestdagh, F. & De Meulenaer, B. (2012). Acrylamide formation in fried potato products-present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, (133), 1138-1154.
- Medina, V. & Juan, J. (2016). *Caracterización de tostadas elaboradas con maíces pigmentados y diferentes métodos de nixtamalización*. Instituto Politécnico Nacional. Santiago de Querétaro, Querétaro. México.

- Mestdagh, F., De Meulenaer, B., Van Petegham, C., Cromphout, C. & Thas, O. (2004). Towards a better understanding in acrylamide formation, degradation and reduction in model systems (and foodstuffs). *Czech Journal of Food Science*, (22), 11-14.
- Mikulikova, R. & Sobotova, K. (2007). Determination of Acrylamide in Malt with GC/MS. *Acta Chim. Slovenica*, 54, 98-101.
- Millán, L. (2008). FAO/OMS. *Código de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos*. Recuperado de <http://www.elsonido13.com/imprimieart.asp?ig=159>
- Miller, J. & Miller, J. (2002). *Estadísticas y quimiometría para la química analítica*. España: Pearson Prentice Hall.
- Mills, C., Mottaram, D. & Wedzicha, B. (2009). *Process-induced food toxicants: occurrence, formation and health risks*. Washington, D.C.: John Wiley & Sons.
- Mills, C., Tlustos, C., Evans, R. & Matthews, W. (2008). Dietary acrylamide exposure estimates for the United Kingdom and Ireland: comparison between semiprobabilistic and probabilistic exposure models. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 6039-6045.
- Mizukami, Y., Kohata, K., Yamaguchi, Y., Hayashi, N., Sawai, Y., Chuda, Y. & Ohno, H. (2006). Analysis of acrylamide in green tea by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (54), 7370-7377.
- Mlotkiewicz, J. A. (1998). The role of the Maillard reaction in the food Industry. *Royal Society of Chemistry*, 223, 19.
- Mojska, H., Gielecinska, I. & Stos, K. (2012). Determination of acrylamide level in commercial baby foods and an assessment of infant dietary exposure. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 2722-2728.
- Morales, J. & Vélez, J. (2011). Estudio del efecto combinado del secado y freído en las propiedades de tortillas tostadas. *Información Tecnológica*, 22 (2), 55-68.
- Morales, J. & Vázquez, N. (2008). La acrilamida y los alimentos; un binomio no deseable. *Cuadernos de Nutrición*, 31 (6), 215-226.
- Moreno Navarro, I., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A., Cameán Fernández, A., Harridisson de la Torre, A. (2007). La Acrilamida, Contaminante Químico de Procesado. *Toxicología*, 24 (001), 1-9.

- Mothagi, M., Seyedain, A., Honarvar, M., Mehrabani, M. & Baghizadeh, A. (2014). Determination of acrylamide in selected types of Iranian breads by SPME technique. *Journal of Food Technology*, (2), 57-64.
- Mottram, D., Wedzicha, B. & Dodson, A. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard. *Nature*, 419, 448-449.
- Murkovic, M. (2004). Acrylamide in Austrian foods. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, (6), 161-167.
- Namiki, M. (1998). Chemistry of Maillard reactions: recent studies on the browning reaction mechanism and the development of antioxidants and mutagens. *Advances in Food Research*, (32), 115-184.
- Napolitano, A., Morales, F., Sacchi, R. & Fogliano, V. (s.f.). Relationship in Fried crisps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (56), 2034-2040.
- Naushad, M., & Khan, M. (2014). *Ultra performance liquid chromatography mass spectrometry: evaluation and applications in food analysis*. CRC Press.
- Negrete, Y., Rosario, M., Yahuaca, B. & Cortés, J. (2015). *Efecto de la cocción térmico-alcalina sobre la oxidación de los ácidos grasos en la tortilla de maíz XII. Encuentro Participación de la Mujer en la Ciencia*. Recuperado de http://congresos.cio.mx/memorias_congreso_mujer/archivos/extensos/sesion2/S2-BCA22.pdf
- Nemoto, S., Takatsuki, S., Sasaki, K. & Maitini, T. (2002). Determination of acrylamide in foods by GC-MS using ¹³C-Labeled acrylamide as an internal standard. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, (43), 371-376.
- Nielsen, N. J. (2006). A liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous analysis of acrylamide and the precursors, asparagine and reducing sugars in bread". *Analytica Chimica Acta*, 557 (1), 211-220.
- Okitani, A., Cho, R. & Kato, H. (1984). Polymerization of lysozyme and impairment of its amino acid residues caused by reaction with glucose. *Agricultural and Biological Chemistry*, (48), 1801-1808.
- Olguín, L. P. & Rodríguez, H. M. (2004). *Métodos en biotecnología. Cromatografía de gases*. México: Universidad Nacional Autónoma de México, 6-15.
- Olsson, K., Svensson, R. & Roslund, C. (2004). Tuber components affecting acrylamide formation and colour in fried potato: variation by variety, year, storage temperature and storage time. *Journal of the Science of Food Agriculture*, (84), 447-458.

- OMS. (2005). *Total Diet Studies: a Recipe for Safer Food*. Recuperado de http://www.who.int/foodsafety/chem/TDS_recipe_2005_en.pdf
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Kobayashi, H. & Yoshida, M. (2003). Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, (20), 215-220.
- Oracz, J., Nebesny, E. & Zyzelewicz, D. (2011). New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, (86), 23-24.
- Ozer, M., Kola, O., Atlan, A., Duran, H. & Zorlugenc, B. (2012). Acrylamide content of some Turkish traditional desserts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, (10), 74-77.
- Paleologos, E. K. & Kontominas, M. G. (2005). Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1077 (2), 128-135.
- Pascali, J. & Pozzebon, M. (2014). Direct GC determination of acrylamide in water using the agilent 7000B triple quadrupole GC-MS. *Agilent Technologies*, 5991-5297.
- Patnaik, P. (2004). *Dean's Analytical Chemistry Handbook*. USA: Mc Graw Hill.
- Pedreschi, F., Kaack, K. & Granby, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT-Food Science and Technology*, (37), 679-685.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K. & Granby, K. (2005). Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, (38), 1-9.
- Peña, J. (2006). *Efectos de los ciclos de freído en la calidad del aceite de canola utilizado para elaborar totopos de maíz*. Instituto Tecnológico de Sonora.
- Petersson, E. V., Rosén, J., Turner, C., Danielsson, R. & Hellen, K. E. (2006). Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: an optimisation study. *Analytica Chimica Acta*, 557, 287-295.
- Pérez, A.B. (2014). *Sistema Mexicano de Alimentos Equivalentes (4ª Edición)*. México: Fomento de Nutrición y Salud AC.
- Ping, Z., Yun, Z., Hua, L., Yong, M., Xia, L. & Xin, Y. (2013). Dietary exposure of the Chinese population to acrylamid. *Biomedical and Environmental Sciences*, 26 (6), 421-429.

- Pittet, A., Périsset, A. & Oberson, J. (2004). Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography*, (1035), 123-130.
- Plascencia, G. G. (1998). *Comportamiento de maíz pigmentado en la elaboración de frituras, empleando el método de nixtamalización tradicional y harina instantánea preparada por un proceso hidrotérmico*. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Ingeniería Agroindustrial. Chapingo México, 7-22.
- Powers, S., Mottram, D., Curtisc, A. & Halford, N. (2013). Acrylamide concentrations in potato crisps in Europe from 2002 to 2011. *Food Additives and Contaminants*, (30), 1493-1500.
- Retes, R. (2010). Demanda de tortilla de maíz en México, 1996-2008. *Colegio de Posgraduados*, 13-54.
- Riediker S. & Stadler R.H. (2003). Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020, 121-130.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. & Tornqvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (24), 7012-7018.
- Roach, J., Andrzejewski, D., Gay, M., Nortrup, D. & Musser, S. (2003). Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 7547-7554.
- Roach, J., Andrzejewski, D., Gay, M., Nortrup, D. & Musser, S. (2004). Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1996-2002.
- Rodríguez, S. A., Antuna, G., Arámbula, G., Palomo, A., Gutiérrez, E., Espinoza, A. & Andrio, E. (2008). Calidad nixtamalera y tortilla en maíces de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 31 (3), 23-27.
- Rojas, E., Alarcón, A., Galván, P. & Rojo, F. (2004). Optimization of carbohydrate silylation for gas chromatography. *Journal of Chromatography*, (1027), 117-120.
- Rosen & Hellenas, K. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127, 880-882.

- Rossi, J. P. (2007). La combinación de los azúcares con las biomoléculas: desde la cocina al organismo. *Medicina (Buenos Aires)*, 67 (2), 161-166.
- Rufián, J. & Morales, F. (2006). Determination of acrylamide in potato chips by a reversed-phase LC-MS method based on a stable isotope dilution assay. *Food Chemistry*, (97), 555-562.
- Rufian, J., Arribas, G. & Moralesa, F. (2007). Acrylamide content of selected Spanish foods: survey of biscuits and bread derivatives. *Food Additives and contaminants*, (24), 343-350.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. & Torngvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 7012-7018.
- Sagrati, G., Fabbri, A., Marucci, G., Ricciutelli, M., Vittori, S. & Ammendola, S. (2007). *PLC-MS validation of qualisafoo biosensor kit for cost-effective control of acrylamide levels in Italian coffee*. Recuperado de <http://docenti.unicam.it/pdett.aspx?Uteld=478&ids=N&pag=20&tv=p&ru=>
- Sahin, S. (2000). Effect of frying parameters on the colour development of fried potatoes. *European Food Research and Technology*, (211), 165-168.
- Salazar, R., Arámbula, G., Luna, J. D. & Cárdenas, F., E, A. (2014). Effect of added calcium hydroxide during corn nixtamalization on acrylamide content in tortilla chips. *LWT - Food Science and Technology*, (56), 87- 92.
- Schieberle, P. & Jezussek, M. (2003). 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. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, (51), 7866-7871.
- Schieberle, P., Kohler, P. & Granvogl, M. (2005). New aspects on the formation and analysis of acrylamide. *In Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*, 205-222. Springer, New York.
- Secretaría de Salud de Nuevo León. (2012). *Encuesta Estatal de Salud y Nutrición – Nuevo León 2011/2012*. Monterrey, N. L. México.
- Secretaría de Salud. (2011). *Criterios para la validación de métodos fisicoquímicos*. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura. Recuperado de www.cofepris.gob.

- Secretaría de Salud. (2002). *NOM-187-SSA1/SCFI-2002, Productos y servicios. Masa, tortillas, tostadas y harinas preparadas para su elaboración y establecimientos donde se procesan*. Especificaciones sanitarias. Información comercial: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/187ssa1scfi02.html>
- Senyuva, H. & Gokmen, V. (2005). Interference-free determination of acrylamide in potato and cereal-based foods by a laboratory validated liquid chromatography-mass spectrometry method. *Food Chemistry*, 97, 539-545.
- Serna, S. O., & Amaya, C. A. (2008). Nixtamalización del maíz a la tortilla: aspectos nutrimentales y toxicológicos. El papel de la tortilla nixtamalizada en la nutrición y alimentación. Universidad de Querétaro. *Series Ingeniería*, 105-151. México.
- Serpen, A. & Gokmen, V. (2007). Modelling of acrylamide formation and browning ratio in potato chips by artificial neural network. *Molecular Nutrition and Food Research*, (51), 383-389.
- Serpen, A. & Gokmen, V. (2009). Evaluation of the Maillard reaction in potato crisps by acrylamide, antioxidant capacity and color. *Journal of Food Composition and Analysis*, (22), 589-595.
- Shalini, C., Bindu, C., Raja, R. & Arunachalam, D. (2010). Remove from marked records; determination of acrylamide concentration in microbe free processed food products available in Indian market using GC-MS. *African. Journal of Microbiology Research*, (4), 1162-1170.
- Sharma, A., Sharma, R. & Jain, J. (2008). Biochemical changes in the lives of Swiss albino mice orally exposed to acrylamide. *Journal of Science y Technology*, 3 (2), 542-550.
- Shi, Z., Zhang, H. & Zhao, X. (2009). Ultrasonic-Assited precolumn derivatization-HPLC determination of acrylamide formed in radix asparagi during heating process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, (49), 1045-1047.
- Shih, F.F., Boué, S.M., Daigle, K.W. & Shih, B.Y. (2004). Effect of flour sources on acrylamide formation and oil uptake in fried batters. *Journal of the American Oil Chemists Society*, (81) 265-268.
- Sirot, V., Hommet, F., Tard, A. & Leblanc, J. (2012). Dietary acrylamide exposure of the French population: results of the second French total diet study. *Food Chemistry Toxicology*, (50), 889-894.

- Stadler, R. & Scholz, G. (2004). Acrylamide: An update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, (62), 449-467.
- Stadler R.H. & Studer A. (2016). Acrylamide Formation Mechanisms. *Acrylamide in Food*, (1), 1-17.
- Soares, C.M. D., Alves, R. C., Casal, S., Oliveira, M. B. P. & Fernandes, J. O. (2010). Development and validation of a matrix solid-phase dispersion method to determine acrylamide in coffee and coffee substitutes. *Journal Food Science*, (75), 57-63.
- Soares, Soares, C., Cunha, S. & Fernández, J. (2006). Determination of acrylamide in coffee and coffee products by GC-MS using an improved SPE clean-up. *Food Additives and Contaminants*, (23), 1276-1282.
- Sogorb & Vilanova, E. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*. España: Editorial Díaz de Santos. Cap. 9.
- Stadler, R., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J. & Guy, P. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 6906 (419), 449-450.
- Summa, C. A., de la Calle, B., Brohee, M., Stadler, R. H. & Anklam, E. (2007). Impact of the roasting degree of coffee on the in vitro radical scavenging capacity and content of acrylamide. *LWT - Food Science and Technology*, 40 (10), 1849-1854.
- Sun, S., Fang, Y. & Xia, Y. (2012). A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy. *Food Control*, (26), 220-222.
- Surdyk, N., Rosén, J., Andersson, R. & Aman, P. (2004). Effects of asparagine, fructose, and baking conditions on acrylamide content in yeast-leavened wheat bread. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 2047-2051.
- Swiss Federal Office of Public Health. (2002). *Determination of acrylamide in food*. Swiss Federal Office of Public Health. Recuperado de http://www.bag.admin.ch/verbrau/aktuell/d/ AA_methode.
- Taeymans, D., Wood, J. & Ashby, P. (2004). A review of acrylamide: an industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, (44), 232-347.
- Takata, K. & Okamoto, T. (1991). A method for determination of acrylamide in environmental samples by gas chromatography using bromination-dehydrobromination. *Journal of Environmental Chemistry*, (1), 559-565.

- Takatsuki, S., Nemoto, K., Sasaki, T. & Maitani, J. (2003). Discussion paper on acrylamide. *Food Hygiene and Safety Science*, (44), 89.
- Tardiff, R. G., Gargas, M. L., Kirman, C. R., Carson, M. L. & Sweeney, L. M. (2010). Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans. *Food and Chemical Toxicology*, (48), 658-667.
- Tareke, E., Karlsson, P., Eriksson, S. & Torngvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (50), 4998-5006.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S. & Torngvist, M. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen. *Chemistry Research Toxicology*, (13), 517-522.
- Tateo F., Bononi. M. (2010). Acrylamide content in potato chips on the Italian market determined by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *International Journal of Food Science and Technology*, (45), 629-634.
- Tateo, F. & Bononi, M. (2003). GC-MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal Food Science*, (15), 149-151.
- Tateo, F. & Bononi, M. (2003). Preliminary study on acrylamide in baby foods on the Italian market. *Italian Journal of Food Science*, 593-599.
- Tateo, F., Bononi, M. & Andreoli, G. (2007). Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 3-4 (20), 232-235.
- Taubert, D., Harfinger, S., Henkes, L., Berkels, R. & Schomig, E. (2004). Influence of processing parameters on acrylamide formation during of potatoes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (52), 2735-2739.
- Technology, C. F. (2006). *Acrylamide in Food*, (32). Recuperado de http://www.cast-science.org/websiteUploads/publicationPDFs/acrylamide_ip.pdf.
- Tezcan, F. & Erim, F. (2008). On-line stacking techniques for the non-aqueous capillary electrophoretic determination of acrylamide in processed food. *Analytica Chimica Acta*, 617, 196-199.
- Therry, D., Périsset, A., Goldmann & Riediker, H. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass

- spectroscopy. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52 (15), 4625-4631.
- Tilson, H. (1981). The neurotoxicity of acrylamide. An overview. *Neurobehavioral Toxicology*, (3), 445-461.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2006). U.S. Food and Drug Administration. Recuperado de http://74.125.67.132/translate_c?hl=en&sl=en&u=http://www.cfsan.fda.gov/dms/acryda.
- U.S. Department of Health and Human Services. (2013). *Food and Drug Administration*. Recuperado de <http://www.fda.gov/Food/FoodbornenessContaminants/ChemicalContaminants/ucm053566.htm#table4>
- USFDA. (2002). *Detection and Quantitation of Acrylamide in Foods*. U.S Food and Drug Administration. Recuperado de <http://www.fda.gov/Food/FoodbornenessContaminants/ChemicalContaminants/ucm053537.htm>.
- Valenzuela, R. & Ronco, A. (2007). Acrilamida en los Alimentos. *Revista Chilena de Nutrición*, 34 (001), 1-23.
- Vega, S., Coronado, M., Gutiérrez, R., Díaz, G., Ramírez, A., Salas, J. & Pérez, J. (2007). Acrilamida un tóxico alimentario en el nuevo milenio, el caso de la leche. *Carnilac Industrial*, 17-22.
- Vivek, B., Krivanek, A. F., Palacios, N., Twumasi, S. & Diallo, A. O. (2008). *Mejoramiento de maíz con calidad de proteína (QPM): Protocolos para generar variedades QPM*.
- Wang, H., Feng, F., Guo, Y., Shuang, S. & Choi, M. (2013). HPLC-UV quantitative analysis of acrylamide in baked and deep fried Chinese foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, (31), 7-11.
- Wang, H., Lee, W., Shuang, S. & Choi, M. (2008). SPE/HPLC-UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchemical Journal*, (89), 90-97.
- Wei, C. C., Ya, M. K. & Yang, D. (2009). Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *Journal of Food and Drug Analysis*, (17), 190-197, 231.
- Wenzl, T., De la Calle, B. & Anklam, E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products. *Food Additives and Contaminants*, (20), 885-902.

- Wenzl, T., Lachenmeier, D. W., & Gökmen, V. (2007). Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 389(1), 119.
- Williams, J. (2005). Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *Food Chemistry*, (90), 875-881.
- Wittkowski, R. (2002). *Seminario 2002*. Instituto Federal para la Protección de la Salud del Consumidor y Medicina Veterinaria. Alemania. Recuperado de www.bfr.bund.de/cm/343/wittkowski02.pdf
- Xu, Y., Cui, B., Ran, R., Liu, Y., Chen, H., Kai, G. & Shi, J. (2014). Risk assessment, formation and migration of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food and Chemical Toxicology*, (69), 2-10.
- Xu, L., Zhang, L., Quiao, X., Xu, Z. & Song, L. (2012). Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust base on SPE and HPLC. *Chromatographia*, (75), 269-274.
- Yang, L., Zhang, G., Yang, L. & He, Y. (2012). LC-MS/MS Determination of acrylamide in instant noodles from supermarkets in the Hebei province of China. *Food Additives and Contaminants: Part B Surveillance*, 5, 100-104.
- Yasuhara, A., Tanaka, Y., Hengel, M. & Shibamoto, T. (2003). Gaschromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 3999-4003.
- Young, M. S., Jenkins, K. M., & Mallet, C. R. (2004). Solid-phase extraction and cleanup procedures for determination of acrylamide in fried potato products by liquid chromatography/mass spectrometry. *Journal of AOAC International*, 87(4), 961-964.
- Yuliana, M. R., Yahuaca, B. & Cortés, C.J. (2015). *Efecto de la cocción térmico-alcalina sobre la oxidación de los ácidos grasos en la tortilla de maíz*. Centro de Investigaciones en Óptica A.C., BCA022.
- Yusa V, Quinta G, Pardo O, Marti P. & Pastor A. (2006). Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods. *Food Additives and Contaminants*, (23), 237-244.
- Zenick, H., Hope, E. & Smith, M. (1986). Reproductive toxicity associated with acrylamide treatment in male and female rats. *Journal of Toxicology*, (17), 457-472.

- Zhang, L., Li, J., Liu, X., Zhao, Y., Li, X., Wen, S. & Wu, Y. (2013). Dietary intake of PCDD/Fs and dioxin-like PCBs from the Chinese total diet study in 2007. *Chemosphere*, 90, 1625-1630.
- Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y. & Zhang, Y. (2006). Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. *Journal of Chromatography*, 1116, 209-216.
- Zhang, Y., Ren, Y. & Zhang, Y. (2009). New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes. *Chemical Reviews*, 109, 4375-4397.
- Zhang, Y., Ren, Y., Zhao, H. & Zhang, Y. (2007). Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 584, 322-332.
- Zhang, Y., Ren, Y., Zhao, H. & Zhang, Y. (2007). Determination of acrylamide in Chinese traditional carbohydrate-rich foods using gas chromatography with micro-electron capture detector and isotope dilution liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 584, 322-332.
- Zhang, Y., Zhang, G. & Zhang, Y. (2005). Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: review and recent developments. *Journal of Chromatography*, 1 (1075), 1-21.
- Zhu, Y., Li, G., Duan, Y., Chen, S., Zhang, C. & Li, Y. (2008). Application of the standard addition method for the determination of acrylamide in heat-processed starchy foods by gas chromatography with electron capture detector. *Food Chemistry*, (109), 899-908.
- Zubeldia, L. & Gomar, F. (2007). Acrylamida en patatas fritas y productos de aperitivo elaborados en la Comunidad Valenciana, *Gaceta Sanitaria*, 21 (4), 334-337.
- Zyzak, D., Sanders, R., Tallmadge, D., Eberhart, B., Ewald, D. & Gruber, D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (51), 4782-4787.