



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CUANTIFICACION DE ACRILAMIDA EN PAPAS FRITAS POR
CROMATOLOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCION
(HPLC).

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

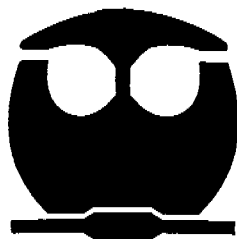
QUIMICO DE ALIMENTOS

P R E S E N T A :

LIZBETH SARAI FUENTES RANGEL



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE CIENCIAS



MEXICO, D.F.

2006

0353026



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente : Prof. Pedro Villanueva González
Vocal: Prof. Humberto Ramón Gómez Ruiz
Secretario: Prof. Hermilo Leal Lara
1er. Suplente: Prof. Amanda Gálvez Mariscal
2do. Suplente: Prof. Georgina Artemisa Duarte Lisci

Lugar donde se desarrolló el tema:

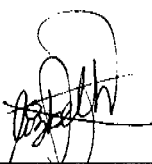
Laboratorio de Química Ambiental. Espectrometría de Masas, laboratorio 108.
Departamento de Química Analítica División de Estudios de Posgrado. Edificio B.
Facultad de Química. U.N.A.M.

ASESOR:



M. en C. Humberto R. Gómez Ruiz

SUSTENTANTE:



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Lizabeth Sarai Fuentes Rangel

FECHA: 20 Feb 06

FIRMA: 

A mis padres

Por todo su esfuerzo, paciencia, amor, consejos y enseñanzas, mil gracias por haberme comprendido y darme la oportunidad de tomar decisiones que lograron la culminación de este gran anhelo. A mi padre mil gracias por inculcarme desde pequeña el amor y el respeto a la UNAM.

A mis queridos hermanos

Josué y Karina que saben que los quiero mucho, mil gracias Josy por tu ayuda cuando tenía mucha tarea, por todos los momentos difíciles que tuvimos que pasar tú y yo pero que juntos y unidos salimos adelante, gracias por ser un gran hermano y sobre todo mi mejor amigo.

A mi pequeña Kari que le has dado alegría a mi vida y motivación para darte un buen ejemplo a seguir.

A la UNAM

Por abrirme las puertas de esta magnífica institución llena de historia, grandeza y sabiduría que se convirtió en mi segunda casa por algunos años, que me formó como profesionalista y como persona dejándome un respeto infinito y el enorme orgullo de haber pertenecido a ella, *y es que como no te voy a querer si mi corazón azul es y piel dorada siempre te querré.*

Al Maestro Humberto y Maestra Lucía

Gracias por abrirme las puertas de su laboratorio para culminar mis estudios, gracias por sus enseñanzas, paciencia y apoyo.

A mis queridos amigos

Con los cuales compartí durante más de 10 horas diarias alegrías, tristezas y miles de experiencias que nos hicieron crecer juntos y conocer el valor y la importancia de la amistad a ti Vany, Paty, Lety, Lore, Marianita y Héctor.

También a ti Citla y George que me brindaron su apoyo, ayuda y amistad durante la realización de mi tesis.

ÍNDICE

| | Páginas |
|--|---------|
| OBJETIVOS E HIPOTESIS | 1 |
| CAPITULO I: MARCO TEORICO | 2 |
| <i>1.1 ACRILAMIDA</i> | |
| 1.1.1 Propiedades y Toxicología | 2 |
| 1.1.2 Acrilamida en Alimentos | 6 |
| <i>1.2 METODOLOGIA</i> | 11 |
| 1.2.1 Preparación de muestras: Extracción en fase Sólida (EFS) | 11 |
| 1.2.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución | 17 |
| 1.2.2.1 Introducción | 18 |
| 1.2.2.2 Tipos de Cromatografía de líquidos de alta resolución. | 18 |
| 1.2.2.3 Instrumentación Cromatografía de líquidos de alta resolución | 19 |
| 1.2.2.4 Teoría de cromatografía | 29 |
| 1.2.3 Métodos de cuantificación de acrilamida en alimentos. | 37 |
| 1.3 <i>LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN</i> | 39 |
| CAPITULO II: DESARROLLO EXPERIMENTAL | 44 |
| 2.1 <i>Equipo y material</i> | 45 |
| 2.2 <i>Reactivos y disolventes</i> | 46 |
| 2.3 <i>Preparación de disoluciones</i> | 46 |
| 2.4 <i>Optimización de parámetros cromatograficos</i> | 48 |
| 2.5 <i>Optimización del proceso de extracción de acrilamida</i> | 51 |
| 2.6 <i>Límite de detección y límite de cuantificación</i> | 53 |
| 2.7 <i>Cuantificación de acrilamida en muestras comerciales</i> | 53 |

| | Páginas |
|---|---------|
| CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 57 |
| 2.1 <i>Optimización de parámetros cromatograficos</i> | 57 |
| 2.2 <i>Optimización del proceso de extracción de acrilamida</i> | 62 |
| 2.3 <i>Límite de detección y límite de cuantificación</i> | 71 |
| 2.4 <i>Cuantificación de acrilamida en muestras comerciales</i> | 73 |
| CONCLUSIONES | 81 |
| BIBLIOGRAFÍA | 82 |
| APÉNDICE A Cálculo de límite de detección y cuantificación | 86 |
| APÉNDICE B Cromatogramas | 89 |
| APÉNDICE C Cálculos | 132 |

RESÚMEN

Debido al reciente descubrimiento de acrilamida en alimentos fritos en concentraciones superiores a los niveles permitidos en agua potable, y a su posible carcinogenicidad y toxicidad; la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y Agricultura (FAO), recomendó a sus países miembros cuantificar acrilamida en productos fritos.

La intención del presente trabajo fue desarrollar una metodología para cuantificar acrilamida en los productos fritos industriales de mayor consumo en nuestro país como lo son las papas fritas y las papas a la francesa.

La metodología propuesta por la Food and Drug Administration (FDA) sugiere la utilización de Extracción en Fase Sólida (EFS) y Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un detector de masas (HPLC/MS) pero debido a que en México no se cuenta con un número suficiente de HPLC/MS se decidió evaluar el empleo de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución acoplado a un detector UV-Visible (HPLC/UV-VIS) y a través de optimizar tanto los parámetros cromatograficos y de detección poder medir acrilamida en alimentos fritos.

Se realizaron pruebas para optimizar el proceso de extracción de acrilamida en alimentos utilizando la técnica de extracción en fase sólida y se implentó un método en HPLC/UV-VIS para el cual se determinaron los valores de límite de detección y límite de cuantificación de acrilamida.

Con el método ya montado se analizaron dos marcas de papas fritas: Sabritas (en sus variedades saladas, adobadas y limón) y Chips de Barcel (en sus variedades saladas y jalapeño), y dos marcas de papas a la francesa: Mc Donalds y Burger King.

OBJETIVO GENERAL

- Determinar la concentración de acrilamida en papas fritas por cromatografía de líquidos de alta resolución utilizando un detector ultravioleta-visible.

Objetivos Específicos

- Establecer las condiciones cromatográficas para la cuantificación de acrilamida.
- Determinar los Límites de Detección y Cuantificación del método propuesto.
- Comprobar si el método propuesto por la Food and Drug Administration (FDA) funciona para la cuantificación de acrilamida en alimentos utilizando cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector ultravioleta-visible.

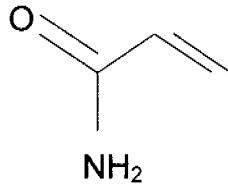
HIPÓTESIS

- Los valores de acrilamida en alimentos fritos es de 50 – 3500 ppb.
- Debe ser posible determinar los valores altos de acrilamida con cromatografía de líquidos de alta resolución convencional.

CAPITULO I MARCO TEORICO

1.1 ACRILAMIDA

1.1.1 Propiedades y Toxicología



El nombre químico de la acrilamida acorde a la IUPAC es 2-propenamida, también conocida como propenamida, etilencarboxilamida y amida acrílica.¹

- *Propiedades físicas:* posee un peso molecular de 71.08 g/mol, su fórmula molecular condensada es C₃H₅NO; son cristales sólidos inodoros e incoloros con un punto de fusión de 84.5 °C y un punto de ebullición de 125 °C a 25 mm Hg, 103 °C a 5 mm de Hg y 87°C a 2 mm de Hg. El compuesto es soluble en agua, alcohol y éter.¹
- *Bioquímica de la acrilamida:* La acrilamida es absorbida en animales y humanos por la piel, inhalación o ingestión.²
La eliminación de la acrilamida del organismo sigue la siguiente ruta metabólica: la acrilamida reacciona con N-(N-L-γ-glutamil-L-cisteinil)glicina (GSH) catalizada por la enzima glutatión S transferasa llegando a ácido mercaptúrico que es excretado en la orina (Figura 1.1).²

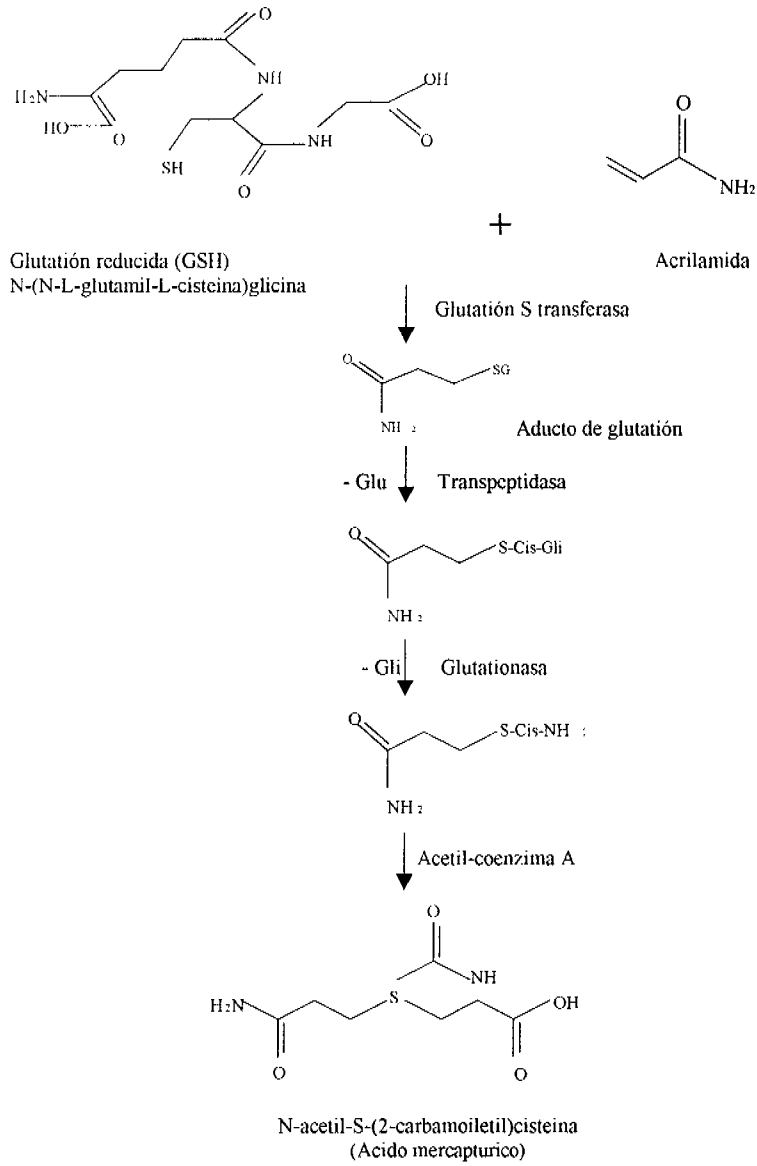


Figura 1.1 Metabolismo de la acrilamida

• *Toxicología de la acrilamida*

*Carcinogenicidad: Con base en numerosos estudios, la Agencia Internacional de Investigaciones del Cáncer ha clasificado a la acrilamida como probable carcinógeno en humanos.²

Cuando un metabolito queda unido covalentemente a la hemoglobina se forma un aducto que puede desencadenar un proceso carcinogénico, la acrilamida y la glicidamida (que puede formarse a partir de la acrilamida) reaccionan con el grupo α -NH₂ de la valina terminal de la hemoglobina formando aductos que son de gran importancia, pues son usados como biomarcadores de la exposición de acrilamida en humanos.²

Estudios realizados en animales muestran que la acrilamida aumenta la incidencia de cáncer en el cerebro, sistema nervioso central, la tiroides, otras glándulas endocrinas y en órganos reproductivos de los ratones. Un estudio con ratas donde se les administraba acrilamida en agua, mostró que el metabolito de la acrilamida (glicidamida) aparece en la mayoría de los cánceres de roedores.²

En estudios epidemiológicos hechos a trabajadores expuestos a acrilamida, no se encontró incremento con el riesgo de cáncer; sin embargo estos estudios no fueron lo suficientemente sensibles para revelar si existía la formación de algún tumor relacionado con la exposición de la acrilamida.³

*Neurotoxicidad: Se han realizado experimentos con animales (roedores, gatos, perros y monos) y se ha encontrado que en periodos de exposición largos con acrilamida se desarrollan daños en el sistema nervioso central y periférico con dosis aproximadamente similares en todos los animales.³

La acrilamida induce cambios neuropatológicos en animales de laboratorio, recientes estudios mostraron que las terminales nerviosas eran los primeros sitios afectados por dosis en bajas concentraciones.²

Hay dos principales mecanismos de neurotoxicidad de la acrilamida: inhibición del transporte axonal y una inhibición directa sobre la neurotransmisión.²

Trabajadores expuestos a acrilamida han presentado síntomas de neuropatía periférica, en periodos de exposición cortos se produjo debilidad en las piernas, pérdida de los reflejos y sensaciones de torpeza en manos y pies, y la caída de la piel de las manos. Síntomas más severos resultaron en exposiciones prolongadas incluyendo disfunción cerebral seguido de neuropatía.²

*Toxicidad Reproductiva

Genotoxicidad: Se ha reportado que la acrilamida induce mutaciones en ratones y en ratas considerándose como un agente mutagénico. Es un genotóxico en células somáticas por lo tanto se puede inducir daños hereditables a nivel de genes y cromosomas.⁴

La linealidad de la dosis-respuesta, sugiere que la acrilamida y glicidamida son DNA-reactivos clastrogenicos¹

Hay evidencia de que la acrilamida reduce la fertilidad en ratas, así como el número de crías y aumenta la cantidad de muerte prematura de los embriones; también causa reducción en la cantidad y malformaciones en espermias de ratones.

- *Regulaciones*

La Organización Mundial de la Salud y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos considera un nivel máximo permisible de acrilamida en agua potable de 0.5 ppb y en la Unión Europea (UE) de 0.1 ppb.⁵

1.1.2 ACRILAMIDA EN ALIMENTOS

En el año de 1997 en Suecia, se encontró gran cantidad de peces muertos y vacas paralizadas en los alrededores de la construcción de un túnel de ferrocarril, donde uno de cada cuatro trabajadores presentaron entumecimiento y torpeza en sus manos y pies. Los científicos sospecharon que algún compuesto químico peligroso se estuviese filtrando de las 1500 toneladas de argamasa utilizada para la construcción del túnel, al analizar el agua subterránea y de los ríos cercanos se encontraron altas concentraciones de acrilamida.⁶

Al analizar la sangre de los trabajadores expuestos a la acrilamida, se encontraron concentraciones de aductos (hemoglobina + acrilamida) 100 veces mayores que en las personas que vivían fuera del área contaminada. Con los datos anteriores se estimó una ingesta de acrilamida por persona de ~100 µg/día; valor que fue considerado de gran magnitud.

Al analizar la sangre de personas (vivían fuera del área contaminada) encontraron que los fumadores tenían mayor cantidad de aductos de acrilamida que los no fumadores. Lo anterior les sugirió que el calentamiento o las altas temperaturas podían estar involucradas.

Al comenzar a observar la dieta se sospecho que los alimentos sometidos a altas temperaturas podían ser la fuente de acrilamida para la población.⁶

Tratando de probar la teoría anterior investigadores de la Universidad de Estocolmo Suecia, presentaron un artículo donde se comparó los niveles de aductos de acrilamida en ratas alimentadas con comida frita y ratas control (alimentadas con comida sin freír). Los resultados obtenidos mostraron niveles de aductos 10 veces más altos en las ratas alimentadas con comida frita que en las ratas control. Además observaron que los niveles de aductos de acrilamida encontrados en las ratas alimentadas con comida frita eran muy similares a los niveles de los no fumadores.⁷

Posteriormente la Administración Nacional de Alimentos en Suecia (NFA) y la Universidad de Estocolmo, reportaron concentraciones promedio de acrilamida en diferentes alimentos sometidos a altas temperaturas como galletas, cereales,

cereales procesados, papas a la francesa y papas fritas, donde en estas últimas se encontró la concentración más alta (1200 ppb) lo cual les resultó alarmante pues en agua potable los niveles máximos permitidos son de 0.5 ppb.⁵

También se analizaron alimentos crudos y hervidos, pero en estos no se detectó acrilamida. Con base en las concentraciones encontradas en diferentes alimentos, la NFA estimó una ingesta de acrilamida de 35-40 mg/día en Suecia; lo cual les pareció un valor significativo para poder atribuirle a la acrilamida cientos de casos de cáncer, por año.⁵

Investigadores de Inglaterra y del Centro de Investigaciones Nestlé (Suiza) propusieron la formación de acrilamida vía la reacción de Maillard entre aminoácidos y azúcares reductores, implicando una degradación de Strecker para llegar a los intermediarios de la acrilamida.⁸

Encontraron que la asparagina es el aminoácido mayoritario en las papas y cereales y que es un participante crucial en la formación de acrilamida, pues encontraron que se formaban cantidades apreciables de acrilamida al reaccionar asparagina y glucosa a 185°C; sin embargo no encontraron acrilamida al reaccionar glucosa con glicina, cisteína y metionina a 185°C, con glutamina y ácido aspártico solo se encontraron trazas de acrilamida. Por lo tanto se considera a la glucosa, fructuosa y asparagina los principales precursores de la acrilamida.⁸

Todo lo anterior, llevó a que los investigadores de Inglaterra, Suecia, Canadá y Estados Unidos., llegaron a la misma conclusión: el aminoácido asparagina al reaccionar con azúcares reductores vía la reacción de Maillard a altas temperaturas genera la acrilamida.⁹

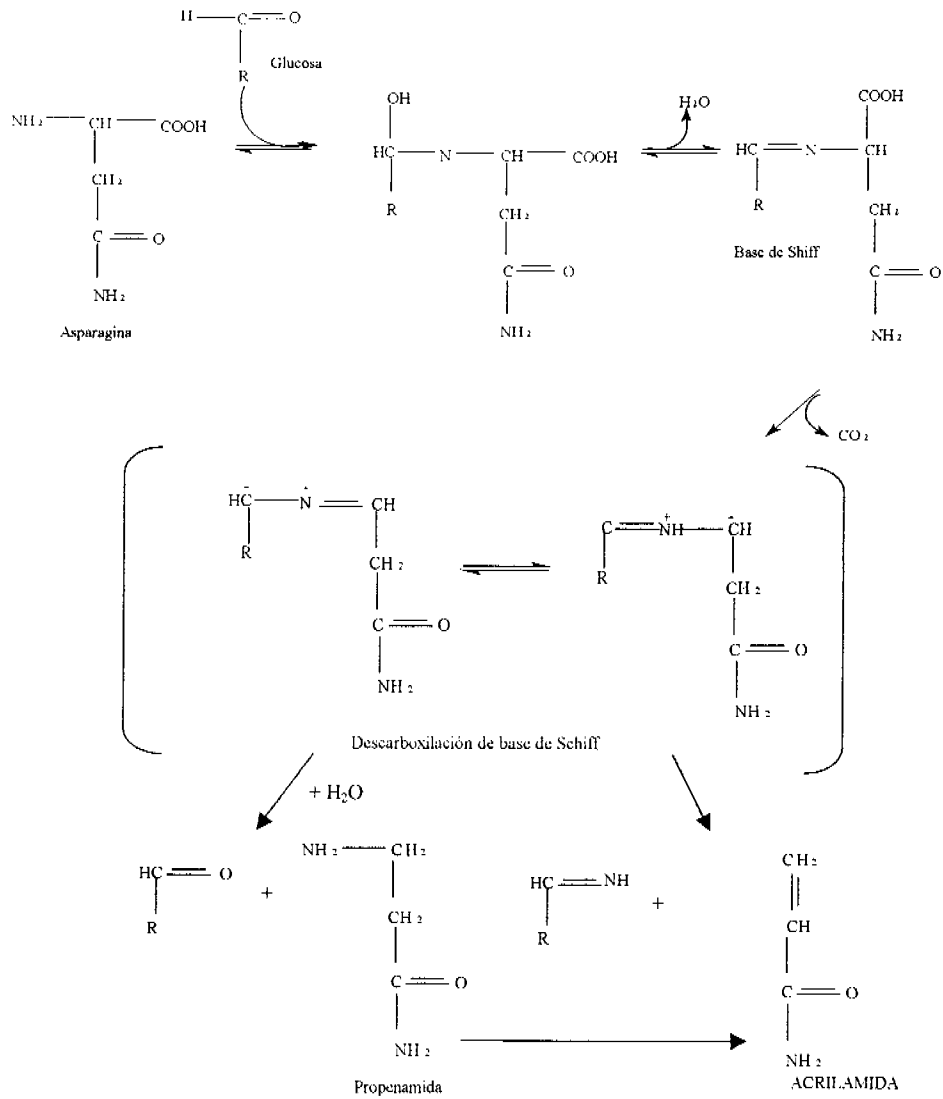


Figura 1.2 Formación de acrilamida a partir de asparagina y glucosa. El grupo α -NH₂ de la asparagina participa en una adición nucleofílica con el grupo aldehído de la glucosa formando una base de Schiff, la cual después de sufrir el rearrreglo de Amadori forma un derivado (*N*-glucósido). Posteriormente puede sufrir una descarboxilización o desaminación, perdiendo el COOH y el grupo α -NH₂ (grupos asociados a la asparagina) para formar acrilamida.²

Se realizaron estudios en los tubérculos de papa encontrando que estos poseen altas concentraciones de glucosa, fructosa y asparagina libre lo cual puede explicar las altas concentraciones de acrilamida generada en los productos elaborados a base de papa; para corroborar esta relación se realizó un estudio donde primero se analizó el contenido de azúcares reductores y asparagina de 17 variedades de papa para posteriormente determinar su potencial de formación de acrilamida, obteniéndose que la cantidad de azúcares reductores muestra una correlación con el potencial de formación de acrilamida, mientras que la cantidad de asparagina no.¹⁰

Se han publicado diferentes investigaciones en torno a las condiciones de procesamiento que pueden afectar los niveles de acrilamida en los alimentos, donde se mostró que la cantidad obtenida de acrilamida de un mismo producto (misma receta y mismo proceso de manufacturación) posee variabilidad (valor $\pm 10\%$); así como también encontraron diferencia entre muestras de un mismo lote. Asumieron que lo anterior podía deberse a la inhomogeneidad de las muestras, debido a que los precursores de la acrilamida (por ejemplo en la papa) no se encuentran uniformemente distribuidos; además encontraron que en las papas fritas, las partes negras contienen mayor cantidad de acrilamida; por lo tanto se puede encontrar en un alimento partes con mayor contenido de acrilamida.¹¹

Al analizarse si la forma de cultivar (orgánica, convencional o integrada) así como la cantidad de nitrógeno incorporada a través de la fertilización tenían algún efecto en la formación de acrilamida se obtuvieron resultados negativos.¹⁰

En un artículo reciente, donde se da un pre tratamiento a las papas remojándolas en agua con el fin de que los carbohidratos fueran retenidos en ella, pero al final encontraron que el remojar o no las papas, no presenta diferencia significativa en la cantidad de acrilamida encontrada después de freír las papas.¹² También se observó que la composición de los aceites para cocinar no tienen correlación con la formación de acrilamida en el alimento.¹²

Investigadores de la universidad de Heidelberg propone que una dieta rica en proteínas podría reducir la absorción de acrilamida. Esta idea se generó a partir de

experimentación con células Caco-2, que reproducen un modelo de intestino humano, los investigadores han visto que cuando la acrilamida se liga a proteínas como la albúmina ya no puede ser absorbida por las células intestinales. Lo anterior abre una nueva línea de trabajo pero aún está por verse cuanta proteína ayudaría a minimizar los riesgos del consumo de acrilamida.¹³

1.1 METODOLOGÍA

1.1.1 PREPARACIÓN DE MUESTRAS: EXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA (EFS)^{14,15 y 16}

La extracción en fase sólida (EFS), es una modalidad de preparación de muestras que ha tenido amplia difusión desde fines de la década de los 70's y principios de los 80's. Consiste en una extracción líquido-sólido a través de una columna, cartucho y más recientemente se han desarrollado sistemas de extracción en discos.

EFS es una técnica de preconcentración y/o limpieza de muestras.

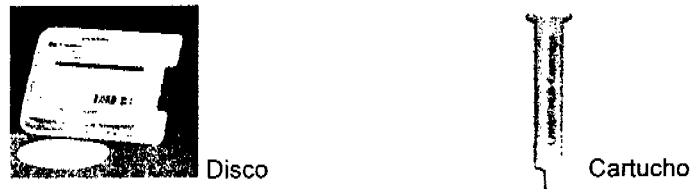


Figura 1.3 Presentaciones de EFS en disco y cartucho

Los cartuchos comúnmente están hechos de polipropileno, el material adsorbente tiene una masa entre 50 mg y 10 g la cual se coloca entre dos discos fritados que retienen el material adsorbente; y están hechos de polietileno, comúnmente tienen un tamaño de poro de 20 μm .

Los discos contienen partículas de adsorbente con diámetros de $\sim 40\text{-}50 \mu\text{m}$ y contienen finas hebras de politetrafluorotileno (PTFE) resultando discos de aproximadamente 0.5 mm de grosor con un diámetro entre 47 a 70 mm. El disco posee mayor área superficial que el cartucho, lo que permite mayores flujo

La extracción en fase sólida se realiza haciendo pasar una disolución que contenga el analito de interés sobre una fase sólida que adsorba a los analitos de manera específica.

El volumen de la fase sólida suele ser mucho más pequeño que el de la disolución, que contiene el analito.

Tras la adsorción, los analitos se remueven con una pequeña cantidad de disolvente que los solubiliza. Como resultado, la extracción fase sólida no sólo modifica la matriz de la disolución sino que reduce de manera simultánea el volumen de la muestra; los analitos se concentran.

La retención del analito está afectada por el equilibrio entre la disolución de la muestra y las partículas del adsorbente. La retención es mayor cuando el área de la fase sólida es mayor. Las partículas de SPE tienen comúnmente áreas superficiales entre los 400 y 1000 m² / g.

Generalmente los adsorbentes para EFS se pueden dividir en tres clases: fase normal (adsorbentes de naturaleza polar para extraer analitos de naturaleza polar y medianamente polar), fase reversa (adsorbentes de naturaleza no polar para extraer analitos de naturaleza no polar) e intercambio iónico.

La mayoría de los adsorbentes se componen de silica (partículas con diámetros entre 30-60 µm). Comúnmente se unen químicamente grupos funcionales en la superficie de los grupos silanol de la silica, donde los grupos unidos determinan la polaridad del adsorbente. La unión de los grupos funcionales a la silica no es completa, quedando grupos silanol libres los cuales son sitios polares y ácidos que pueden hacer la interacción del analito con el adsorbente más compleja. Para reducir estas interacciones se realiza un bloqueo a los grupos silanoles donde se hacen reaccionar con pequeñas cadenas alquiladas.

Además de la silica se usan otros adsorbentes como son el florisil, la alúmina y los polímeros orgánicos sólidos.

Los adsorbentes de fase normal tienen grupos funcionales polares como ciano, amino y diol; donde la naturaleza polar de estos adsorbentes hace que sean más afines por compuestos polares (por ejemplo fenol). En contraste, en fase reversa

los adsorbentes tienen grupos funcionales no polares por ejemplo octadecil, octil y metil y al contrario de la fase normal, retiene compuestos no polares (por ejemplo hidrocarburos policíclicos aromáticos).

Los adsorbentes de intercambio iónico pueden tener grupos catiónicos o aniónicos, donde al estar en forma ionizada atraen a los compuestos con carga opuesta. En la tabla 1.1 se presentan algunos ejemplos de fases sólidas y sus aplicaciones junto con algunos disolventes que se emplean para remover el analito de dichas fases.

Las superficies se clasifican por sus atributos químicos en polares o no polares; ácidas, neutras o básicas; hidrofóbicas e hidrofílicas y catiónicas o aniónicas. Los distintos tipos de superficies permiten aislar distintas clases de compuestos (tabla 1.2)

| Nombre | Identidad | Características superficiales | Tipo de enlace, condiciones y ejemplos |
|------------------------------|--|--|---|
| Octadecil | -C ₁₈ H ₃₇ | Hidrofóbico no polar | Especies hidrofóbicas que proceden de disoluciones acuosas. Productos orgánicos |
| Octil | -C ₈ H ₁₇ | Hidrofóbico | Especies hidrofóbicas que proceden de disoluciones acuosas (unidas con menor fuerza que C ₁₈) |
| Sílice | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ -\text{O}-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-\text{O}- \\ \quad \end{array}$ | Hidrofílica Polar Neutra | Especies de polaridad baja a moderada que proceden de disoluciones no acuosas, por ejemplo vitaminas liposolubles |
| Florisil | Silicato de magnesio | Hidrofílica Polar Ligeramente básica | Especies de polaridad baja a moderada que proceden de disoluciones no acuosas, por ejemplo grasas, bifenilos policlorados |
| Alúmina A (alumina ácida) | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ -\text{O}-\text{Al}-\text{O}-\text{Al}-\text{O}- \end{array}$ | Hidrofílica Polar Ácida Enlazador de cationes | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas, por ejemplo antibióticos, cafeína |

| Nombre | Identidad | Características superficiales | Tipo de enlace, condiciones y ejemplos |
|--|--|--|--|
| Alúmina N (alúmina neutra) | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{O}^- \\ \quad \\ \text{-O-Al-O-Al-O-} \end{array}$ | Hidrofílica Polar Neutra | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas por ejemplo el petróleo |
| Alumina B (alumina básica) | $\begin{array}{c} \text{O}^- \quad \text{O}^- \\ \quad \\ \text{-O-Al-O-Al-O-} \end{array}$ | Hidrofílica Polar Básica Enlazador de cationes | Especies hidrofílicas en disoluciones no acuosas, por ejemplo esteroides, pesticidas. |
| Aminopropil | $-\text{C}_3\text{H}_6\text{NH}_2$ | Hidrofílico Moderadamente polar Ligeramente básico Enlazador de aniones | Analitos en disolventes acuosos u orgánicos por ejemplo fenoles, petróleo, sacáridos |
| Cianopropil | $-\text{C}_3\text{H}_6\text{CN}$ | Hidrofóbico Casi no polar Neutro | Analitos en disolventes acuosos u orgánicos, por ejemplo péptidos hidrofóbicos, pesticidas |
| Diol | $\begin{array}{c} \text{OH} \quad \text{OH} \\ \quad \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2 \end{array}$ | Hidrofóbico Casi no polar Neutro | Trazas de elementos en agua; proteínas y péptidos en disolventes acuosos u orgánicos |
| Estireno divinilbenceno | | Hidrofóbico Neutro | Productos orgánicos en agua, por ejemplo hidrocarburos poliaromáticos, vitamina B ₁₂ |
| Intercambiador de aniones (intercambiador fuerte) | $-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)_3$ | Hidrofílica Enlazador de aniones | Aniones en agua o en disolventes mixtos acuosos, por ejemplo Cl ⁻ , SO ₄ ⁻² , PO ₄ ⁻³ |

Tabla 1.1 Sólidos para extracción en fase sólida

| Fase normal | Fase reversa | Intercambio iónico |
|---|---|---|
| $-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$ (cianopropil) | $-(\text{CH}_2)_7-\text{CH}_3$ (octil) | $-(\text{CH}_2)_3-\text{N}(\text{CH}_3)_2$ Intercambiador anionico |
| $-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$ (aminopropil) | $-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ (octadecil) | $-(\text{CH}_2)_3-\text{Fenil-SO}_3^-$ Intercambiador cationico |

Tabla 1.2 Algunos ejemplos de grupos unidos a silica gel

Una nueva fase sólida a base del copolímero de divinilbenceno y *N* – vinilpirrolidona (Oasis HLB de Waters) provee un adsorbente con una parte hidrofílica y una hidrofóbica con lo cual se tiene un adsorbente balanceado; por lo que se facilita la extracción de compuestos con diferentes polaridades. Este polímero tiene la capacidad de extraer pequeños compuestos polares.

Procedimiento de extracción en fase sólida

Para realizar una extracción en fase sólida se requiere de un procedimiento que involucra cuatro pasos.

1. Acondicionamiento:

Este paso ayuda a la eliminación de posibles impurezas contenidas en el cartucho, además de mojar la superficie del adsorbente lo que permite que las cadenas alquiladas que están apelmazadas en la superficie de la sílica se solvaten y se extiendan en forma de cerdas; lo cual asegura un buen contacto entre el analito y el adsorbente ya que si el adsorbente está seco hay poca retención y por lo tanto bajos recobros.

El acondicionamiento se realiza haciendo pasar un pequeño volumen de disolvente orgánico que debe ser de igual o mayor fuerza que la fase móvil (si EFS es preparativa para HPLC), después se pasa un segundo disolvente que debe ser similar al de la fase móvil.

2. Adsorción del analito

La muestra líquida o disuelta se pasa a través del cartucho de EFS, lo cual puede ser con o sin ayuda de vacío.

3. Lavado

El propósito de este paso es remover sales y otros analitos indeseables.

Se utiliza un disolvente ligeramente más fuerte o igual que en el que se encuentra el analito (el más común es el agua).

4. Elución del analito de interés

En el paso de elución el analito adsorbido es removido de la fase sólida y regresado a una fase líquida.

Lo más importante es seleccionar un líquido que eluya el analito de interés completamente de la fase sólida con el menor volumen posible.

Factores que influyen en EFS

Flujo: Si es rápido minimiza la interacción entre el analito y el adsorbente.

Se utilizan flujos 3-10 mL/min para cartuchos y flujos entre 10-100 mL/min para discos.

Elección del disolvente: es un factor crítico para la elución del analito de interés.

Cantidad de analito en la muestra: para poder aislar y concentrar el analito de interés es muy importante que la cantidad de adsorbente sea capaz de adsorber todo el analito contenido en la muestra (factor de saturación).

La extracción en fase sólida tiene importantes ventajas sobre la extracción líquido-líquido como es que en EFS se requiere menor manipulación, el tiempo de extracción es menor, además de que provee un mayor factor de concentración.

1.2.2 CROMATOGRAFÍA DE LIQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN^{17,18, 19, 20, 21, 22,}

23 y 24

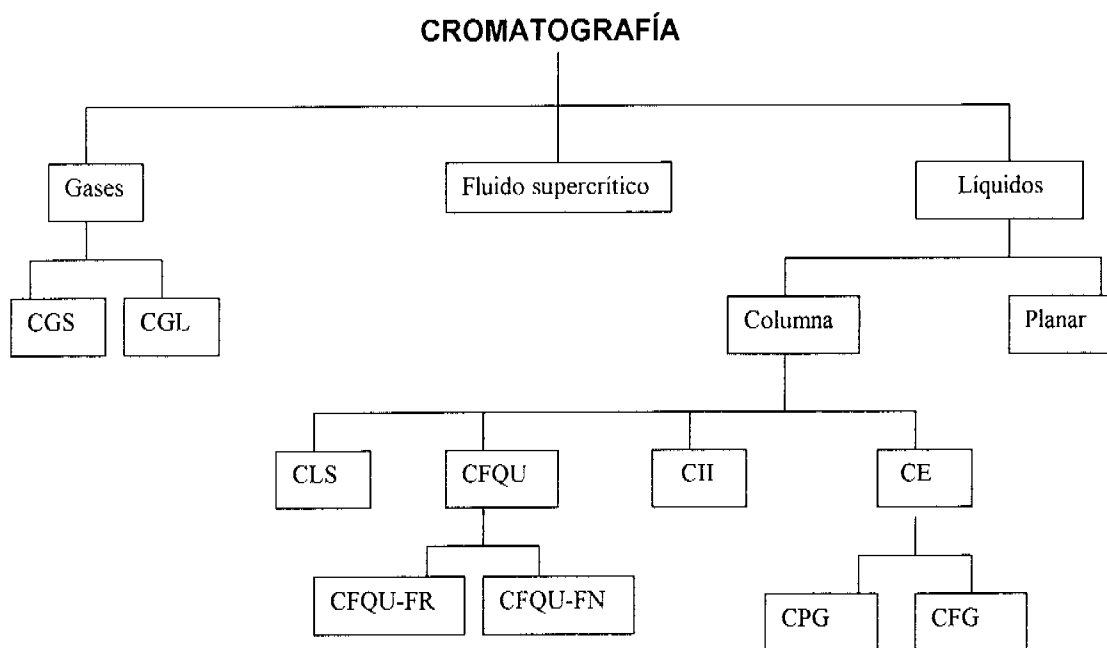


Figura 1.4 Modalidades de la cromatografía

CGS: cromatografía de sólido-gas, CGL: cromatografía líquido-gas, CLS: cromatografía sólido-líquido, CFQU: cromatografía fase químicamente unida, CFQU-FR: cromatografía fase químicamente unida en fase reversa, CFQU-FN: cromatografía fase químicamente unida en fase normal, CII: cromatografía de intercambio iónico, CE: cromatografía de exclusión, CPG: cromatografía de permeación en gel y CFG: cromatografía de filtración en gel.

1.2.2.1 Introducción

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) por sus siglas en inglés, es una técnica de separación en la que una muestra se distribuye entre dos fases una estacionaria y una móvil (líquido), donde se utiliza una presión elevada para forzar el paso del disolvente por una columna que contiene partículas muy finas consiguiendo así separaciones con gran resolución. Ha tenido una creciente difusión desde comienzos de la década de los 70's, y hoy representa una de las herramientas más empleadas en el laboratorio analítico moderno, dedicado a la investigación básica, aplicada e industrial.

Las razones en el incremento de la utilización de esta técnica se debe a su sensibilidad, su fácil adaptación a las determinaciones cuantitativas, su aplicabilidad a sustancias no volátiles o termolábiles, etc.

1.2.2.2 Tipos de cromatografía de líquidos de alta resolución

Cromatografía Líquido-sólido (CLS)

Se basa en la adsorción de los analitos en una superficie polar, ligeramente ácida de sílica gel. La fase estacionaria es por lo regular de sílica gel o alúmina y como fase móvil se utilizan disolventes no polares como hexano, CHCl_3 , etc.

Cromatografía de fase químicamente unida (CFQU)

Se basa en la adsorción de analitos en una fase estacionaria (polar o no polar). La fase estacionaria tiene una base de sílica gel modificada químicamente en la cual se reemplazan sus grupos funcionales por otros como: octilsilano, fenilo, ciano, amino, diol, etc.

Cuando se utiliza una fase estacionaria polar y una fase móvil no polar se llama fase normal. Se utiliza en la separación de solutos de polaridad mediana a alta y

es de suma utilidad para la separación de isómeros posicionales con sustituyentes polares.

Cuando se utiliza una fase estacionaria no polar y una fase móvil polar se llama fase reversa, octasilano, fenilo, octadecilsilano, son algunos de los grupos unidos químicamente a las sílica.

Cromatografía de intercambio iónico (CII)

Se basa en la adsorción reversible de iones en la fase estacionaria con grupos funcionales de cargas opuestas.

La fase estacionaria para cationes contiene iones como SO_3^{-2} , CO_3^{-2} , etc., para aniones la fase estacionaria contiene iones como NH_4^+ , NH_3^+ , etc. La fase móvil es comúnmente un buffer.

Cromatografía de exclusión (CE)

Los poros internos de la fase estacionaria excluyen a los analitos solvatados en función de su volumen hidrodinámico V_R se correlaciona con el peso molecular.

La fase estacionaria es comúnmente estireno 8% divinilbenceno (DVB) con diámetros de poro de 80, 100, 150, 300, 500, o 1000 Å. Como fase móvil se utilizan por lo general tolueno o tetrahidrofurano.

1.2.2.3 Instrumentación en Cromatografía de líquidos de alta resolución

El notorio avance que la cromatografía líquida ha experimentado en los últimos años, ha permitido llegar a un nivel instrumental de alta precisión, compuesto por bombas que permiten entregar flujos muy estables que varían entre microlitros y varios mililitros, detectores con celdas intercambiables, válvulas accionadas por microprocesadores que permiten direccionar la fase móvil para automatizar

procesos, integradores versátiles aislados o conectados a una computadora que puede permitir no solo el control global de uno o más equipos cromatográficos sino la libre manipulación y almacenamiento de datos, generación de reportes e incluso el desarrollo automático de métodos, etc.

En un HPLC la mezcla a analizar es disuelta en un disolvente que posteriormente es introducido (inyectado) en la columna y llevado a través de esta por un flujo continuo de un disolvente (fase móvil). La separación tiene lugar en la columna, la cual contiene partículas con grandes áreas superficiales (fase estacionaria), los componentes de la mezcla interactúan con la fase estacionaria. La fase móvil es bombeada a través de la columna donde algunos componentes de la mezcla viajan a través de la columna más lento que otros. Al salir de la columna los componentes de la mezcla llegan a un detector emitiendo una respuesta. El cromatograma es un registro de la respuesta del detector en función del tiempo que indica la presencia de los componentes como picos. La figura 1.5 esquematiza los componentes de un HPLC.

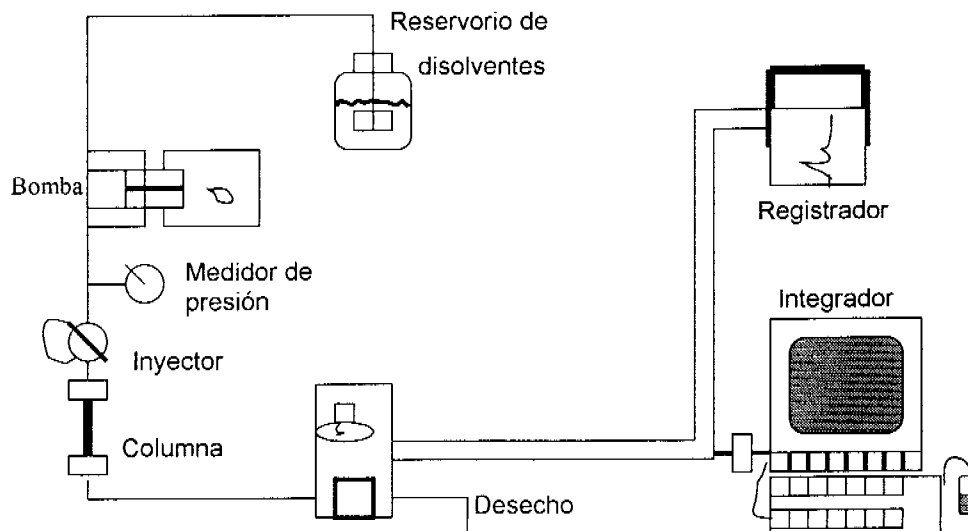


Figura 1.5 Esquema de cromatógrafo de líquidos de alta resolución

RESERVORIO DE DISOLVENTES

El reservorio es el recipiente que contiene la fase móvil. Puede ubicarse dentro de un equipo integrado o externamente en un equipo modular, y en general algunos centímetros sobre el nivel de la bomba para que la fuerza de gravedad dirija el solvente hacia ésta, manteniendo llenas las conexiones.

BOMBA

Las bombas impulsan la fase móvil proveniente del reservorio del disolvente hacia el inyector, y desde allí hacia la columna.

Los tipos de bombas que hay son:

- ❖ Bombas de pistón recíprocante

Son las de mayor uso, consisten, por lo general, en una pequeña cámara en la que el disolvente es impulsado por el movimiento de un pistón accionado por un motor.

Entre sus ventajas se puede citar el uso de altas presiones (6000 psi), su fácil adaptación a la elución de gradiente y sus flujos constantes.

El equipo de HPLC utilizado posee una bomba cuaternaria (figura 1.6), la cual es un tipo de bomba de pistón recíprocante.

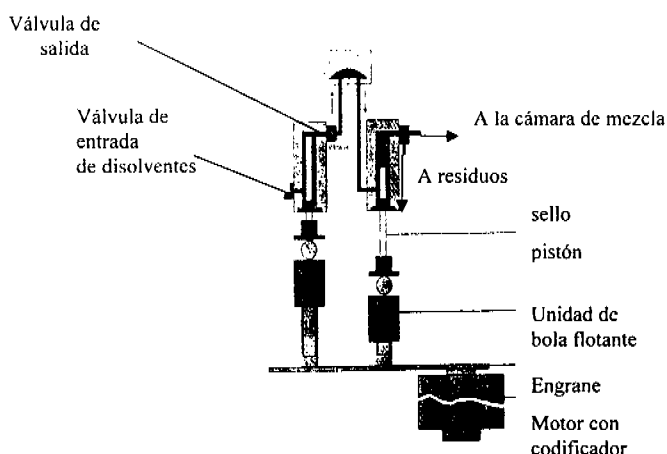


Figura 1.6 Bomba cuaternaria

❖ Bombas de jeringa, son poco utilizadas.

INYECTOR

El inyector es el dispositivo que permite introducir la muestra en disolución sin interrumpir el flujo del disolvente a través del sistema.

Actualmente la totalidad de los inyectores de HPLC son válvulas que orientan el flujo hacia la columna, pasando o no según su posición, a través de un loop en el cual se introduce la solución a inyectar.

La mayoría de los equipos de HPLC cuentan con inyectores automáticos que además de la válvula de inyección cuentan con un mecanismo que permite su llenado así como un dispositivo para colocar los viales a inyectar.



Figura 1.7 Ejemplo de un inyector automático.

DETECTORES

El detector es la parte del equipo cromatográfico que permite detectar y ubicar en tiempo y espacio la posición de cada componente de una muestra a la salida de la columna cromatográfica.

Los tipos de detectores para cromatografía de líquidos de alta resolución son:

- Detector de índice de refracción

Este detector mide la diferencia de índice de refracción entre el disolvente puro y el disolvente que contiene la muestra.

Es poco sensible, lo cual limita su campo de aplicación y es afectado por cambio de temperatura. No puede utilizarse con programación de disolventes porque un cambio en la composición de la fase móvil va acompañado de un cambio en su índice de refracción.

- Detector UV

Se basa en la capacidad de absorción ultravioleta-visible (190-800 nm) de los analitos. La concentración del analito se determina por la ley de Lambert-Beer.

Los tipos de detectores de UV:

-Longitud de onda fija

-Longitud de onda variable

-Arreglo de diodos que puede proveer información sobre la pureza de las señales. El equipo de HPLC utilizado posee este tipo de detector (figura 1.8)

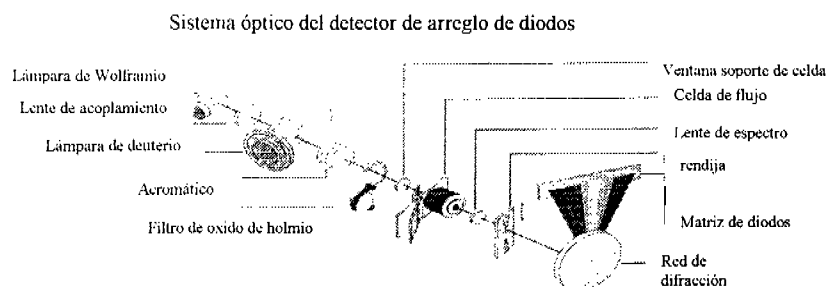


Figura 1.8 Sistema óptico del detector UV con arreglo de diodos

El detector UV es el más empleado en HPLC. Posee buena sensibilidad y rango lineal, y permite detectar analitos en el orden de los nanogramos. No es destructivo y puede utilizarse con gradientes de disolventes, con la única limitación de que éstos sean transparentes en la longitud de onda de trabajo. Es un detector muy poco sensible a los cambios de temperatura y de flujo.

- Detector de fluorescencia

El detector de fluorescencia se utiliza para el análisis de sustancias que presentan fluorescencia (fenómeno de emisión de luz de un analito tras la absorción de un fotón).

Su alta sensibilidad y selectividad lo convierte en un detector adecuado para el análisis de trazas. La selectividad se debe a que existen pocas sustancias de fluorescencia natural así como la utilización de dos longitudes de onda, una de excitación y otra de emisión. Al excitar la muestra a una dada longitud de onda varios componentes de la muestra podrían absorber energía, pero pocos emitirán además a la longitud de onda elegida.

- Espectrómetro de masas

Un obstáculo para acoplar la cromatografía de líquidos a la espectrometría de masas es la enorme cantidad de disolvente que acompaña al analito. Los

espectrómetros de masas son aparatos de alto vacío que no pueden recibir fácilmente 1 mL de disolvente por minuto por que el flujo debe ser bajo, para minimizar el efecto de ensanchamiento de banda. Por lo tanto se requiere de interfases capaces de transferir iones de la fase líquida a la fase gaseosa. Las interfases utilizadas son termospray, electrospray, ionización química a presión atmosférica (IQPA) y bombardeo con átomos rápidos (BAR).

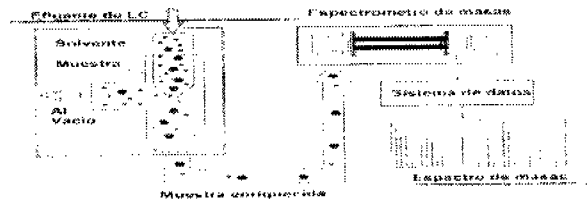


Figura 1.9 Cromatografía de líquidos acoplado a un detector de masas

COLUMNAS

Las columnas para cromatografía de líquidos se construyen con tubo de acero inoxidable de diámetro interno uniforme. La mayoría de las columnas tienen una longitud entre 10, 15 y 25 cm. El diámetro interno de las columnas es de 4 a 4.6 mm y los tamaños de las partículas de los rellenos más comunes es de 3, 5 o 10 μm .

Las partículas pequeñas son más eficientes pero requieren mayor caída de presión, así mismo el ensanchamiento de banda depende del tamaño de la partícula representado en el siguiente gráfico (figura 1.10):

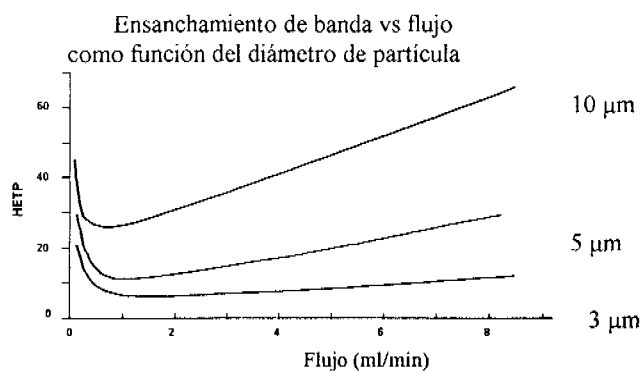


Figura 1.10 Ensanchamiento de banda vs flujo como función del diámetro de partícula.

Por lo que a tamaños de partículas mayores, mayor será el ensanchamiento de banda y por lo tanto menor eficiencia de la columna.

En la siguiente tabla se muestra el tamaño de columnas más utilizadas así como el tamaño de partícula utilizada en su fabricación y el número de platos teóricos obtenido:

| L (longitud mm) | dP (diámetro partícula μm) | N (numero de platos teóricos) |
|-----------------|--|-------------------------------|
| 250 | 5 | $16-20 \times 10^3$ |
| 150 | 5 | $10-12 \times 10^3$ |
| 100 | 5 | $7-9 \times 10^3$ |
| 100 | 3 | $12-14 \times 10^3$ |

En la tabla anterior se muestra que conforme disminuye la longitud de una columna con partículas del mismo tamaño el número de platos teóricos disminuye es decir disminuye la eficiencia; pero en una columna con la misma longitud al utilizar partículas más pequeñas aumenta la eficiencia.

-Empaques

La sílica gel empleada es un sólido poroso de gran área superficial (30 o más de

500 m²/g) y un diámetro de poro uniforme y comprendido entre 60 y 300 Å (figura 1.11), aunque pueden emplearse empaques de mayor diámetro de poro en la cromatografía de exclusión molecular.

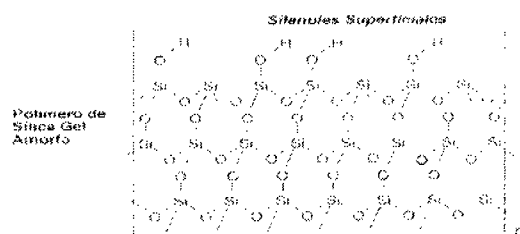


Figura 1.11 Estructura de la sílica gel

El relleno de las columnas está hecho de partículas de sílica gel y pueden ser de tres tipos (figura 1.12):

a) Macroporosa de superficie irregular las cuales poseen un diámetro de partícula entre 50-100 µm siendo utilizadas principalmente para separaciones preparativas por su alta capacidad, empaçado sencillo, su bajo costo y su baja eficiencia.

b) Pelicular esférica que poseen un diámetro de partícula entre 37-44 µm, siendo utilizadas para la fabricación de guarda columnas por ser eficientes, de empaçado simple; aunque resultan caras y de baja capacidad.

c) Microporosa las cuales pueden ser de superficie irregular o esférica, teniendo un diámetro de partícula entre 5-10 µm, tiene usos preparativos y analíticos son muy eficientes, de alta capacidad, alta velocidad aunque resulta de alto costo.

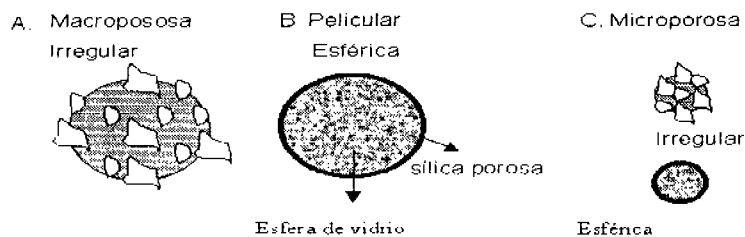


Figura 1.12 Tipos de partículas de sílica gel.

Los rellenos para cromatografía de líquidos de alta resolución de fase químicamente unida (CFQU) se clasifican como de fase inversa cuando el recubrimiento enlazado tiene un carácter no polar, y de fase normal cuando el recubrimiento contiene grupos funcionales polares. Tal vez el 75% de las técnicas de cromatografía de líquidos de alta resolución se llevan a cabo en columnas con rellenos de fase inversa.

La síntesis de empaques para CFQU se realiza con la formación de un enlace covalente entre la superficie hidrolizada de la sílice con un compuesto organoclorosilano (figura 1.13) produciendo una fase químicamente unida, térmica e hidrolíticamente estable.

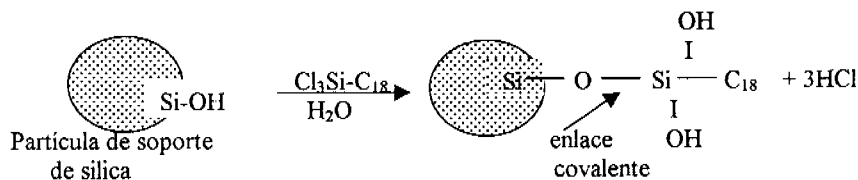


Figura 1.13 Síntesis de empaques BCP

La preparación de estos empaques se puede dividir en tres etapas:

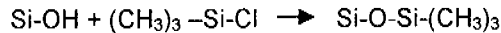
1.-Reacción química

- a) R Si Cl₃ (polimérica)
- b) R₂ Si Cl₂ (polimérica)
- c) R₃ Si Cl (monomérica)

2.-Hidrólisis



3.-Tamponamiento de extremos



A continuación se presentan algunos ejemplos más comunes de empaques químicamente unidos:

FASE REVERSA:



FASE NORMAL:



1.2.2.4 Teoría de cromatografía

Separación

El proceso cromatográfico está dividido en tres pasos: inyección, separación y elución. La migración de los componentes de la mezcla a través de la fase estacionaria es el resultado de dos fuerzas: la fuerza de la fase móvil por arrastrar el analito y la fuerza de la fase estacionaria por retenerlo; las cuales son fuerzas opuestas. Hay un equilibrio de distribución entre las dos fases para cada componente por lo tanto, cada componente de la mezcla migra en diferentes tiempos de acuerdo al equilibrio de distribución obteniendo una separación de los componentes de la mezcla, que eluyen de la columna al detector en forma de bandas o zonas (figura 1.14).

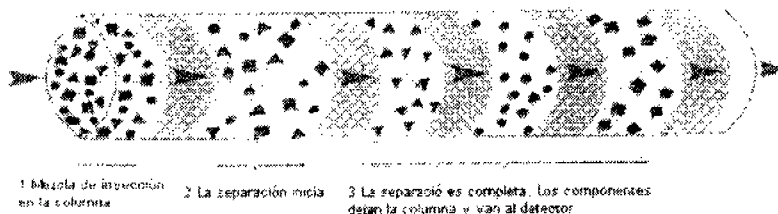


Figura 1.14 Proceso cromatográfico

La concentración de cada componente presente en una zona eludida es percibida por el detector y es proporcional al tamaño del pico registrado en el cromatograma.

Parámetros cromatograficos

Un cromatograma es un gráfico de la respuesta del detector, pudiendo ser la concentración del analito u otra cantidad usada como una medida de la concentración vs volumen o tiempo.

El gráfico obtenido (figura 1.15) da información de parámetros cromatograficos como lo es el tiempo de retención, tiempo muerto y área del pico.

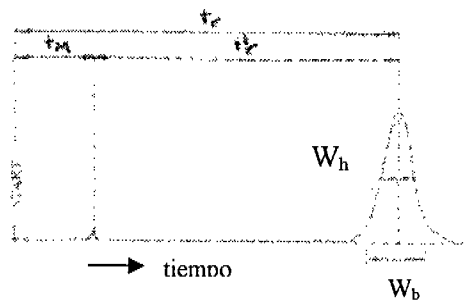


Figura 1.15 Cromatograma típico

Tiempo de retención (t_r): tiempo en que eluye cada soluto.

Tiempo muerto (t_m): tiempo en que se tarda un soluto en atravesar la columna sin interactuar con ella.

Tiempo de retención ajustado (t_r'): es el tiempo efectivo que el soluto permanece en la fase estacionaria y se puede calcular como la diferencia entre el tiempo de retención y el tiempo muerto.

$$t_r' = t_r - t_m$$

Factor de capacidad

La medida de la retención de un componente en la columna es llamada factor de capacidad (K'). Por lo tanto es el cociente entre el número de moles de soluto en la fase estacionaria y el número de moles en la fase móvil siendo proporcional al tiempo de retención del soluto y se calcula como:

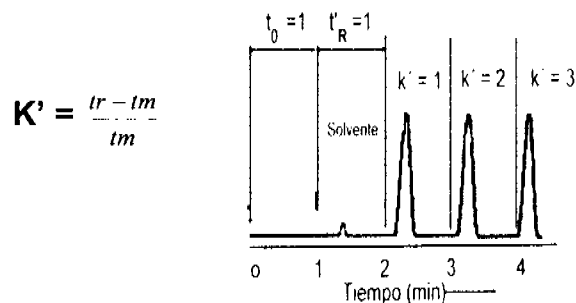


Figura 1.16 Factor de capacidad

El valor optimo del factor de capacidad esta en un rango de 2 a 10, ya que a valores menores de 2 existe poca retención del analito y valores mayores de 10 significan mayores tiempos de elución.

Selectividad

Los valores del factor de capacidad de los componentes se puede interpretar como una medida de la capacidad de una columna para distinguirlos. La capacidad para separar dos componentes es la selectividad de una columna. La selectividad esta expresada y se puede calcular como:

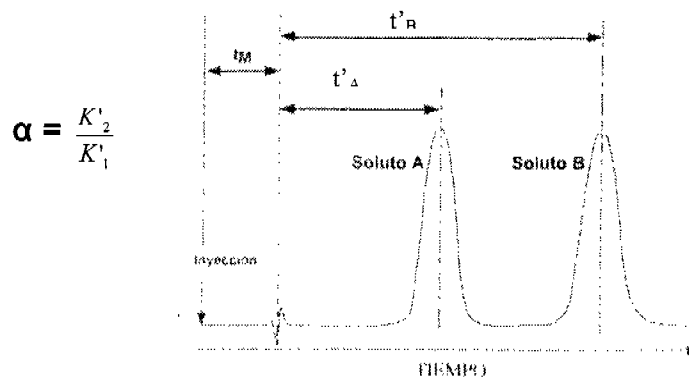


Figura 1.17 Selectividad

Si α es 1.0 no existe separación. Un valor de α deseable es de 1.5.

Eficiencia

Los picos anchos indican regularmente que el analito estuvo durante largo tiempo en la columna (K' alta) y cuando los picos son delgados se dice que la columna tiene alta eficiencia.

El número de platos teóricos (N) y la altura equivalente de plato teórico (HEPT) son una medida de la eficiencia de la columna; estos conceptos surgen al hacer una analogía de una columna cromatográfica como si fuera similar a una columna de destilación que estuviera constituida por numerosas capas contiguas denominadas "platos teóricos". Donde en cada plato se establece un equilibrio del analito entre la fase móvil y estacionaria. El movimiento del analito a través de la columna se trata como una transferencia por etapas de la fase móvil equilibrada de un plato al siguiente.

En HPLC el número de platos teóricos que se logra alcanzar es de 1000 o más.

Para calcular el número de platos teóricos (N) a partir del cromatograma se considera que la base del pico (W) es aproximadamente 4σ por lo que la ecuación para calcular N es:

$$N = 16 \left(\frac{tr}{W} \right)^2$$

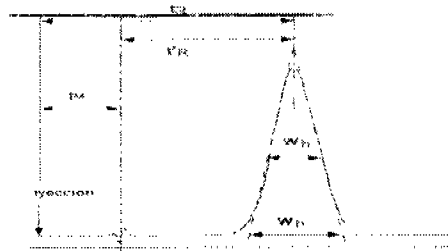


Figura 1.18 Número de platos teóricos

Cuanto mayor sea N más eficiente será la columna.

La altura equivalente del plato teórico se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$H = L / N$$

Donde L es la longitud de la columna, y es útil cuando se compara la eficiencia de dos columnas de diferentes longitudes. Un valor pequeño de H significa una alta eficiencia.

El proceso de ensanchamiento de banda disminuye la eficiencia, este proceso puede ser expresado por la ecuación de Van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{\mu} + C\mu$$

Donde H es la altura equivalente del plato teórico, μ es la velocidad lineal promedio, A es el termino de difusión de Eddy del cual, su aportación al ensanchamiento de banda surge debido a la multitud de caminos que las moléculas pueden tomar a través de la columna, como se muestra en la figura 1.19, la longitud de los caminos puede diferir significativamente. La difusión es directamente proporcional al diámetro de las partículas que componen el relleno de la columna.



Figura 1.19 Difusión de Eddy

El término de difusión longitudinal **B**, basado en que los solutos dentro de un líquido no permanecen inmóviles sino que se difunden en todas direcciones hasta que su concentración sea uniforme en todo el seno del líquido (figura 1.20). Este efecto es mínimo en cromatografía de líquidos, pero puede ser más notorio cuando se utilizan flujos muy bajos.

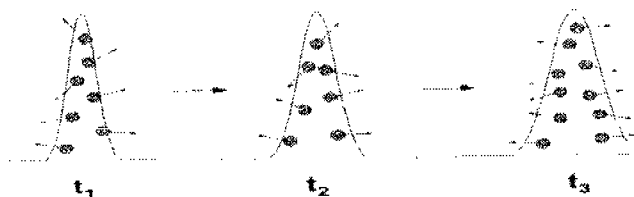


Figura 1.20 Difusión longitudinal

El término **C** es la transferencia de masa. Se refiere a la entrada y salida del analito en la fase estacionaria (figura 1.21). La contribución al ensanchamiento de banda resulta al quedar algo de analito en la fase estacionaria, pues el resto se encuentra en la fase móvil avanzando junto con esta. Este efecto puede ser disminuido utilizando columnas con partículas pequeñas.

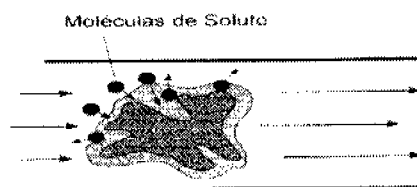


Figura 1.21 Transferencia de masa lenta (móvil a estacionaria).

La contribución de todos los términos en el ensanchamiento de banda son descritos en el siguiente gráfico (figura 1.22) de H vs μ :

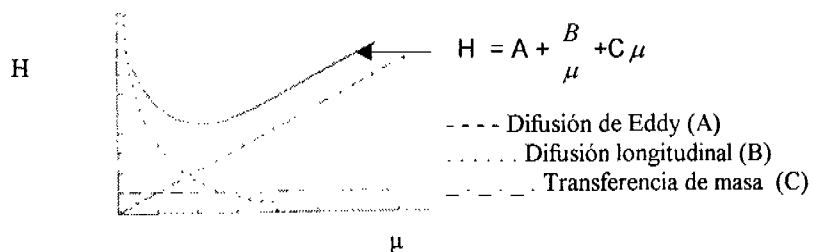


Figura 1.22 Gráfico de Van Deemter

En esta gráfica se muestra que hay un valor de μ a la cual H es mínima es decir la eficiencia es máxima. A μ menores se favorece la difusión longitudinal y a μ mayores dificultan los procesos de transferencia de masa.

Resolución (R)

La resolución de una columna es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos.

A partir de los datos obtenidos de un cromatograma se puede calcular con la siguiente ecuación:

$$R = \frac{\Delta t}{1/2(W_{b(1)} + W_{b(2)})}$$

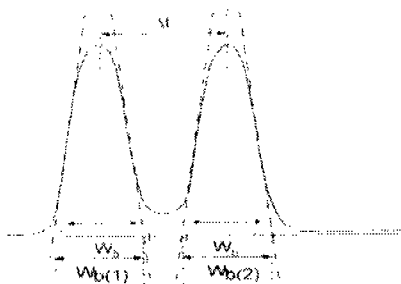


Figura 1.23 Resolución

La resolución resulta de las interacciones físicas que ocurre entre la muestra y la columna, por lo tanto la resolución puede ser expresada en términos de la contribución individual de las características de la columna: factor de separación (selectividad), eficiencia (N) y factor de capacidad (K') obteniendo la ecuación

maestra de la resolución:

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

Selectividad eficiencia capacidad

Los valores de α necesitan ser evaluados en el laboratorio experimentalmente cambiando la composición de la fase móvil y la columna.

La eficiencia mejora la resolución, a mayor cantidad de N mayor será R. Aumentando K' se mejora R, el control de K' se logra cambiando la composición de la fase móvil reduciendo la fuerza del disolvente.

1.2.3 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS

La mayoría de los métodos desarrollados para la determinación de acrilamida en alimentos procesados se basan en el uso del detector de masas acoplado, ya sea a cromatografía de líquidos o de gases. (11, 25, 26, 27 y 28).

A pesar que la espectrometría de masas es selectiva, la masa de la acrilamida o sus fragmentos iónicos no son específicos, debido a que la masa de la acrilamida es baja (71 g/mol) y sus fragmentos iónicos también lo son, y por los co-extractos que se pueden encontrar en la misma magnitud de la relación m/z, que la acrilamida, procedentes de la matriz del alimento. En algunos de los procedimientos se requiere realizar una derivación a la muestra, para que, de esta manera aumente la masa de los fragmentos iónicos; lo cual resulta en largos tiempos de preparación de muestras y el uso de disolventes costosos.

La mayoría de las metodologías hacen uso de la extracción en fase sólida (EFS) como técnica para la concentración de acrilamida y eliminación de analitos contenidos en la matriz del alimento que pudieran interferir durante el análisis; aunque si bien, no se ha encontrado una fase sólida que adsorba o rechace únicamente a la acrilamida. Algunas metodologías reportan el uso de fases sólidas de intercambio catiónico y otras el uso de fases sólidas con balance hidrofílico-lipofílico y una mezcla de C18 con intercambio aniónico; aunque son diferentes las fases sólidas utilizadas, se reportan buenos resultados en todos los casos

Un aspecto más que presentan algunas metodologías en la preparación de la muestra, es el uso de reactivos (hexacianoferrato de potasio y sulfato de zinc) y grandes cantidades de disolventes orgánicos (ejemplo hexano, acetonitrilo) los cuales representan mayores costos.

La metodología propuesta por la FDA utiliza EFS y HPLC/MS en la cual, a diferencia de las demás no requiere de un proceso de derivación, no utiliza reactivos ni grandes cantidades de disolventes orgánicos en la preparación de la muestra.

El problema en el país es que no se cuenta con un número suficiente de HPLC/MS como para poder abordar en forma sistemática el análisis de acrilamida en alimentos. Es por ello que se propone el uso de HPLC acoplado a un detector de UV-Vis.

1.3 LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN^{29 y 30}

Es práctica común reportar el límite de detección como prueba que se es capaz de generar información confiable para concentraciones bajas (trazas).

Definición:

El límite de detección es un número expresado en concentración que define la menor concentración de un analito que genera una señal estadísticamente diferente (95% de confianza) a la señal que generaría un blanco.

Al especificar límite de detección o límite de cuantificación se transmite la idea del desempeño alcanzable con el método. El analista puede caracterizar mejor sus determinaciones al presentar un resultado $X > LC$, indicar un contenido menor que el LC e indicar que el compuesto no se ha detectado con $X < LC$.

Para determinar límite de detección se puede generar una curva de calibración, es práctica común el fortificar un blanco o una matriz con el analito. La fortificación se inicia en un valor de concentración cercano al valor esperado de LD y se incrementa la concentración hasta por lo menos 10 veces ese valor esperado. Con los valores obtenidos se construye una curva de calibración para el procedimiento analítico; con el objeto de tener una evaluación correcta, se utilizan en el análisis de regresión tan solo los últimos cinco puntos. De manera que al añadir un punto de menor concentración se elimina el de más alta concentración y en cada ocasión se evalúa y se compara con el valor de r anterior; en el momento en que el valor de r cambia en más de 5% esto indica que la curva de calibración pierde linealidad y que por lo tanto se está más cerca del valor de límite de detección.

Para la determinación matemática-estadística del límite de detección se deberán considerar la recta de calibración y los intervalos de confianza de la misma. Los valores en el eje de las y (intercepto) de las rectas correspondientes a los intervalos de confianza de la recta de calibración, representan los valores

(probabilidad) de la señal que sería generada por un blanco o matriz sin fortificar. De manera que el intercepto de la recta superior del intervalo de confianza en el eje de las y representa la altura máxima que podría ser generada por un blanco.

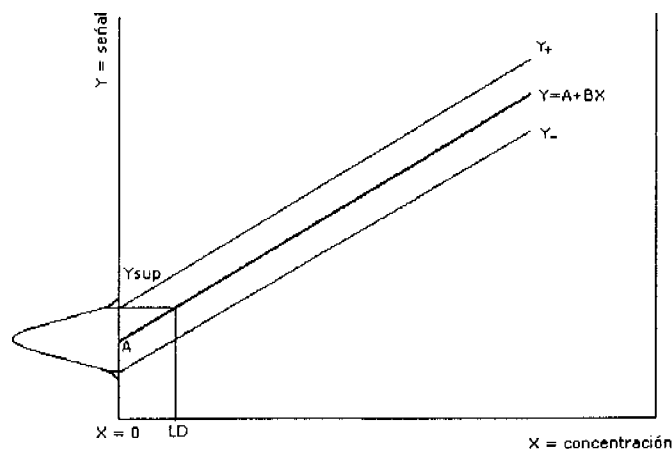


Figura 1. 24 Limite de detección.

De esta forma se refleja en forma clara las buenas prácticas de laboratorio y esto ha sido la base para la definición de límite de detección en muchos métodos oficiales (NMX, EPA, FDA). El valor del intervalo de confianza superior para la recta de calibración se determina para una probabilidad del 95% que es suficiente para la mayoría de los análisis que se realizan en los laboratorios ambientales. Dado que solo el valor superior es de interés y no el máximo y el mínimo al mismo tiempo, se tiene un estudio estadístico de una sola cola. De manera que el valor estadístico se considera al 95% para una prueba de 1 cola y para un único futuro análisis.

Las ecuaciones de los intervalos de confianza para la recta de calibración corresponden en realidad a funciones hiperbólicas, sin embargo con un trabajo analítico adecuado y empleando un intervalo de concentraciones corto, estas

hipérbolas se comportan como líneas rectas, paralelas a la recta de calibración. Sin embargo, esto no importa cuando se realiza el tratamiento matemático-estadístico, ya que las ecuaciones desarrolladas representan las características hiperbólicas reales de la calibración.

El valor del intercepto del intervalo de confianza de la recta de calibración en algunas ocasiones llega a generar valores negativos. Esto es una limitación del procedimiento.

Límite de detección efectivo:

Cuando se repite el análisis de una muestra conteniendo trazas del analito, se obtienen diferentes valores de concentración debidas a la dispersión en la medición de las señales generadas. Los valores de concentración encontrados para esa muestra dan lugar a una distribución de tipo gaussiano. Si ahora se prepara un blanco o una matriz "fortificada" a una concentración equivalente al valor de límite de detección y se repitiese el análisis un número grande de veces se encontraría también que los valores de concentración calculados estarían dispersos (también con una distribución de tipo gaussiano) alrededor del valor de límite de detección. Si se practicase un número grande de repeticiones se encontraría que el 50% de los valores estarían por debajo de límite de detección y en otro 50% estaría por arriba de límite de detección. De manera que en un 50% de los casos el analito sería detectado y en otro 50% en los casos se reportaría como no detectado.

Al fijar el límite de detección en el valor del intercepto de la recta superior del intervalo de confianza hace que en un análisis exista un error de identificación del 50%. (figura 1. 25)

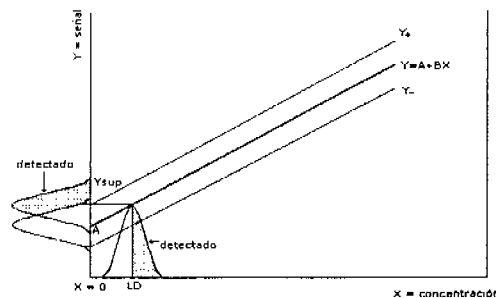


Figura 1.25. Límite de detección efectivo.

Lo que es deseable es disminuir la posibilidad de error en la detección de la presencia de analitos en las muestras y para ello es necesario fijar un nivel de confianza más alto (95%). Al hacer esto entonces se estaría asumiendo que para que una señal real de un analito presente se distinga inequívocamente de la señal que podría generar un blanco, las curvas de distribución de probabilidad no deben de trasladarse como se muestra en la figura 1.26.

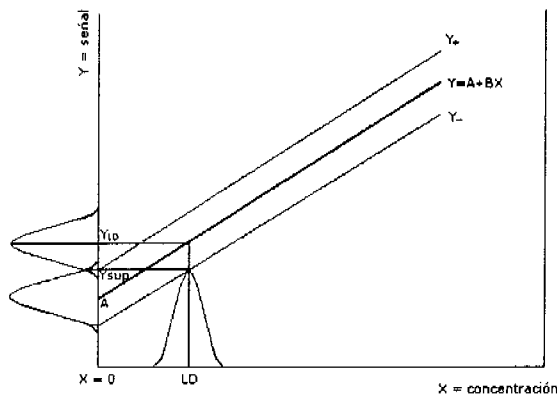


Figura 1. 26. Definición de limite de detección.

En la figura se aprecia claramente que la intersección del valor del límite de detección correspondiente al punto de intersección de la curva Y^* (Y_{sup})

extrapolada a su intersección con la curva Y' coincide con el valor mínimo de la curva de distribución probabilística de una señal real en el método. Es de esta forma que se evita el cometer un error del 50% en la detección de un analito en la muestra. Definiendo así el límite de detección se tendrá la certeza absoluta de que una señal generada por un analito en la matriz efectivamente corresponde al analito y no al efecto del blanco por co-extracción de otros componentes de la matriz.

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula con el valor de Y^* para x =límite de detección y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta Y . Este valor corresponde al límite de cuantificación. En la figura 1.27 se muestra la representación grafica del límite de detección y límite de cuantificación.

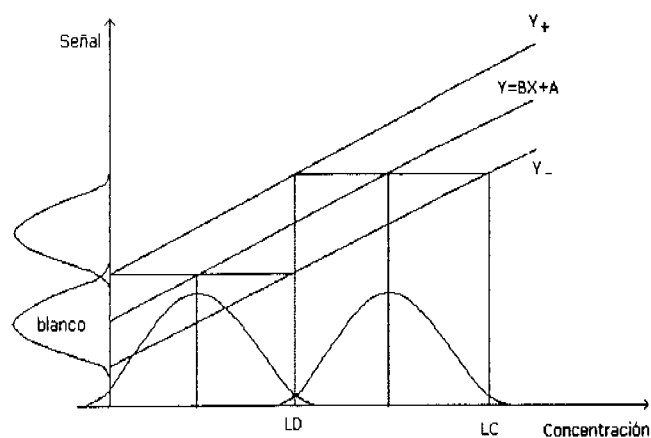


Figura 1.27 Representación grafica de limite de detección y límite de cuantificación.

CAPITULO II

DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental de este trabajo consto de 4 partes:

1. Optimización de parámetros cromatográficos
2. Optimización de proceso de extracción de acrilamida
3. Determinación de límite de detección y límite de cuantificación
4. Cuantificación de acrilamida en muestras comerciales

2.1 Equipo y material

Para la elaboración de este trabajo se utilizó un equipo de HPLC serie 1100 Agilent que consta de cabina para disolventes, modulo desgasificador, un sistema de bombeo cuaternario, inyector automático, detector de UV con arreglo de diodos y detector de fluorescencia.

*Balanza analítica electrónica marca OHAUS con precisión de 0.1 mg.

*Centrífuga 4500 rpm modelo J600 marca SOLBAT.

*Vortex marca Heidolph 60 Hz Ac 115 v.

*Licuadora Osterizer clásica súper luxe de 3 velocidades.

*Potenciómetro marca Cole parmer modelo 05669-20 con electrodo combinado de vidrio-calomel.

*Equipo de filtración al vacío Millipore

*Viales de vidrio con tapa de capacidad de 2 mL marca Agilent

*Cartuchos para extracción en fase sólida: HLB 6cc (hidrophilic-lipophilic balance) fabricante Waters.

*Cartuchos para extracción en fase sólida: octadecil spe fabricante J.T. Baker

*Filtros marca Millipore con un tamaño de poro de 0.45 μm .

*Material volumétrico clase A: Matracas volumétricos aforados de 5.10. 25 y 100 mL.

*Pipetas: 20-200 μL , 2000 1000 μL , 1-5 mL y 2-10 mL

*Puntas para pipetas

*Vasos de precipitado: 50 y 100 mL

*Pipetas pasteur desechables

*Espátula

*Tubos para centrífuga de 15 mL con tapa

*Vidrio de reloj

*Matracas erlenmeyer 100 mL

2.2 Reactivos y disolventes

| Nombre | Marca | Lote |
|--|-----------------------------------|------------------|
| Acilamida 99.0% pureza | Pharmacia LKB Biotecology Inc. | 425920 |
| Ácido acético | Mallinckrodt | 2504 V02D53 |
| Metanol (grado HPLC) Reactivo analítico | J.T. Baker J. T. Baker | X41C21 AS0C12 |
| Metanol (grado laboratorio) | Mallinckrodt | H603P41D03 |
| Acetonitrilo (grado HPLC) | J.T. Baker | V07469 |
| Hidróxido de sodio | Sigma | 67H15601 |
| Cloruro de metileno Reactivo analítico | Mallinckrodt | 4877PTN |
| Acido fórmico | J. T. Baker | B51341 |
| Cloruro de sodio | Sigma | 127H0485 |
| Silica gel 60 (0.2-0.5 mm) | Merk | 406137 |

Como disolvente se utilizó agua desionizada.

2.3 Preparación de disoluciones

- Acrilamida

Disolución de acrilamida aproximadamente 100 ppm. Se pesó 0.0025 g de acrilamida y se aforó a 25 mL con agua desionizada.

- Cloruro de sodio 2 M

Se pesó 2.922 g de NaCl y se llevo al aforo con 25 mL con agua desionizada.

- Metanol (1% ácido fórmico)

Se tomó con una pipeta 0.25 mL de ácido fórmico y se llevo al aforo con 25 mL de metanol.

- Silica gel

En un vidrio de reloj se pesó 5 g de silica gel y se metió a la estufa durante 2.5 hr a 100°C.

- Hidróxido de sodio 1.0 N

Se pesó 1.0 g de NaOH, se llevó al aforo con 25 mL de agua desionizada (tibia) y se sometió a agitación durante 3 min. La disolución tenía un pH de 14.

- Fase móvil ácido acético 1.0% en agua (pH 2.5)

Se colocó 1 mL de ácido acético en un matraz de 100 ml y se adicionaron 99.0 mL de agua desionizada y se homogenizó.

- Fase móvil (agua) pH 3.0

Se adicionó gota a gota ácido acético con pipeta Pasteur a 100 mL de agua hasta llegar a un pH de 3 y se homogenizó.

- Fase móvil (agua) pH 4.0

Se adicionó gota a gota ácido acético con pipeta Pasteur a 100 mL de agua hasta llegar a un pH de 4 y se homogenizó.

- Fase móvil (agua) pH 5.0

Se adicionó gota a gota NaOH 1.0 N con una pipeta Pasteur a 100 ml de agua hasta llegar a un pH de 5 y se homogenizó.

- Fase móvil (agua) pH 7.0

Se adicionó NaOH 1.0 N con pipeta Pasteur a 100 ml de agua hasta llegar a un pH de 7 y se homogenizó.

- Disoluciones de acrilamida para límite de detección y límite de cuantificación

Disolución de acrilamida 10 ppm. Se tomo de la disolución de acrilamida de 100 ppm 2.5 mL y se aforo con agua desionizada a 25 mL.

Disoluciones de acrilamida 1.5, 1.0, 0.25, 0.1 y 0.08 ppm. Se tomó de la disolución de acrilamida de 10 ppm alícuotas de 1.5, 1.0, 0.5, 0.25, 0.1, 0.08 mL y se aforo con agua desionizada en matraces de 10 mL.

- Disoluciones de acrilamida para curva de calibración de acrilamida

Disolución de acrilamida 1.5 ppm. Se tomo de la disolución de acrilamida de 100 ppm 0.375 mL y se aforo con agua desionizada a 25 mL.

Disoluciones de acrilamida 1.5, 1.25, 1.0, 0.075 y 0.05 ppm. Se tomó de la disolución de acrilamida de 1.5 ppm alícuotas de 8.3, 6.7, 0.5, 0.335 ml y se aforaron con agua desionizada en matraces de 10 mL.

2.4 Optimización de parámetros cromatograficos

El uso de la acrilamida en plantas de tratamiento de agua, aunado a su toxicidad, ha hecho que se desarrollen métodos de análisis para su determinación y cuantificación a nivel de trazas en agua. Así la EPA desarrollo dos metodologías una por cromatografía de gases (EPA 8032 A) y la otra por cromatografía de líquidos de alta resolución (EPA 8316).

El método 8032-A se basa en la bromación de la doble ligadura de la acrilamida empleando $KBr/HBr/Br_2$ y su posterior análisis por cromatografía de gases empleando un detector de ionización de flama.

El método 8316 es de carácter genérico y permite el análisis simultáneo de acrilamida, acrilonitrilo y acroleína empleando cromatografía de líquidos de alta resolución y un detector de UV-vis (HPLC/UV-Vis).

Para el método 8316 se reporta un límite de detección de $30 \mu\text{g/L}$ y en el 8032-A el límite de detección es de $0.032 \mu\text{g/L}$. Como se pone en evidencia el método por cromatografía de gases permite una mucho mayor sensibilidad que el método por cromatografía de líquidos de alta resolución, sin embargo éste método requiere de una buena capacitación del analista para poder obtener buenos recobros y además se presentan muchas interferencia.

En ambos casos los métodos han sido desarrollados para una matriz relativamente simple que es el agua potable y natural, en donde se esperan pocas interferencias.

Con el descubrimiento de la presencia de acrilamida en alimentos se han desarrollado varios métodos sin embargo en todos ellos el elemento de medición es un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas (HPLC/MS). En todos los casos el sistema de cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas se emplea en el modo de detección selectiva de iones lo que permite que las interferencias presentes en la muestra (sustancias co-extraídas de las

muestras) no generen una señal en el registro final; con lo que se obtienen excelentes límites de detección.

Al no contar, en el país, con un número suficiente de estos equipos es que se decidió a buscar las mejores condiciones por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector de ultravioleta-visible para tratar de determinar acrilamida en alimentos fritos en México.

El análisis de acrilamida por cromatografía de líquidos de alta resolución presenta algunos problemas como lo es la descomposición de la acrilamida en medios ácidos y en los métodos desarrollados por cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a un espectrómetro de masas en todos los casos emplean medios ácidos. Esto sugería que si en dichos métodos se estaba descomponiendo la acrilamida y alcanzaban a pesar de ello, buenos límites de detección, si se logra evitar la descomposición de acrilamida, se podrían alcanzar límites de detección cercanos a estos.

Para ello se estudió el comportamiento de la acrilamida en varias composiciones diferentes de fase móvil. A continuación se presentan los estudios realizados:

- Lo primero que se realizó fue la evaluación de la fase móvil propuesta por la Food and Drug Administration (FDA) para el análisis de acrilamida en alimentos; aunque dicha metodología utiliza HPLC/MS, se deseaba determinar si la fase móvil propuesta funcionaba también para HPLC/UV-Vis. La fase móvil consiste en 99.5% de agua(0.1% ácido acético) y 0.5% metanol la cual tiene un pH de 2.5. La evaluación consistió en inyectar por triplicado en equipo de HPLC una disolución de acrilamida de 100 ppm, bajo las siguientes condiciones instrumentales:

Fase estacionaria: Columna BDS C18 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil

Volumen de inyección: 20 μ L

Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 26 °C

λ = 208 Y 228 nm

Posteriormente se evaluó fases móviles con pH de 3,4,5 y 7.

Dentro de la optimización de los parámetros cromatográficos se buscó un factor de capacidad (K') mayor a 2, así como una fase móvil y una columna que permitieran una mejor separación y tiempos de análisis razonables. También se evaluaron los parámetros de tiempo de retención, número de platos teóricos y altura equivalente de platos teóricos; para confirmar la eficiencia del sistema cromatográfico.

En la búsqueda de factor de capacidad mayor a 2 se utilizaron diferentes fases móviles.

Las condiciones instrumentales utilizadas fueron las mencionadas anteriormente y las fases móviles utilizadas fueron:

97% agua desionizada 3% acetonitrilo

98% agua desionizada 2% acetonitrilo

99% agua desionizada 1% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% metanol

Posteriormente se obtuvieron los valores de factor de capacidad cambiando la fase estacionaria por una de Fenil $5\mu\text{m}$ de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud, fabricante J.T. Baker. Se utilizaron las siguientes fases móviles:

99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% metanol

El resto de las condiciones instrumentales fueron:

Volumen de inyección: $20\mu\text{l}$ Flujo: 1 ml/min

Temperatura: $26\text{ }^\circ\text{C}$ $\lambda = 208 \text{ Y } 228 \text{ nm}$.

Se evaluó la columna C18 $5\mu\text{m}$ de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 250 nm de longitud, fabricante Whatman partisil; se obtuvo el factor de capacidad con las siguientes fases móviles:

99% agua desionizada 1% metanol

99.5% agua desionizada 0.5% metanol.

El resto de las condiciones instrumentales fueron:

Volumen de inyección: 20 μ l Flujo: 1 ml/min
Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm. λ = 208 Y 228 nm

2.5 Optimización del proceso de extracción de acrilamida

Se realizó una curva de calibración con estándares de acrilamida de concentraciones de 1500, 1250, 1000, 75 y 50 ppm.

I) Siguiendo dentro de lo posible la metodología propuesta por la FDA para el proceso de extracción de acrilamida en alimentos. Se prepararon dos muestras una fortificada y una sin fortificar (Diagrama 1) y se analizaron todas las fracciones obtenidas en la extracción en fase sólida. Se siguió el método propuesto por la FDA.

II) Se probó un procedimiento de extracción fase sólida propuesto por la corporación Waters. Se realizó un muestra fortificada y una sin fortificar siguiendo el procedimiento del diagrama 1 hasta la obtención de extracto filtrado en equipo Millipore y después se siguió el diagrama 3.

III) Después de haberse obtenido resultados no cuantificables de acrilamida en las muestras de papas fritas sin fortificar, se decidió fortificar una muestra para evaluar la metodología. Se modificó el procedimiento y se siguió procedimiento del diagrama 2, la modificación fue eluir dos veces el cartucho HLB con 2 mL de agua ya que se sospechaba que se estuviese reteniendo acrilamida en el cartucho. (Se utilizó la columna Fenil 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante J.T. Baker).

IV) Al obtener acrilamida en una segunda elución, se decidió realizarla así en lo sucesivo por lo que se preparó una muestra de papas fritas sin fortificar para observar si con esta doble elución se obtenían resultados cuantificables de

acrilamida. (Se utilizó la columna Fenil 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante J.T. Baker).

V) Con la finalidad de tratar de purificar aún más el extracto que contiene la acrilamida se utilizó una columna de silica gel pues se sospechaba que algunas grasas no estaban siendo eliminadas durante el proceso de extracción y como es sabido la silica gel tiene la capacidad de retener grasas. Se siguió el procedimiento del diagrama 2 para muestra no fortificada, al extracto final se le adiciono 1.3 mL de la disolución estándar de acrilamida (5 ppm) para tener una concentración de aproximadamente 1.2 ppm, se tomo un poco y se analizó en HPLC y 3 mL se hicieron pasar por una columna de silica gel, lo obtenido se recolecto y se analizó en HPLC. (Se utilizó la columna Fenil 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante J.T. Baker).

VI) Se realizó un estudio de recobro de la extracción en fase sólida. Para ello se procesaron dos muestras de papas fritas fortificadas con acrilamida. Se siguió el procedimiento del diagrama 2 para muestra fortificada y el extracto obtenido al final se hizo pasar por un cartucho C8 y se colocó en un matraz aforado de 5 mL y se llevo al aforo con agua. Cada fracción de extracción en fase sólida se analizó en HPLC.

VII) Después de haber analizado los resultados anteriores, se decidió preparar una muestra de papas fritas eliminando la parte de extracción en fase sólida. Se siguió el procedimiento del diagrama 2 hasta la obtención del extracto filtrado en equipo Millipore.

2.6 Límite de detección y cuantificación

Para la evaluación de límite de detección y cuantificación se realizó una curva patrón de estándares de acrilamida. Se inyectó por triplicado en HPLC una serie de concentraciones de acrilamida de 1000, 500, 250, 100 y 80 ppb

Condiciones instrumentales:

Fase móvil: 99.5% agua 0.5% metanol

Volumen de inyección: 20 μ L

Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 26 °C

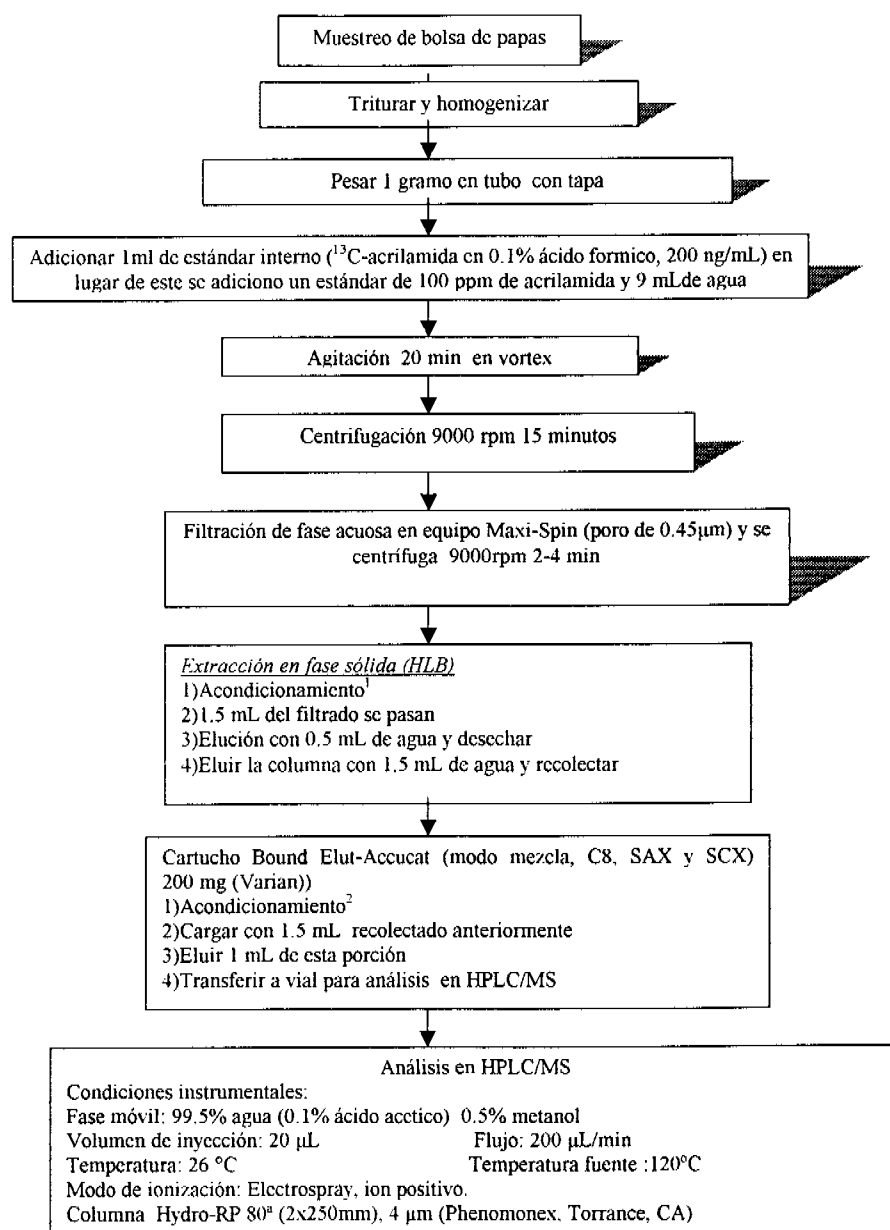
λ = 208 nm

Columna BDS C18 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil.

2.7 Cuantificación de acrilamida en muestras comerciales

Debido a los buenos resultados obtenidos después de eliminar extracción en fase sólida, se decidió adoptar esta metodología y se analizaron 5 diferentes lotes de cada una de las siguientes marcas comerciales de papas fritas: Sabritas sal, Sabritas adobadas, Sabritas limón, Chips sal, Chips jalapeño; y papas a la francesa: Mc Donalds y Burger King. Se siguió el procedimiento del diagrama 2 hasta la obtención del extracto filtrado en equipo Millipore.

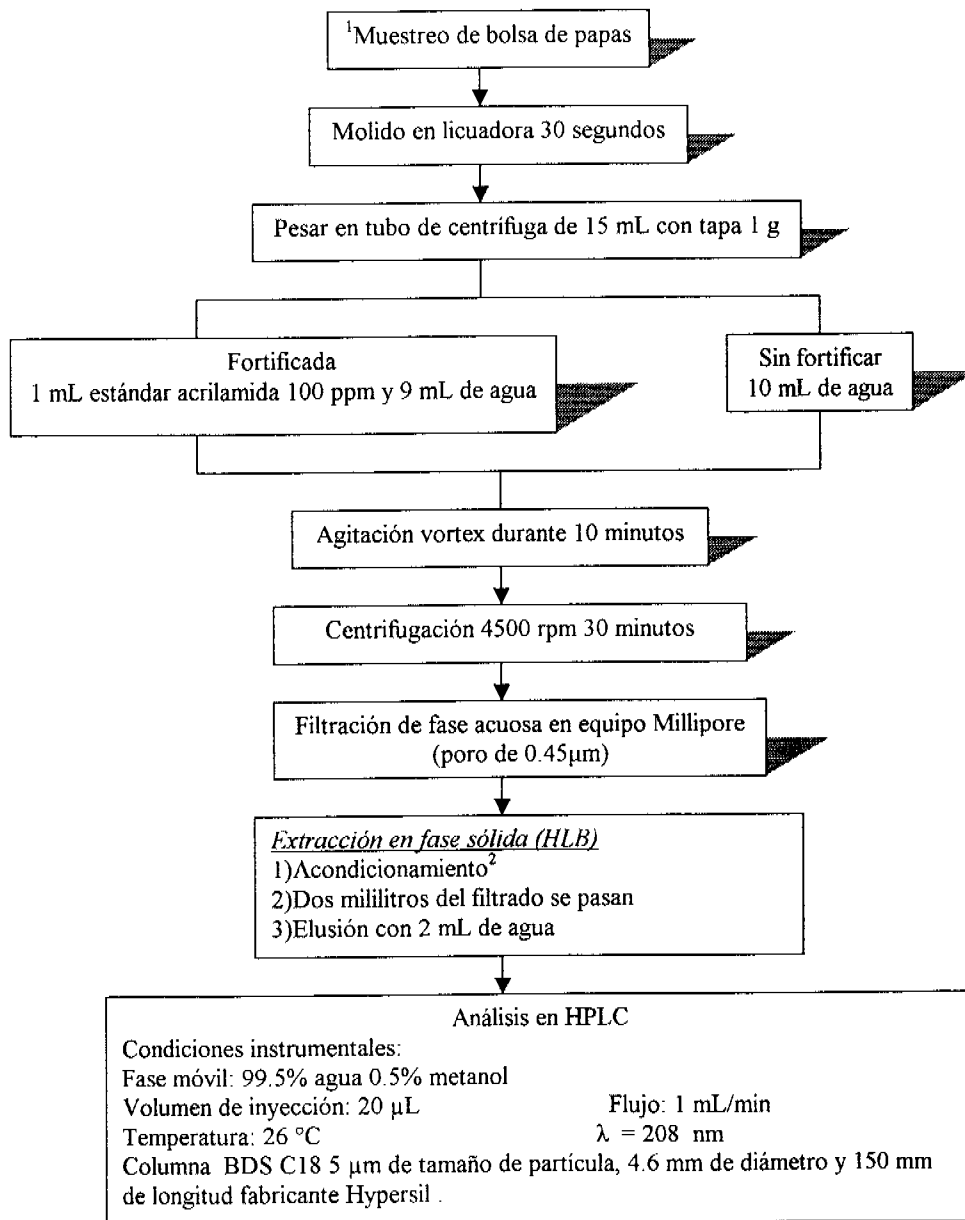
Diagrama 1



¹ Acondicionamiento: se agregó 3 mL de metanol, seguido de 3 mL de agua y se desecha.

² Acondicionamiento: se agregó 2.5 mL de metanol, seguido de 2.5 mL de agua y se desecha.

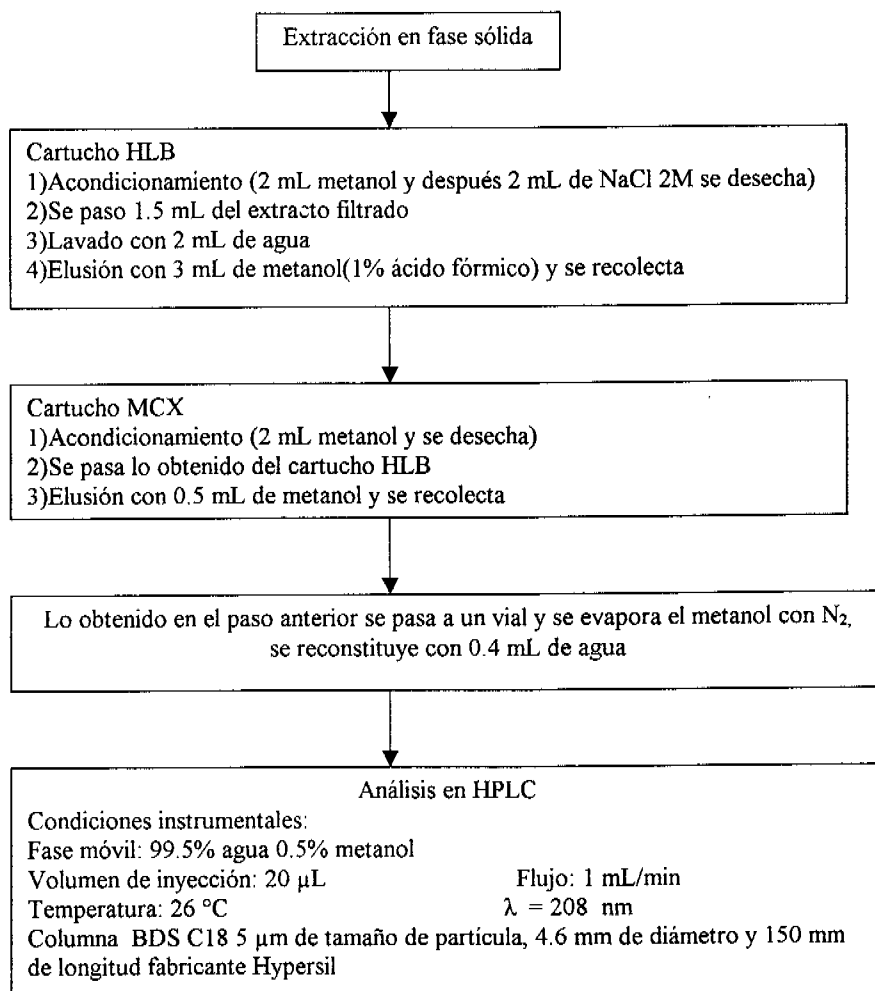
Diagrama 2



¹El muestreo consistió en vaciar el contenido de la bolsa de papas y dividirlo en cuatro partes, se tomo de cada parte dos papas al azar

²Acondicionamiento: se agrego 3 mL de metanol, seguido de 3 mL de agua y se desecha.

Diagrama 3



CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Optimización de parámetros cromatográficos

La fase móvil propuesta por la Food and Drug Administration (FDA) consiste en 99.5% de agua (0.1% ácido acético) y 0.5% metanol con un pH de 2.5. En estas condiciones se inyectó por triplicado una disolución de acrilamida de 100 ppm, bajo las siguientes condiciones instrumentales:

Columna BDS C18
Fase estacionaria: octadecilo
tamaño de partícula: 5 μm
diámetro: 4.6 mm
longitud: 150 mm de
fabricante: Hypersil
volumen de inyección: 20 μL
flujo: 1 mL/min
temperatura: 26 °C
longitud de onda (λ) = 208 Y 228 nm

En estas condiciones se obtiene un cromatograma como el que se muestra en la figura 3.1.

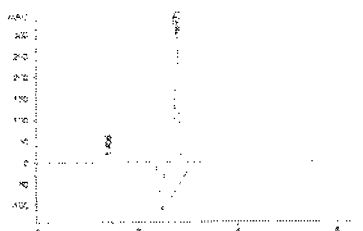


Figura 3.1 Cromatograma de acrilamida en fase móvil recomendada por FDA

La descomposición de la acrilamida se pone de manifiesto por la presencia de un pico invertido que aparece justo antes de la señal de acrilamida. La presencia de esta señal hace que la cuantificación total de la acrilamida sea incierta. A pesar de

que con el software incorporado a los nuevos equipos de HPLC es factible el cuantificar el área del pico invertido, la selección de la línea base es difícil y con ello se incrementa la incertidumbre en la medición del área. Si se logra eliminar la descomposición de la acrilamida se mejorarán notablemente los límites de detección y cuantificación de la señal.

La descomposición de la acrilamida se debe a la interacción con los sitios activos de la columna y la conexiones metálicas en presencia de un medio ácido. Para demostrarlo se realizaron una serie de experimentos aumentando el valor del pH de la disolución portadora.

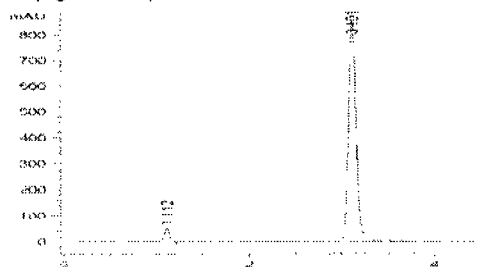
Estudio de la descomposición de la acrilamida:

Se prepararon disoluciones portadoras de pH 3, 4, 5 y 7 y en las mismas condiciones cromatográficas se inyectó una disolución de 100 ppm de acrilamida; obteniéndose los siguientes cromatogramas:

Cromatograma a pH 3 (figura 3.2)



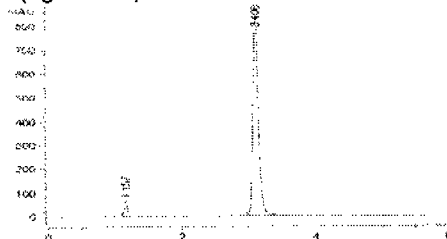
Cromatograma a pH 4 (figura 3.3)



Cromatograma a pH 5 (figura 3.4)



Cromatograma a pH 7 (figura 3.5)



De los cromatogramas obtenidos es claro que a partir de pH = 4 se evita la descomposición de la acrilamida. Es por ello que se seleccionó el usar agua desionizada que tiene un pH de 5-6, para todas las siguientes pruebas.

Optimización de los parámetros cromatográficos.

Un aspecto fundamental en una separación cromatográfica es el de demostrar que si existe una interacción efectiva entre la columna y el analito, esta interacción puede ser evaluada a través de el valor de factor de capacidad (K'). Cuando el valor de K' es mayor de 2 indica que el analito está siendo retenido por la fase estacionaria. Valores de K' mayores a 10 tan sólo conducen a un aumento en el tiempo de análisis y no se mejora la separación; es por ello que se busca siempre un valor de K' entre 2 y 10.

Para optimizar el valor de K' , se pueden modificar tanto las características de la columna (α) como las propiedades de la fase móvil (poder de elución de la disolución portadora).

En la búsqueda de $K' > 2$ se utilizaron diferentes fases móviles.

Las condiciones instrumentales utilizadas fueron:

Fase estacionaria: Columna BDS C18 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil.

Volumen de inyección: 20 μ L Flujo: 1 mL/min
Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm.

Y las fases móviles utilizadas fueron.

97% agua desionizada 3% acetonitrilo

98% agua desionizada 2% acetonitrilo

99% agua desionizada 1% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% metanol

Posteriormente se obtuvo los valores de K' cambiando la fase estacionaria por la columna Fenil 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante J.T. Baker. Se utilizaron las siguientes fases móviles:

99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo

99.5% agua desionizada 0.5% metanol

El resto de las condiciones instrumentales fueron:

Volumen de inyección: 20 μ L Flujo: 1 mL/min
Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm.

Se evaluó la columna C18, tamaño de partícula de 5 μ m, 4.6 mm de diámetro y 250 mm de longitud fabricante Whatman partisol; se obtuvo la K' con las siguientes fases móviles:

99% agua desionizada 1% metanol

99.5% agua desionizada 0.5% metanol.

El resto de las condiciones instrumentales fueron:

Volumen de inyección: 20 μ L Flujo: 1 mL/min
Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm.

En todos los casos se evaluaron los demás parámetros cromatográficos como son tiempo de retención, factor de capacidad, número de platos teóricos y altura equivalente a un platos teórico .

Los resultados se muestran en la tabla 3.1

| Condiciones | tr (min) | K' | N | H |
|--|----------|-----|-------|--------|
| Columna BDS C18 97% agua desionizada 3% acetonitrilo | 2.3 | 1.3 | 5877 | 0.0255 |
| Columna BDS C18 98% agua desionizada 2% acetonitrilo | 2.4 | 1.4 | 9216 | 0.0162 |
| Columna BDS C18 99% agua desionizada 1% acetonitrilo | 2.6 | 1.6 | 22073 | 0.0068 |
| Columna BDS C18 99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo | 2.7 | 1.7 | 5184 | 0.0289 |
| Columna BDS C18 99.5% agua desionizada 0.5%metanol | 3.1 | 2.1 | 6834 | 0.0219 |
| Columna Fenil 99.5% agua desionizada 0.5% acetonitrilo | 4.0 | 1.5 | 14047 | 0.0107 |
| Columna Fenil 99.5% agua desionizada 0.5% metanol | 4.3 | 1.6 | 13148 | 0.0115 |
| Columna Whatman C18 99% agua desionizada 1% metanol | 5.5 | 1.6 | 21511 | 0.0116 |
| Columna Whatman C18 99.5% agua desionizada 0.5% metanol | 6.4 | 2.0 | 65536 | 0.0004 |

Tabla 3.1 Muestra los parámetros cromatograficos para diferentes fases móvil y columnas.

De los resultados obtenidos se concluye que las mejores condiciones para la separación de la acrilamida son:

Fase estacionaria: Columna BDS C18 5µm de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil .

Fase móvil: 99.5% agua desionizada 0.5% metanol

Volumen de inyección: 20µL Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm.

3.2 OPTIMIZACION DEL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ACRILAMIDA

Con estas condiciones de análisis, se generó una gráfica de calibración.

La gráfica de calibración se generó a partir de disoluciones de acrilamida en agua de concentraciones 1500, 1250, 1000, 75 y 50 ppb . Con ellas se obtuvo la siguiente gráfica de calibración:

Gráfica de calibración con estándares de acrilamida:

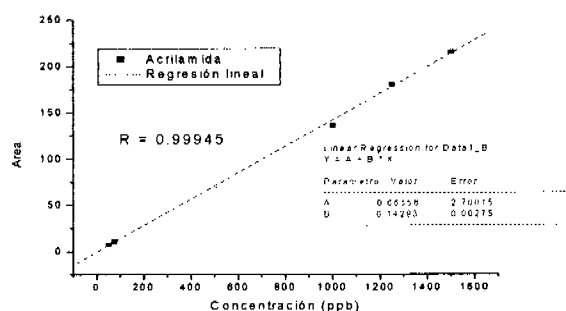


Figura 3.6 Gráfica de calibración

Para esta gráfica de calibración se obtuvieron los siguientes valores del análisis de regresión lineal:

Pendiente (B): 0.14293
 Ordenada al origen (A): -0.66358
 R = 0.99945

En estas condiciones es ahora necesario evaluar las posibles interferencias que se encuentren en las muestras reales para determinar si es o no necesario, modificar las condiciones cromatográficas.

La FDA propuso una metodología para cuantificar acrilamida en productos fritos (Diagrama 1 Capítulo II)

I) Después de seguir la metodología propuesta por la FDA se obtuvo:

-Después de la centrifugación se obtuvo en la parte inferior un sólido, en medio un líquido amarillento y en la parte superior una capa de grasa (Fig. 3.7) Cabe mencionar que la FDA recomendaba una centrifugación a 9000 rpm 5 min. y se realizó a 4500 rpm 30 min. (por limitación de la centrífuga); se volvió a centrifugar 30 min. más, pero la cantidad de líquido obtenido fue la misma que la obtenida en los primeros 30 min.

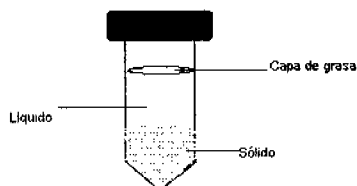


Figura 3.7 Muestra lo obtenido después de centrifugar.

-Después de filtrar en equipo Millipore (en vez de equipo Maxi-Spin) el líquido amarillento, se obtuvo un líquido translucido ligeramente amarillo.

-El líquido obtenido después de la extracción en fase sólida fue totalmente translucido e incoloro.

-Se utilizó el cartucho cartucho Octadecil (C8) EFS fabricante J.T. Baker Bound por el cartucho Elut-Accucat (modo mezcla, C8, SAX y SCX) 200 mg fabricante Varian).

-El análisis en HPLC/UV-VIS se realizó bajo las siguientes condiciones cromatográficas:

Fase estacionaria: Columna BDS C18 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil .

Fase móvil: 99.5% agua desionizada 0.5% metanol

Volumen de inyección: 20µL Flujo: 1 mL/min

Temperatura: 26 °C λ = 208 Y 228 nm.

Al analizar en HPLC las fracciones anteriores los resultados obtenidos fueron los siguientes:

| | Fracción obtenida al pasar por cartucho HLB 1.5 mL del extracto | Fracción obtenida al eluir con 1.5 mL de agua cartucho HLB | Fracción obtenida al pasar 1.5 ml obtenidos de cartucho HLB por cartucho C8 |
|----------------------|---|---|---|
| Sin fortificar | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida |
| Fortificado (10 ppm) | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida | 6.9 ppm | 4.8 ppm |

Tabla 3.2 Concentración de acrilamida obtenida después de analizar en HPLC las diferentes fracciones.

Los cromatogramas obtenidos (Apéndice B, figuras B1-B6) muestran que no se logró una extracción pura de acrilamida pues aparecen varios picos y unos de ellos cercano al pico de acrilamida.

La primera fracción (1.5 mL de la muestra pasados por el cartucho HLB) según la FDA se debían descartar, pero se recolecto para verificar que no contuviera acrilamida y en efecto, se obtuvieron en ambas muestras (fortificada y sin fortificar) valores de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida.

En la segunda fracción de la muestra sin fortificar se obtuvieron valores de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida.

En la muestra fortificada se encontró 4.8 ppm y teóricamente se debía de obtener 10 ppm ya que:

$$\begin{aligned}
 &100 \mu\text{g acrilamida} \text{ --- } 10 \text{ mL} \\
 &\quad \times \quad \text{--- } 1.5 \text{ mL} = 15 \mu\text{g acrilamida} \\
 &\frac{15 \mu\text{g acrilamida}}{1.5 \text{ ml}} = 10 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Por lo tanto se perdió aproximadamente 5.2 ppm y sin contar la cantidad de acrilamida aportada por las papas.

Por lo que la técnica no resulto provechosa y es necesario hacer modificaciones para ver si se puede mejorar los resultados.

II) Al probarse la técnica propuesta por Waters se obtuvo:

| | Concentración (ppm) |
|----------------------|---|
| Sin fortificar | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida |
| Fortificado (10 ppm) | 3.3 |

Tabla 3.3 Concentración de acrilamida obtenida después de analizar en HPLC la muestra sin fortificar y fortificada.

Cromatogramas en apéndice B figuras B7 y B8.

Esta técnica resultó menos eficiente pues para la muestra que estaba fortificada se debía de obtener teóricamente 37.5 ppm pues:

$$\begin{aligned}
 &100 \mu\text{g acrilamida} \text{ --- } 10 \text{ ml} \\
 &\quad \times \quad \text{--- } 1.5 \text{ ml} = 15 \mu\text{g acrilamida} \\
 &\frac{15 \mu\text{g acrilamida}}{0.4 \text{ ml (volumen.final)}} = 37.5 \text{ ppm}
 \end{aligned}$$

Tan solo se obtuvieron 3.3 ppm, lo que indica una pérdida de aproximadamente 34.2 ppm, además de que el pico de acrilamida obtenido en el cromatograma (figura B8) es más ancho que en los cromatogramas obtenidos por la metodología de la FDA, lo que indica que otras sustancias que no fueron eliminadas durante la extracción en fase sólida, estaban coeluyendo con la acrilamida.

Además la muestra sin fortificar dio un resultado con valores de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida, lo cual es lógico ya que si de 37.5 ppm solo resulto 3.3 ppm que se podía esperar de la muestra sin fortificar donde la cantidad de acrilamida es mucho menor.

Por lo tanto esta técnica quedó descartada para realizar el análisis de acrilamida en las papas fritas pues los resultados no son buenos y el tiempo de preparación es mayor comparado con la primera metodología.

III) Se realizaron cambios a la metodología propuesta por la FDA (Diagrama 2, Capítulo II).

Después de volver a preparar una muestra de papas fritas fortificada con acrilamida para evaluar la metodología, donde se realizó una segunda elución del cartucho HLB se analizó cada fracción y se obtuvo:

| | Fracción obtenida al pasar por cartucho HLB 2 mL del extracto | Fracción eluida con 2 mL de agua | Fracción obtenida al eluir por segunda vez con 2 mL de agua |
|---------------|---|----------------------------------|---|
| Fortificado 1 | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida | 7.0 ppm | 2.3 ppm |
| Fortificado 2 | Valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida | 6.9 ppm | 2.0 ppm |
| \bar{x} | ----- | 7.0 ppm | 2.2 |

Tabla 3.4 Concentración de acrilamida obtenida después de analizar en HPLC las diferentes fracciones de dos muestras fortificadas

Cromatogramas en apéndice B figuras B.9-B.11

En la fracción obtenida al pasar por cartucho HLB 2 mL del extracto, se volvió a obtener un resultado no cuantificable por lo que esta fracción no contiene acrilamida y se puede desechar.

Los valores obtenidos en la segunda fracción son muy parecidos a los obtenidos en el fortificado de la primera prueba (ver tabla 3.2) por lo que existe repetibilidad del método.

Los resultados obtenidos en la tercera fracción, muestran que se estaba reteniendo acrilamida en el cartucho HLB; por lo que al sumar las dos fracciones se obtiene aproximadamente 9.2 ppm. Si teóricamente se debiese tener 10 ppm,

al recuperar 9.2 ppm se habla de una menor pérdida, debido a ello en lo posterior se realizó una doble elución.

IV) Después de procesar una muestra sin fortificar, aplicando una doble elución el resultado siguió siendo un valor de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida (Cromatograma en apéndice B figura B.12).

V) Al utilizar la columna de silica gel para tratar de eliminar interferencias del extracto, se obtuvo:

La tabla 3.5 muestra los resultados al utilizar y no utilizar una columna de silica gel en una muestra fortificada:

| | Concentración (ppm) |
|--|---------------------|
| Sin utilización de columna de silica gel | 1.30 |
| Utilización de columna de silica gel | 0.98 |

Tabla 3.5

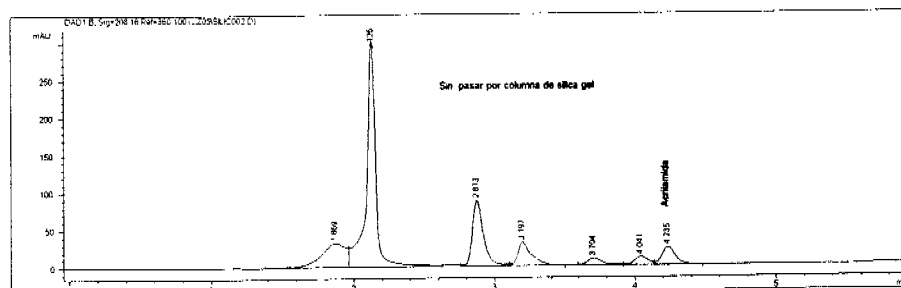


Figura 3.8 Sin la utilización de columna de silica gel.

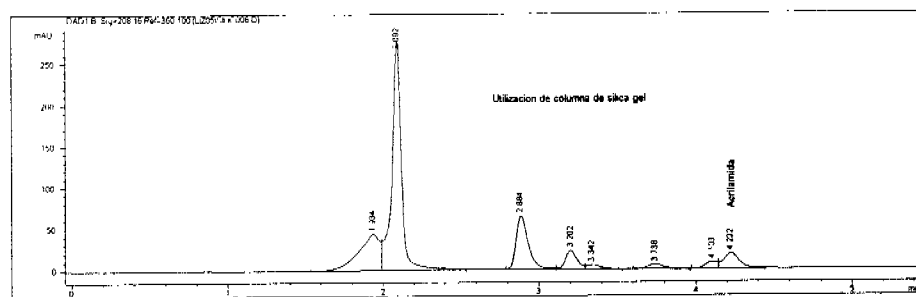


Figura 3.9 Utilizando columna de sílica gel.

Los resultados obtenidos no fueron los esperados, pues al pasar la muestra por la columna de sílica gel no se retuvo ningún componente indeseable; ya que en la figura 3.8 aparece casi el mismo número de picos que en la figura 3.9, lo que es más, en esta última aparece el pico de acrilamida traslapándose con el pico que tiene a su lado y en la figura 3.8 los picos están juntos pero bien definidos cada uno.

Lo que sí sucedió fue una retención de acrilamida en la columna de sílica gel pues la concentración de acrilamida cuando no se utilizó la columna fue de 1.3 ppm y después de su paso por la columna fue de aproximadamente 0.98 ppm; lo cual indica una pérdida de aproximadamente 0.32 ppm es decir un 25%.

Por lo tanto la utilización de una columna de sílica gel no cumplió con el propósito esperado el de eliminar compuestos indeseables.

VI) Al realizar el estudio de recobro de extracción en fase sólida e inyectar en HPLC cada una de las fracciones, los resultados fueron los siguientes:

| | Muestra centrifugada y filtrada | Fracción obtenida del cartucho HLB | Fracción obtenida del cartucho C8 |
|-----------|---------------------------------|------------------------------------|-----------------------------------|
| 1 | 2.3503 ppm | 1.1570 ppm | 0.6408 ppm |
| 2 | 2.3703 ppm | 1.1383 ppm | 0.6420 ppm |
| \bar{x} | 2.3603 ppm | 1.1477 ppm | 0.6414 ppm |

Tabla 3.6 Concentración de acrilamida en las tres diferentes fracciones

Al realizar el análisis de recobro teórico se obtuvo:

| | Recobro en % | | |
|-----------|-------------------------|--------------|-------------|
| | Centrifugada y filtrada | Cartucho HLB | Cartucho C8 |
| 1 | 94.4806 | 93.0214 | 64.4020 |
| 2 | 95.2846 | 91.5179 | 64.5226 |
| \bar{x} | 94.8826 | 92.2697 | 64.4623 |

*Cálculos en apéndice C (C.1)

Tabla 3.7 Porcentaje de recobro de cada fracción con base en cálculos teóricos.

La tabla anterior indica que durante el tratamiento de la muestra se esta perdiendo aproximadamente 5.2 % de acrilamida, y que después de su paso por el cartucho HLB hay una pérdida del 7.3%. Cuando se utilizó el cartucho C8 existió una pérdida del 35.7 % lo cual representa un valor de mayor magnitud que puede tener repercusiones en los análisis.

Observando los cromatogramas (Apéndice B, figuras B.13-B.15) de las tres diferentes fracciones se puede apreciar que la diferencia en lo que se refiere a la cantidad de picos, es mínima, por lo que podría ser innecesaria la extracción en fase sólida pues además de disminuir el recobro de acrilamida es un proceso costoso y que aumenta el tiempo de análisis de muestra.

VII) Al prepararse dos muestras de papas fritas una fortificada y otra sin fortificar eliminando la extracción en fase sólida, se pudo determinar la concentración de acrilamida en ambas muestras.

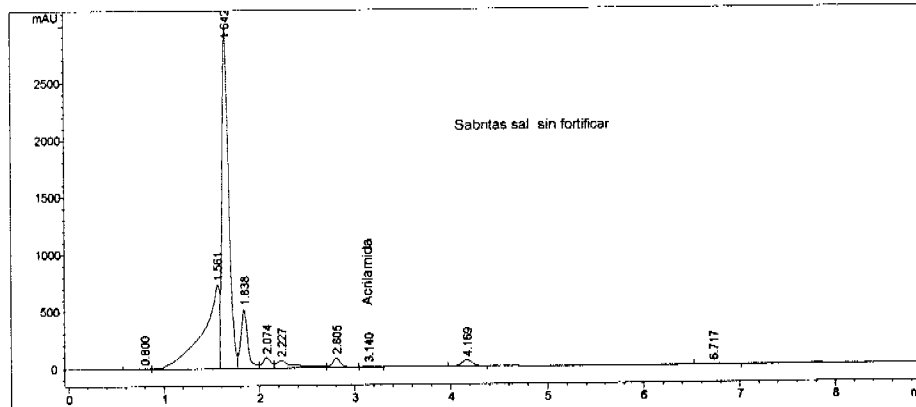


Figura 3.10 Muestra de Sabritas sin fortificar eliminando extracción en fase sólida. Pico de acrilamida en tr 3.1.

Se observa que se puede integrar y por lo tanto es factible la cuantificación de acrilamida.

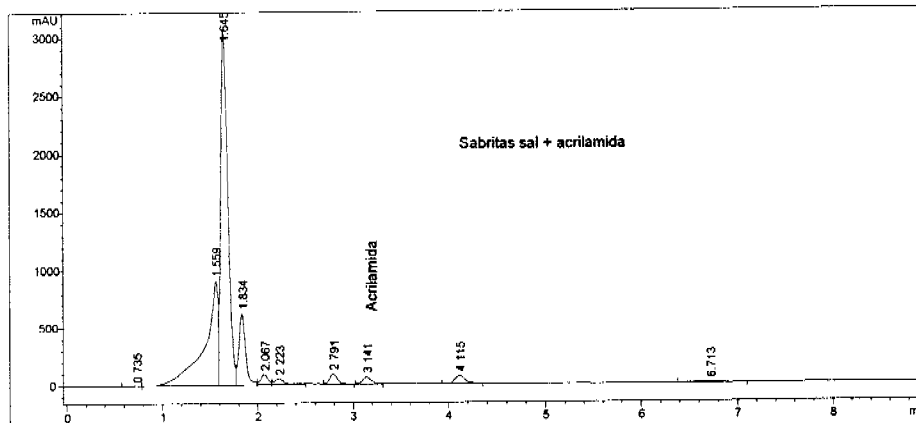


Figura 3.11 Muestra de Sabritas sal fortificada con acrilamida eliminando extracción en fase sólida. Pico de acrilamida en tr 3.1.

Se observa que el tiempo de retención es el mismo que el obtenido en la figura 3.10 y que el pico aumentó su tamaño.

Después de comparar ambos cromatogramas podemos observar que en efecto el pico de tiempo de retención de 3.1 de la figura 3.10 corresponde al de acrilamida.

El resultado fue provechoso pues con la eliminación de la extracción en fase sólida se pudo determinar la concentración de acrilamida, cosa que no había sido posible en las pruebas anteriores donde las muestras no habían sido fortificadas. Esto pudo deberse a que las papas fritas contienen concentraciones bajas de acrilamida y cuando era sometida a la extracción en fase sólida se tomaban 2 mL que eran llevados a un volumen final de 5 mL lo cual daba una concentración todavía más baja.

3.1 Límite de detección y límite de cuantificación

Se generó una gráfica de calibración que permitirá evaluar los límites de detección y cuantificación instrumental y con ello definir si se podrá determinar el contenido de acrilamida en productos fritos.

La gráfica de calibración se generó a partir de disoluciones de acrilamida en agua de concentraciones 1000, 500, 250, 100 y 80 ppb y la evaluación de los límites de detección y límite de cuantificación se hicieron acorde al método de Miller, que se discute en el apéndice A.

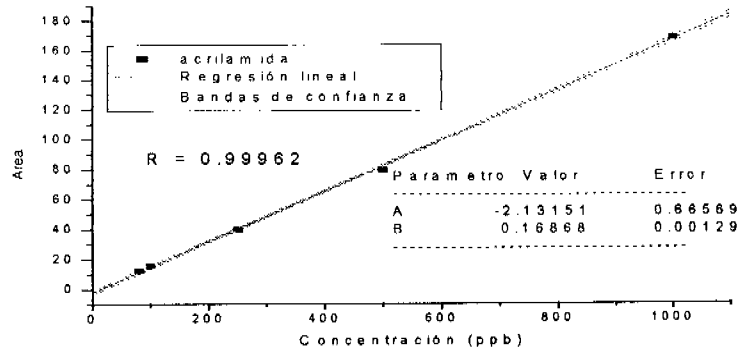


Figura 3.12 Gráfica de calibración para la obtención de límite de detección y límite de cuantificación

Para esta grafica de calibración se obtuvieron los siguientes valores del análisis de regresión lineal:

Pendiente (B): 0.16868

Ordenada al origen (A):-2.13151

R = 0.99962

Obteniéndose:

| Límite de detección | Límite de cuantificación |
|---------------------|--------------------------|
| 47 ppb | 93 ppb |

Tabla 3.8 Valores de límite de detección y cuantificación obtenidos

La longitud de onda utilizada para realizar el límite de detección y cuantificación fue 208 nm, ya que en la longitud de onda 228 nm a concentraciones bajas ya no se podía integrar el pico de acrilamida.

Con lo que el límite de detección del método fue de 47 ppb y el límite de cuantificación fue de 93 ppb.

3.4 Cuantificación de acrilamida en muestras comerciales

Los resultados obtenidos de acrilamida en muestras comerciales de papas fritas son:

PAPAS FRITAS SALADAS MARCA SABRITAS

| Concentración de acrilamida en ppm | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.3561 | 1.3304 | 1.5956 | 1.2815 | 1.4656 |
| inyección 1 | 0.4033 | 0.0437 | 0.2179 | 0.1579 | 0.0834 |
| inyección 2 | 0.4067 | 0.0445 | 0.2050 | 0.0859 | 0.0837 |
| inyección 3 | 0.4180 | 0.0440 | 0.2115 | 0.0867 | 0.0817 |
| \bar{x} | 0.4093±0.0191 | 0.0441±0.0010 | 0.2115±0.0160 | 0.0863±0.0051 | 0.0830±0.0027 |
| Desviación estándar | 0.0077 | 0.0004 | 0.0064 | 0.0006 | 0.0011 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0191 | 0.0010 | 0.0160 | 0.0051 | 0.0027 |

*Cromatogramas apéndice B (Fig. B.16-B.30) y cálculos apéndice C (C.2)

Tabla 3.9 Muestra para cada lote analizado, el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|---------------------|
| Lote 1 | 3018.6±54.6 |
| Lote 2 | 331.2±30.2 |
| Lote 3 | 1325.3±83.4 |
| Lote 4 | 673.4±66.8 |
| Lote 5 | 566.0±40.2 |

*Cálculos (apéndice C.3)

*Grafico apéndice B (Figura B.121)

Tabla 3.10 Concentración de acrilamida (ppb) en papas fritas saladas marca Sabritas

PAPAS FRITAS SABOR ADOBADAS MARCA SABRITAS

| Concentración de acrilamida en ppm | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.0203 | 1.1497 | 1.0827 | 1.0435 | 1.0834 |
| Inyección 1 | 0.1514 | 0.0980 | 0.1933 | 0.0759 | 0.1909 |
| inyección 2 | 0.2401 | 0.0975 | 0.1932 | 0.0760 | 0.2076 |
| inyección 3 | 0.1497 | 0.0938 | 0.1900 | 0.0700 | 0.2175 |
| \bar{x} | 0.1506±0.0054 | 0.0964±0.0057 | 0.1922±0.0047 | 0.0740±0.0084 | 0.2053±0.0335 |
| Desviación estándar | 0.0006 | 0.0023 | 0.0019 | 0.0034 | 0.0135 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0054 | 0.0057 | 0.0047 | 0.0084 | 0.0335 |

*Cromatogramas apéndice B (Figura B.31 – B.45)

Tabla 3.11 Muestra para cada lote analizado el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|---------------------|
| lote 1 | 1475.5±43.5 |
| lote 2 | 838.8±66.5 |
| lote 3 | 1775.0±32.2 |
| lote 4 | 708.8±122.1 |
| lote 5 | 1895.3±170.9 |

*Grafico apéndice B (Figura B.122)

Tabla 3.12 Concentración de acrilamida (ppb) en papas fritas sabor adobadas marca Sabritas.

PAPAS FRITAS SABOR LIMON MARCA SABRITAS

| Concentración de acrilamida en ppm | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|--|----------------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.2152 | 1.4791 | 1.0734 | 1.2547 | 1.0996 |
| inyección 1 | 0.2143 | 0.2241 | 0.0440 | Concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable | 0.0625 |
| inyección 2 | 0.2395 | 0.2175 | 0.0434 | Concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable | 0.0635 |
| inyección 3 | 0.2066 | 0.2195 | 0.0412 | Concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable | 0.0608 |
| \bar{x} | 0.2201±0.0427 | 0.2204±0.0083 | 0.0429±0.0037 | Concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable | 0.0622±0.0033 |
| Desviación estándar | 0.0172 | 0.0034 | 0.0015 | ----- | 0.0013 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0427 | 0.0083 | 0.0037 | ----- | 0.0033 |

*Cromatogramas apéndice B (Figura B.46– B.60)

Tabla 3.13 Muestra para cada lote analizado el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|--|
| lote 1 | 1811.5±202 |
| lote 2 | 1489.8±45.6 |
| lote 3 | 399.4±93.3 |
| lote 4 | Concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable |
| lote 5 | 566.1±61.5 |

*Grafico apéndice B (Figura B.123)

Tabla 3.14 Concentración de acrilamida (ppb) en papas fritas sabor limón marca Sabritas

Durante el análisis de Sabritas limón el tiempo de retención se movió de 3.1-3.2, al obtener esta variación en el tiempo de retención se hizo una comparación entre el espectro UV obtenido de los picos que se suponía fuesen de acrilamida (Figura B.128) con el espectro UV de un estándar de acrilamida (Figura B.127), la

comparación resultó en que, el espectro del estándar puro aparecía en el espectro de los picos que se suponía fuesen de acrilamida pero acompañado de otras señales; de esta manera se confirmó que el pico que aparecía de 3.1 a 3.2 minutos era acrilamida. Estas variaciones pueden atribuirse a que Sabritas sal están hechas a base de papa, sal y aceite y las Sabritas limón contienen además de los ingredientes anteriores colorantes y saborizantes artificiales que quizás no logran eliminarse en su totalidad durante la extracción de acrilamida de la muestra causando este tipo de problemas.

PAPAS FRITAS SALADAS MARCA CHIPS

| Concentración de acrilamida en papas fritas | | | | | |
|---|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.493 | 1.353 | 1.3782 | 1.264 | 1.1077 |
| inyección 1 | 0.0553 | 0.0489 | 0.0409 | 0.0400 | 0.0565 |
| inyección 2 | 0.0548 | 0.0488 | 0.0417 | 0.0382 | 0.0548 |
| inyección 3 | 0.0544 | 0.0486 | 0.0417 | 0.0394 | 0.0560 |
| \bar{x} | 0.0548±0.0011 | 0.0487±0.0004 | 0.0414±0.0011 | 0.0392±0.0022 | 0.0558±0.0021 |
| Desviación estándar | 0.0005 | 0.0002 | 0.0005 | 0.0009 | 0.0009 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0011 | 0.0004 | 0.0011 | 0.0022 | 0.0021 |

*Cromatogramas apéndice B (figura B.61 – B.75)

Tabla 3.15 Muestra para cada lote analizado el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|---------------------|
| lote 1 | 367.3±28.4 |
| lote 2 | 360.2±16.4 |
| lote 3 | 300.6±35.5 |
| lote 4 | 310.1±62.8 |
| lote 5 | 503.6±45.8 |

*Grafico apéndice B (Figura B.124)

Tabla 3.16 Concentración de acrilamida (ppb) en papas fritas saladas marca Chips

PAPAS FRITAS SABOR JALAPEÑO MARCA CHIPS

| Concentración de acrilamida en ppm | | | | | |
|------------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.2126 | 1.4743 | 1.5888 | 1.4691 | 1.4093 |
| inyección 1 | 0.0882 | 0.0470 | 0.0568 | 0.0541 | 0.0612 |
| inyección 2 | 0.0900 | 0.0494 | 0.0593 | 0.0521 | 0.0626 |
| inyección 3 | 0.0903 | 0.0494 | 0.0575 | 0.0504 | 0.0598 |
| \bar{x} | 0.0895±0.0028 | 0.0486±0.0035 | 0.0579±0.0032 | 0.0522±0.0046 | 0.0612±0.0034 |
| Desviación estándar | 0.0011 | 0.0014 | 0.0013 | 0.0019 | 0.0014 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0028 | 0.0035 | 0.0032 | 0.0046 | 0.0034 |

*Cromatogramas apéndice B (Figura B.76 – B.90)

Tabla 3.17 Muestra para cada lote analizado el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|---------------------|
| lote 1 | 738.2±39.3 |
| lote 2 | 329.9±78.8 |
| lote 3 | 364.2±63.2 |
| lote 4 | 355.3±96.4 |
| lote 5 | 434.3±63.7 |

*Grafico apéndice B (Figura B.125)

Tabla 3.18 Concentración de acrilamida (ppb) en papas fritas sabor jalapeño marca Chips.

Los resultados obtenidos de acrilamida en muestras comerciales de papas a la francesa son:

PAPAS A LA FRANCESA DE MC DONALDS

| Concentración de acrilamida en ppm | | | | | |
|------------------------------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Lote 1 | Lote 2 | Lote 3 | Lote 4 | Lote 5 |
| Peso papa (g) | 1.1733 | 1.149 | 1.1792 | 1.1841 | 1.0468 |
| inyección 1 | 0.0446 | 0.0383 | 0.0414 | 0.0400 | 0.0381 |
| inyección 2 | 0.0470 | 0.0386 | 0.0408 | 0.0397 | 0.0383 |
| inyección 3 | 0.0443 | 0.0384 | 0.0415 | 0.0411 | 0.0389 |
| \bar{x} | 0.0453±0.0036 | 0.0384±0.0004 | 0.0412±0.0009 | 0.0403±0.0018 | 0.0385±0.0010 |
| Desviación estándar | 0.0015 | 0.0002 | 0.0004 | 0.0007 | 0.0004 |
| Intervalo de confianza (95%) | 0.0036 | 0.0004 | 0.0009 | 0.0018 | 0.0010 |

*Cromatogramas apéndice B (figura B.91 – B.105)

Tabla 3.19 Muestra para cada lote analizado el valor de cada una de las inyecciones, así como su media, desviación estándar e intervalo de confianza

Concentración acrilamida en cinco diferentes lotes de papas

| | Concentración (ppb) |
|--------|---------------------|
| lote 1 | 386.2±88.1 |
| lote 2 | 334.6±17.6 |
| lote 3 | 349.5±29.7 |
| lote 4 | 340.1±53.3 |
| lote 5 | 367.4±34.9 |

*Grafico apéndice B (Figura B.126)

Tabla 3.20 Concentración de acrilamida (ppb) en papas la francesa de Mc Donalds

BURGER KING: ninguno de los cinco lotes presento concentración por arriba del límite de cuantificación.

Aunque los resultados obtenidos después de analizar las papas a la francesa de Burger king fueron valores de concentración por debajo de la cantidad mínima cuantificable de acrilamida, eso no significa que estas papas no contengan acrilamida, pues en algunas de los cromatogramas (figuras B.106-B.120 en

apéndice B) se puede apreciar un pico con tiempo de retención 3.1 que no fue posible integrar. Por consiguiente solo se puede decir que las papas a la francesa de Burger King contienen una concentración < 0.09 ppm de acrilamida.

Los resultados muestran que las papas fritas contienen mayor contenido de acrilamida que las papas a la francesa. Aunque dentro de las papas fritas analizadas las que poseen la mayor cantidad de acrilamida son las de la marca Sabritas (saladas, limón y adobadas); pues algunos valores de estas son más del doble con respecto a los valores encontrados en las papas fritas de la marca Chips (saladas y jalapeño). Desgraciadamente, de estas empresas no pudimos encontrar información sobre su proceso de producción pues de ser así se podría especular porque una marca contiene más cantidad que la otra. Lo que si es obvio es que sus procesos son muy diferentes pues el sabor, textura y apariencia de una papa frita de Sabritas y una de Chips es muy diferente.

Es importante reconocer que todas las marcas analizadas de papas fritas y de papas a la francesa contienen valores de acrilamida mayores a 0.5 ppb valor límite de acrilamida en agua potable en Estados Unidos o de 0.1 ppb valor límite para la Unión Europea (UE). La Unión Europea reportó que aunque no había consenso sobre la cantidad mínima que es peligrosa, admitió que no debería ser mayor a 10 ppb en alimentos²⁷, cifra que en las marcas analizadas de papas fritas y papas a la francesa fue excedida en por lo menos 30 veces.

Las concentraciones de acrilamida encontrada en las muestras comerciales se encuentran dentro del intervalo que reportó la FAO-OMS (50-3500 ppb) en papas fritas y a la francesa de países como Noruega, Suiza, Suecia, Estados Unidos y Gran Bretaña⁴, por lo que los resultados muestran concordancia; aunque para declararlos totalmente confiables es necesario realizar la validación del método.

El verdadero riesgo de haber encontrado estas cifras en las papas fritas y papas a la francesa, que es un producto gran consumo en nuestro país, aún no se sabe, pero se espera que estos valores sirvan para que en un futuro, cuando se

determine la cantidad de acrilamida de alto riesgo en humanos, se pueda advertir o no a la población sobre el consumo de estos productos.

CONCLUSIONES

- Las condiciones cromatográficas para la cuantificación de acrilamida en cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector ultravioleta-visible son:
Fase estacionaria: Columna BDS C18 5 μ m de tamaño de partícula, 4.6 mm de diámetro y 150 mm de longitud fabricante Hypersil.
Fase móvil: 99.5% agua 0.5% metanol
Volumen de inyección: 20 μ L Flujo: 1 mL/min
Temperatura: 26 °C λ = 208 nm
- La metodología propuesta por la Food and Drug Administration (FDA) para la cuantificación de acrilamida en alimentos no funciona para cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector ultravioleta-visible .
- El método propuesto permite detectar concentraciones de acrilamida de 0.047 ppb y cuantificar concentraciones superiores a 0.093 ppb.
- Se logró cuantificar acrilamida en papas fritas de marcas comerciales de mayor consumo en el país con cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un detector ultravioleta-visible.
- Las papas fritas de Sabritas presentaron un mayor contenido de acrilamida que las papas fritas Chips (Barcel) y que las papas a la francesa de Mc Donalds y Burger King.
- La papas fritas de la marca Sabritas (saladas, adobadas y limón), Chips (saladas y jalapeño) y las papas a la francesa de Mc Donalds contienen cantidades de acrilamida que exceden los límites permitidos de acrilamida en agua para beber de Estados Unidos y la Unión Europea.

APENDICE A

Calculo de límite de detección y cuantificación

Si existe una relación lineal entre la señal analítica (y) y la concentración del analito (x), la "mejor" línea recta que pasa a través de los puntos de la gráfica de calibración se calcula por el método de los mínimos cuadrados.

Cada uno de los puntos de la gráfica está sujeto a un error experimental. El método de mínimos cuadrados supone que todos los errores se encuentran en y , lo que provoca que haya desviaciones en esta dirección entre los puntos experimentales y la recta calculada.

Algunas de estas desviaciones (conocidas como los residuos de y) serán positivas y otras negativas, por lo que se intenta minimizar la suma de los cuadrados de los residuos. La recta se calcula basándose en el principio de que "la línea debe pasar por el centro de de los puntos (\bar{x}, \bar{y})".

Para la recta

$$y = A + Bx \quad \text{Ecuación 1}$$

$$B = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 2}$$

$$A = \bar{y} - B \bar{x} \quad \text{Ecuación 3}$$

Para calcular los errores aleatorios de los valores de la pendiente y de la ordenada al origen, primero se calcula el valor se $S_{\bar{y}/x}$ (desviación estándar sobre la regresión) con la relación:

$$S_{\bar{y}/x} = \sqrt{\frac{\sum_i (y_i - y_{cal})^2}{n-2}} \quad \text{Ecuación 4}$$

Las desviaciones estándar sobre la pendiente (b) y obre la ordenada al origen (a) están dadas por:

$$S_b = \frac{S_{y/x}}{\sqrt{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 5}$$

$$S_a = S_{y/x} \sqrt{\frac{\sum_i x_i^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 6}$$

Para estimar si los puntos experimentales se ajustan bien o no a una línea recta, se calcula el coeficiente de correlación momento-productor, r:

$$r = \frac{\sum_i [(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{(\sum_i (x_i - \bar{x})^2)(\sum_i (y_i - \bar{y})^2)}} \quad \text{Ecuación 7}$$

Límite de detección

Para calcular el límite de detección es necesario conocer los intervalos de confianza sobre la recta calculada:

$$y_i = \bar{y} + B(x_i - \bar{x}) \pm t S_{y/x} \sqrt{1 + \frac{1}{n} + \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 8}$$

en donde t es el valor de la "t de student", a dos colas, con un nivel de confianza s para n-2 grados de libertad.

Se calcula primero el valor de y_+ , para $x_i = 0$. Con este valor se calcula el valor correspondiente de x en la recta y_+ . Para despejar el valor de x de las ecuaciones de las rectas y_{\pm} se utiliza un termino auxiliar:

$$C = \frac{B^2 (t * S_{y/x})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2} \quad \text{Ecuación 9}$$

por lo que y+

$$x_1 = \bar{x} - \frac{B}{C} (\bar{y} - y_0) - \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 10}$$

Por lo que y -

$$x_2 = \bar{x} - \frac{B}{C} (\bar{y} - y_0) + \frac{tS_{y/x}}{C} \sqrt{\left(1 + \frac{1}{n}\right)C + \frac{(y_0 - \bar{y})^2}{\sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Entonces, el límite de detección se obtiene sustituyendo el valor de y+ para x = 0 en la ecuación 11

Para calcular el límite de cuantificación, se calcula ahora el valor de y+ para x = límite de detección, y nuevamente con este valor se calcula el valor de x en la recta y -. Este valor corresponde al límite de cuantificación.

APENDICE B
CROMATOGRAMAS

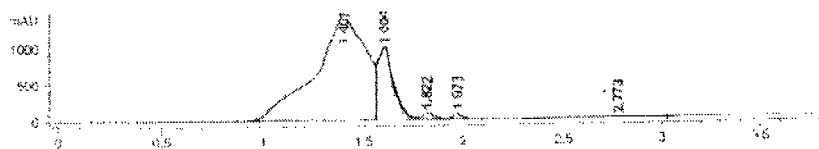


Fig. B.1 Fracción obtenida al pasar por el cartucho HLB, 1.5 mL del extracto de la muestra sin fortificar.

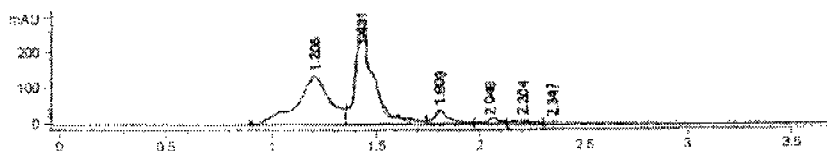


Fig. B.2 Fracción obtenida al eluir con 1.5 mL de agua el cartucho HLB de la muestra sin fortificar.

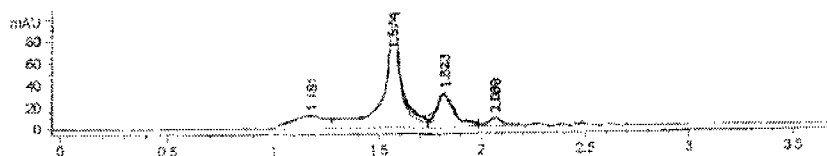


Fig. B.3 Fracción obtenida al pasar por cartucho HLB, 1.5 mL del extracto de la muestra fortificada con 10 ppm de acrilamida.

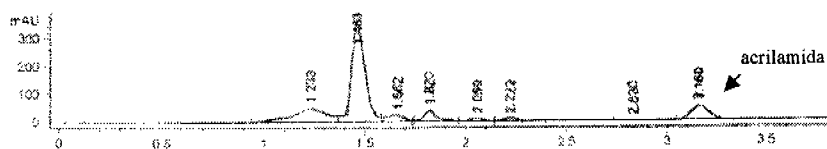


Fig. B.4 Fracción obtenida al eluir con 1.5 ml agua el cartucho HLB, de la muestra fortificada con 10 ppm de acrilamida. Pico de acrilamida en tr 3.1

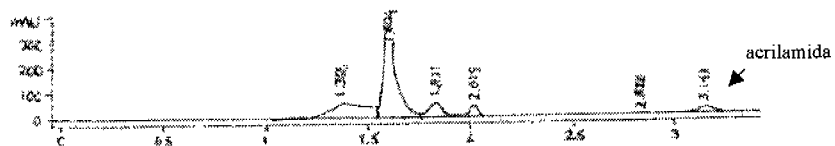


Fig. B.5 Fracción obtenida al pasar 1.5 mL obtenidos del cartucho HLB por el cartucho C8, de la muestra fortificada 10 ppm de acrilamida. Pico acrilamida en tr 3.1

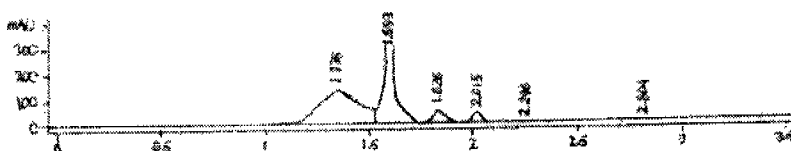


Fig. B.6 Fracción obtenida al pasar 1.5 mL obtenidos del cartucho HLB por el cartucho C8, de la muestra sin fortificar.

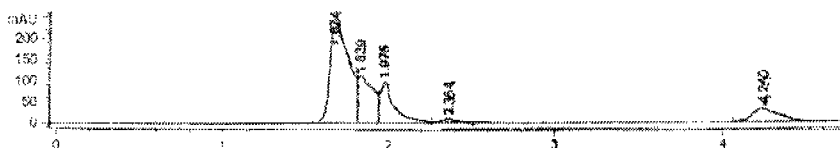


Fig. B.7 Fracción final de muestra sin fortificar siguiendo la técnica propuesta por Waters.

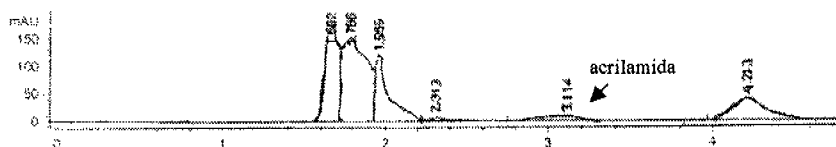


Fig. B.8 Fracción final de muestra fortificada con 10 ppm de acrilanmida siguiendo la técnica propuesta por Waters. Pico de acrilamida en tr 3.1

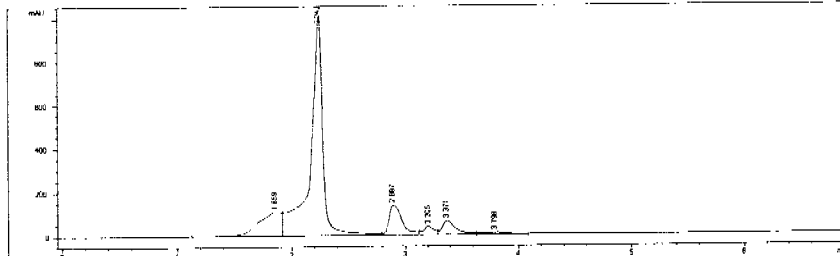


Figura B.9 Fracción obtenida al pasar por el cartucho HLB 2 ml de extracto de muestra fortificada.

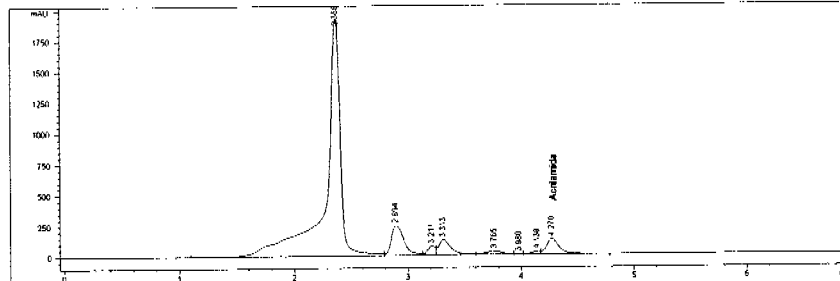


Figura B.10 Fracción obtenida al eluir el cartucho HLB con 2 ml de agua donde se aprecia pico de acrilamida

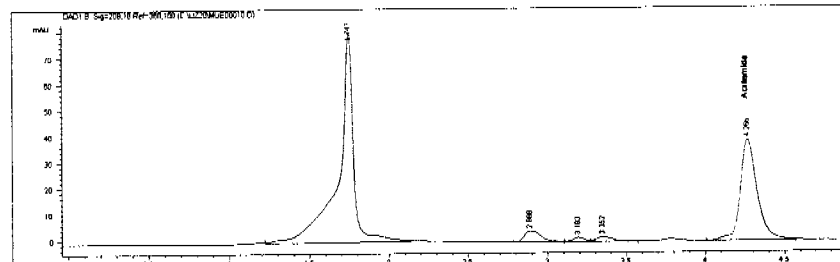


Figura B.11 Fracción obtenida al eluir por segunda vez con 2 ml de agua cartucho HLB donde se aprecia pico de acrilamida

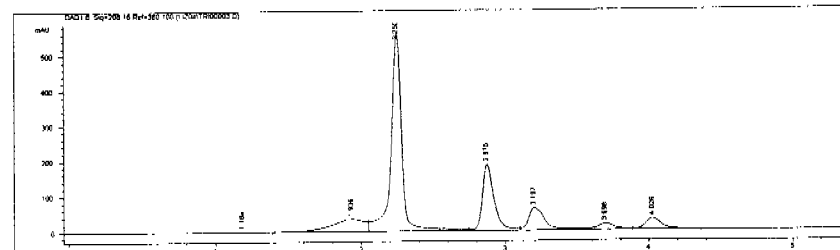


Fig. B.12 Muestra de papas fritas.

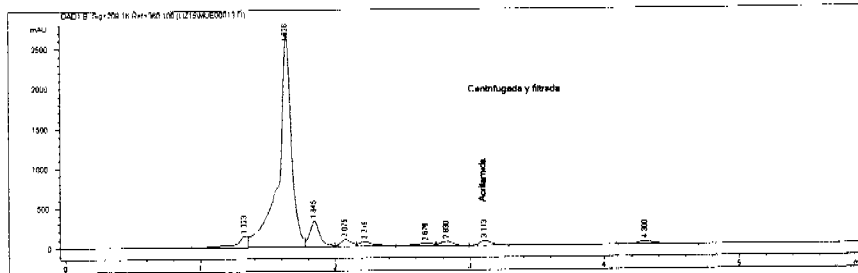


Figura B.13 Muestra 1 fortificada con acrilamida, centrifugada y filtrada. Pico de acrilamida en tr 3.1.

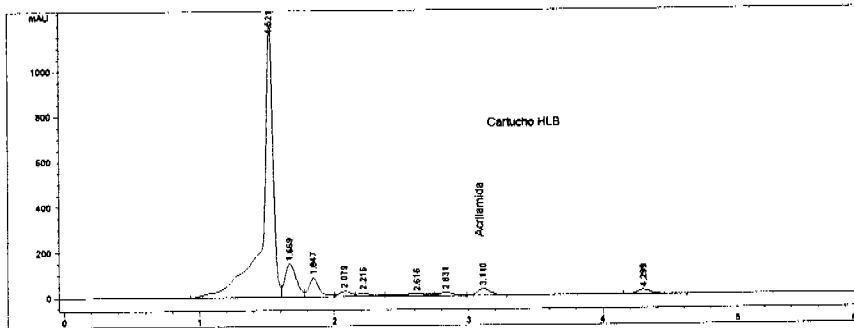


Figura B.14 Muestra 1 fortificada con acrilamida, pasada a través de cartucho HLB. Pico de acrilamida tr 3.1.

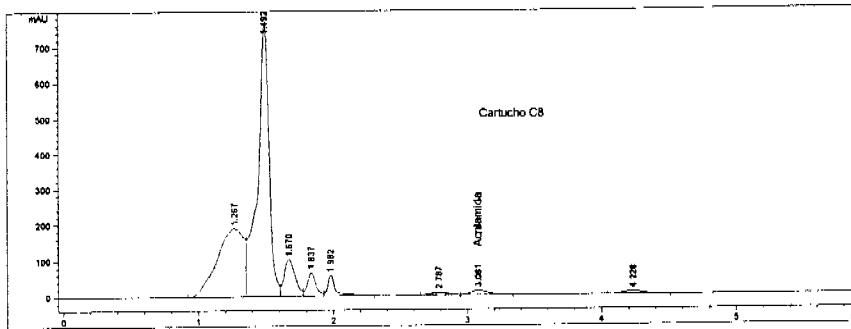


Figura B.15 Muestra 1 fortificada pasada a través de cartucho C8. Pico de acrilamida tr 3.1

Sabritas sal

Lote 1

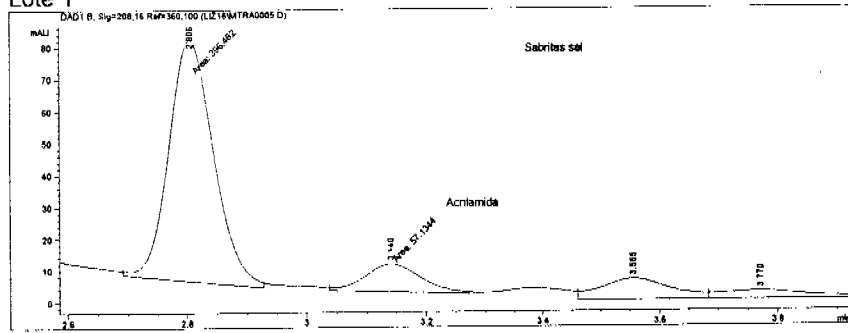


Figura B.16

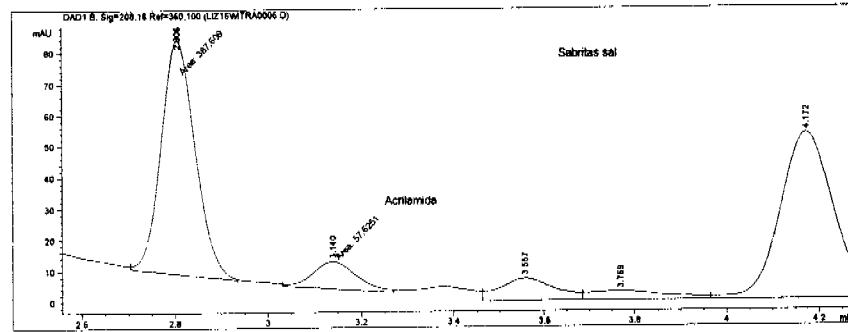


Figura B.17

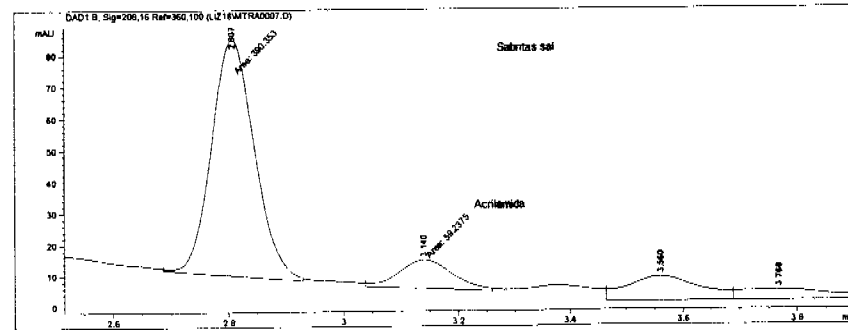


Figura B.18

Lote 2

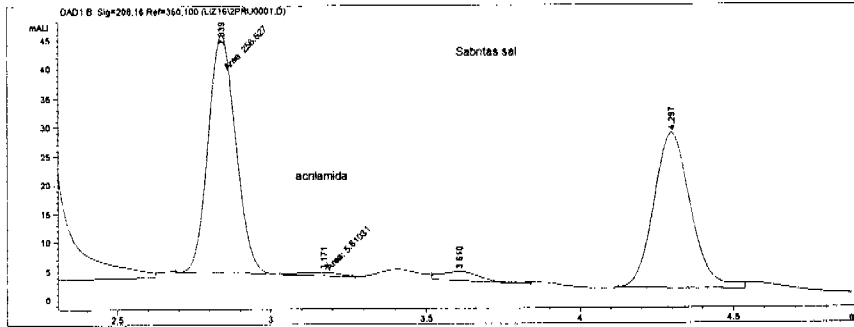


Figura B.19

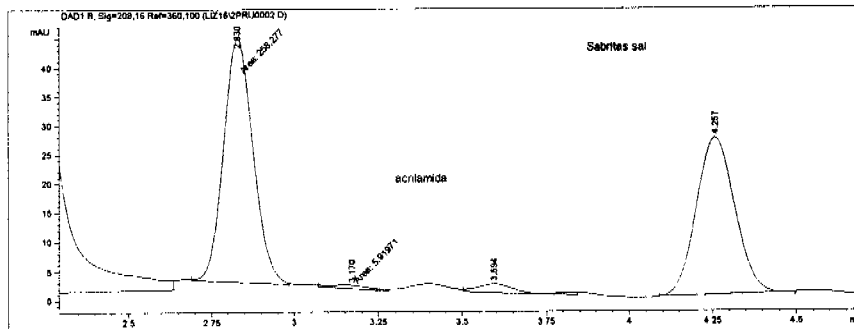


Figura B.20

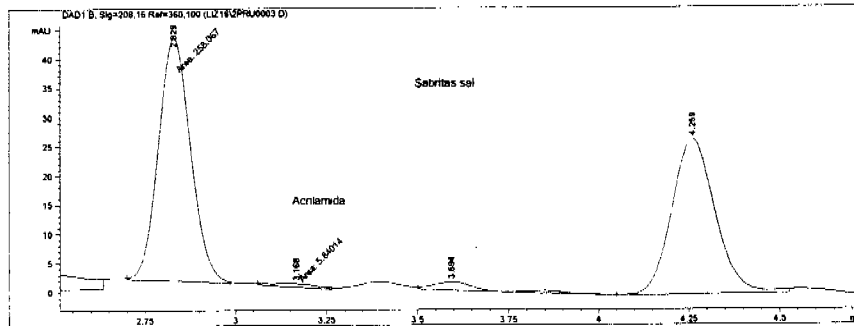


Figura B.21

Lote 3

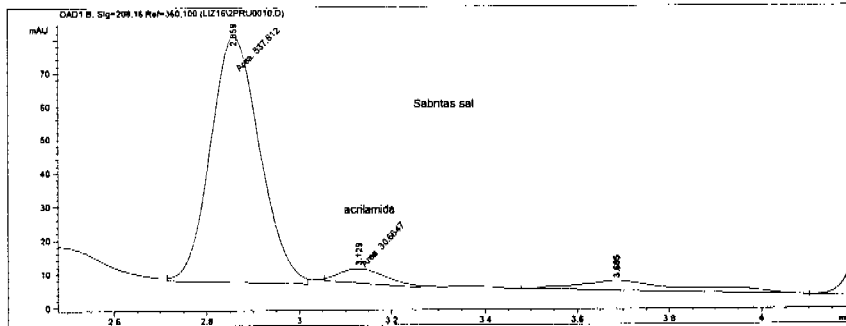


Figura B.22

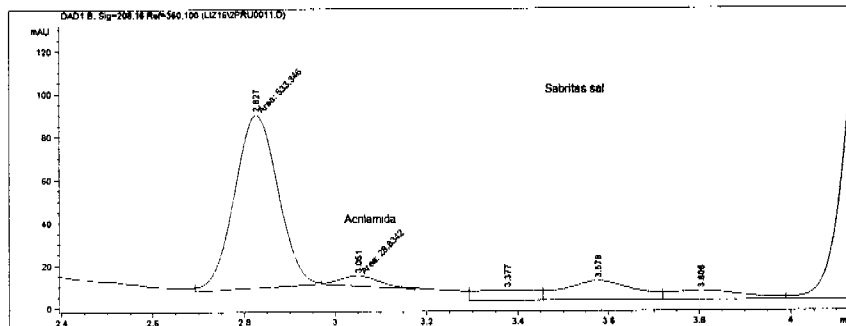


Figura B.23

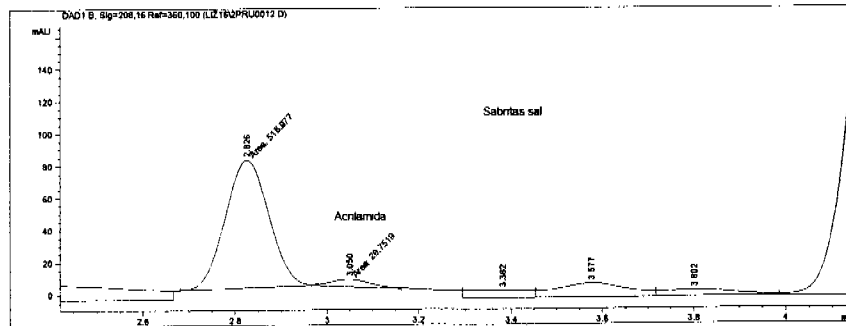


Figura B.24

Lote 4

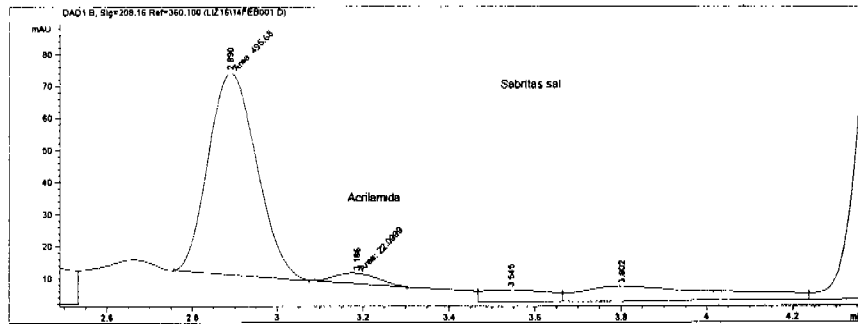


Figura B.25

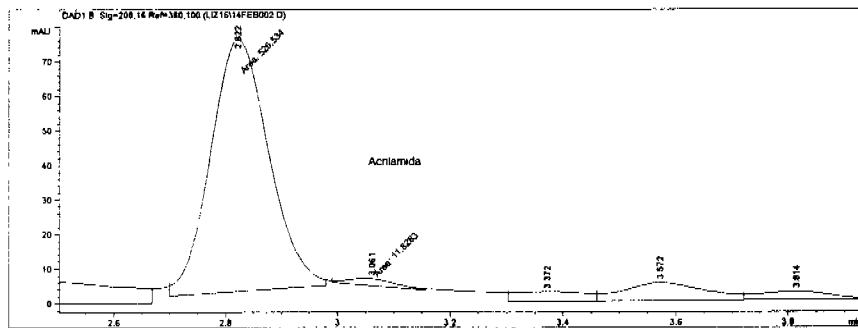


Figura B.26

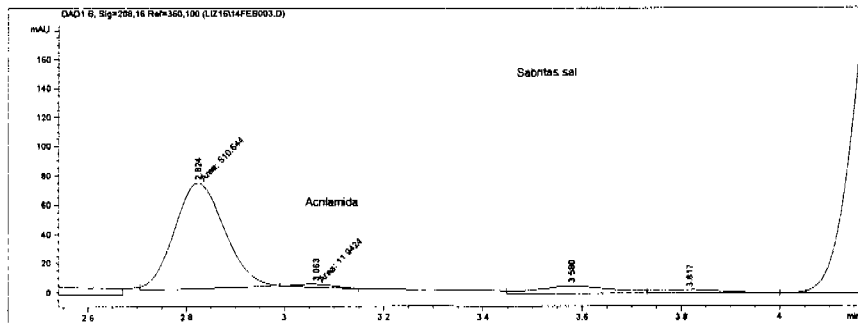


Figura B.27

Lote 5

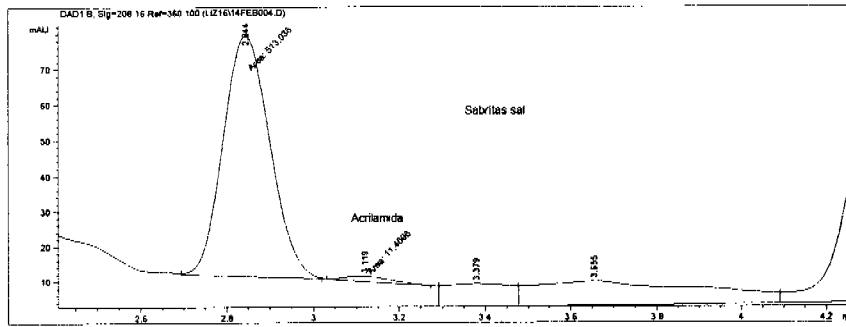


Figura B.28

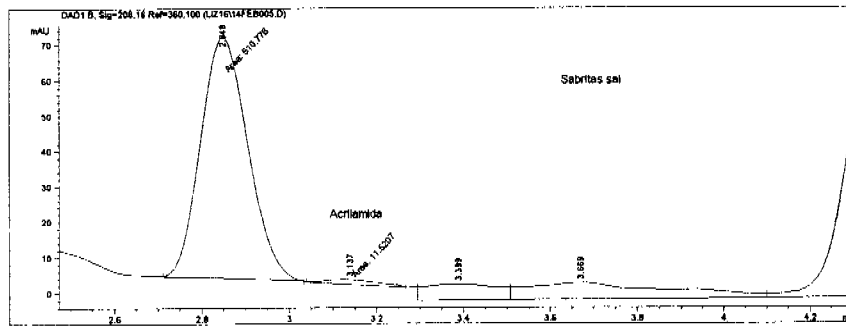


Figura B.29

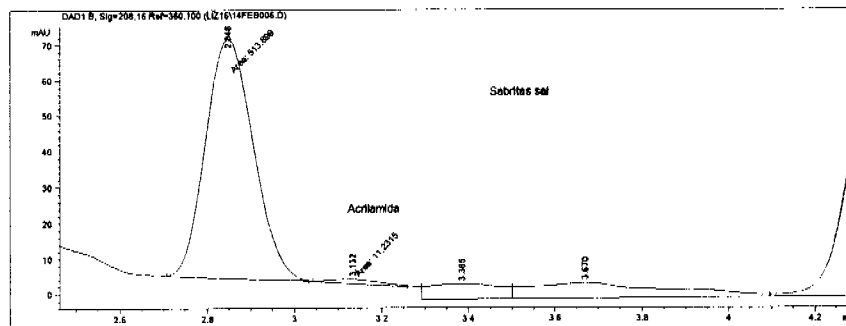


Figura B.30

Sabritas adobadas

Lote 1

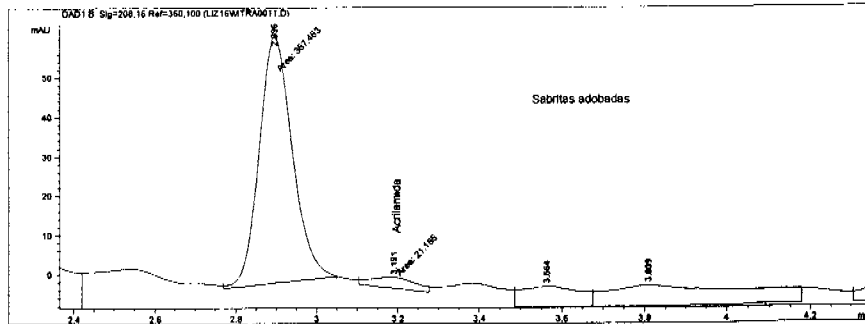


Figura B.31

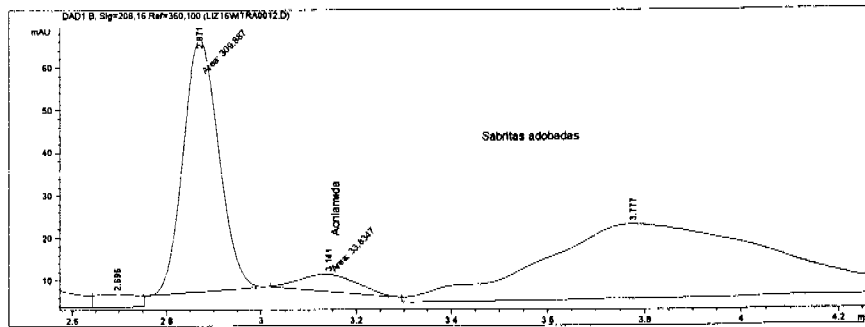


Figura B.32

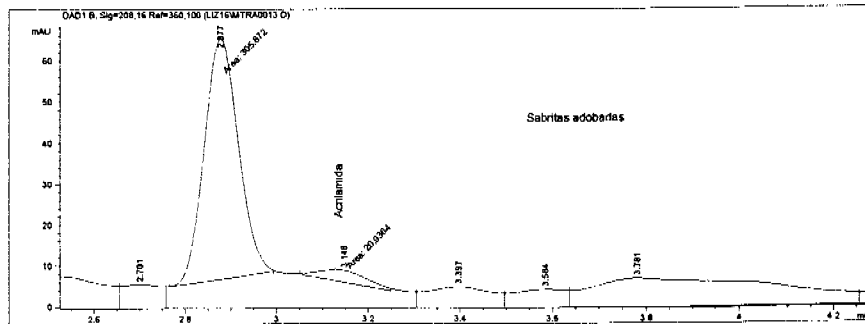


Figura B.33

Lote 2

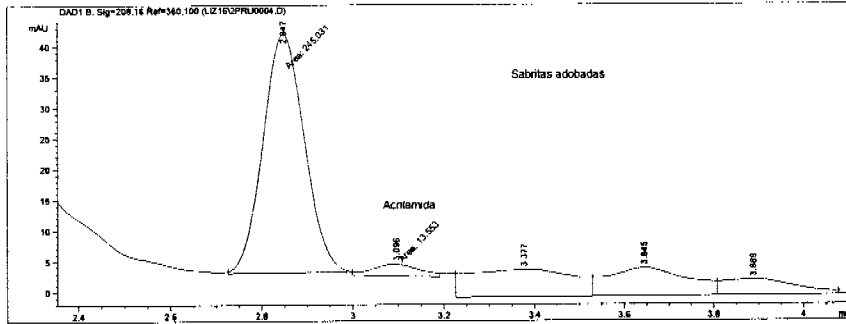


Figura B.34

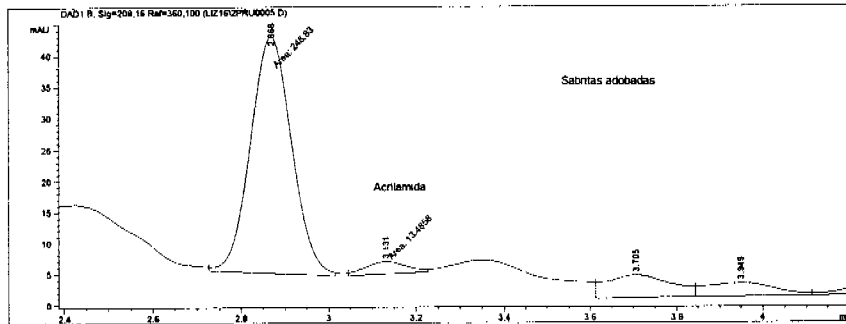


Figura B.35

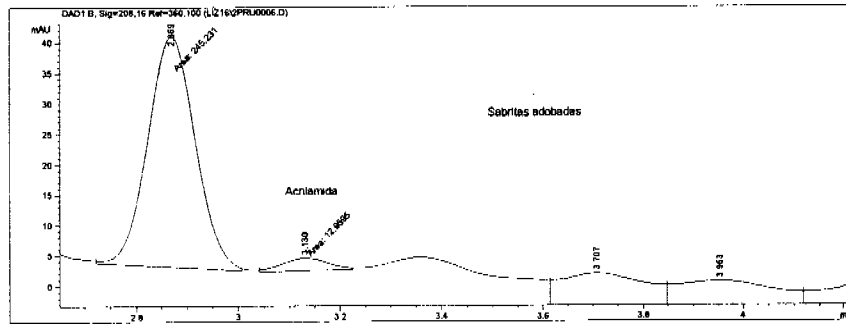


Figura B.36

Lote 3

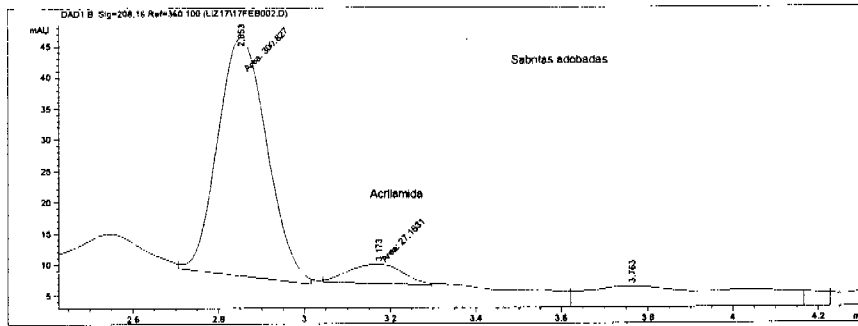


Figura B.37

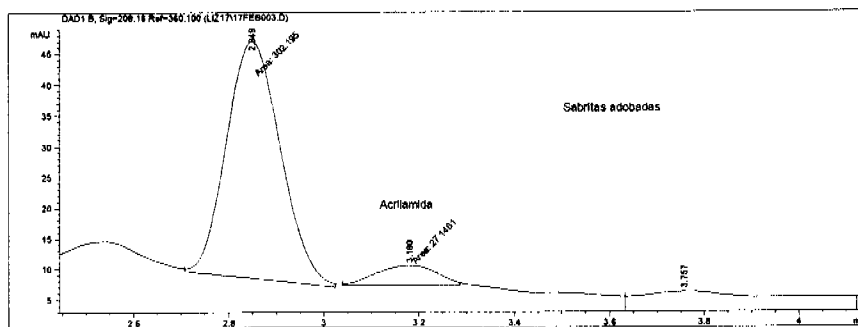


Figura B.38

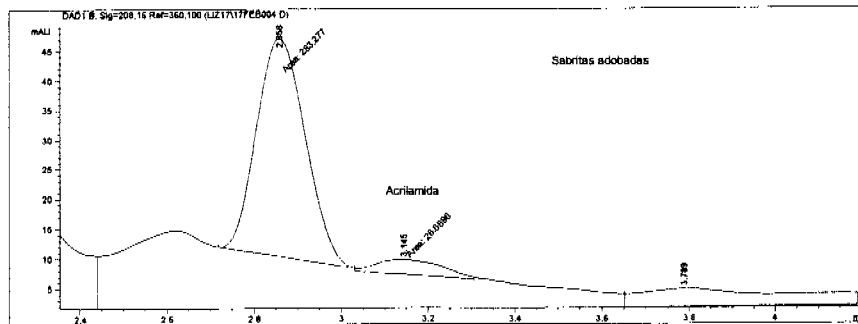


Figura B.39

Lote 4

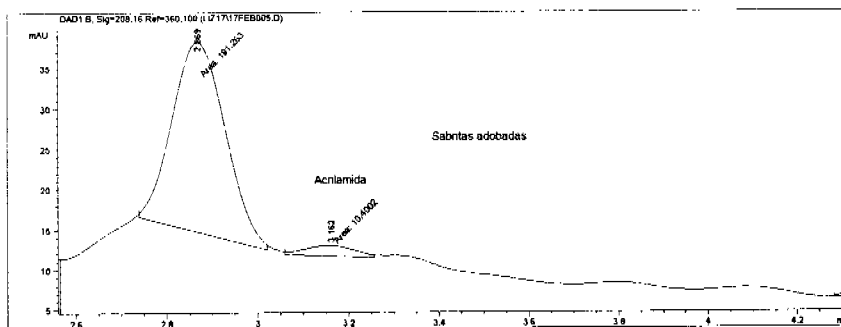


Figura B.40

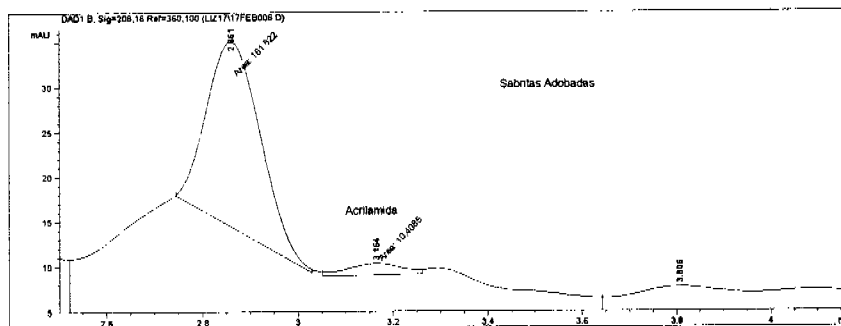


Figura B.41

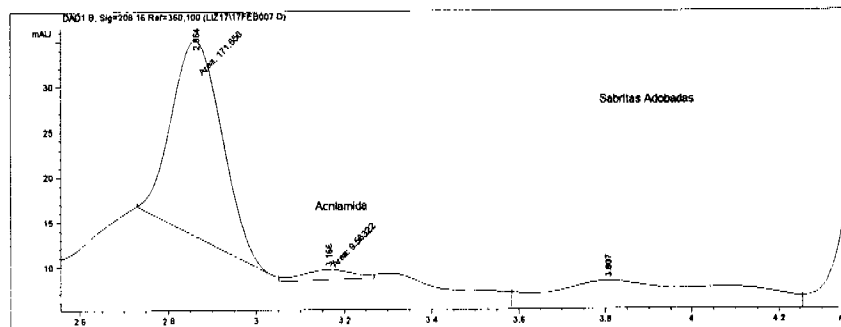


Figura B.42

Lote 5

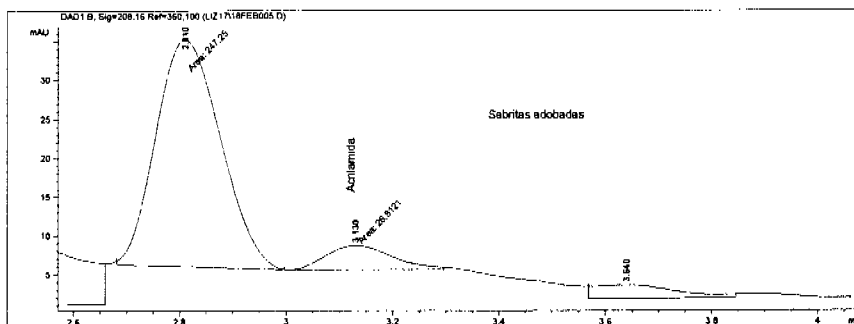


Figura B.43

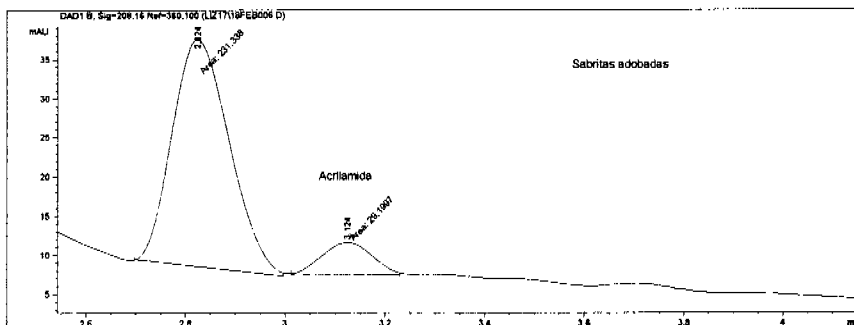


Figura B.44

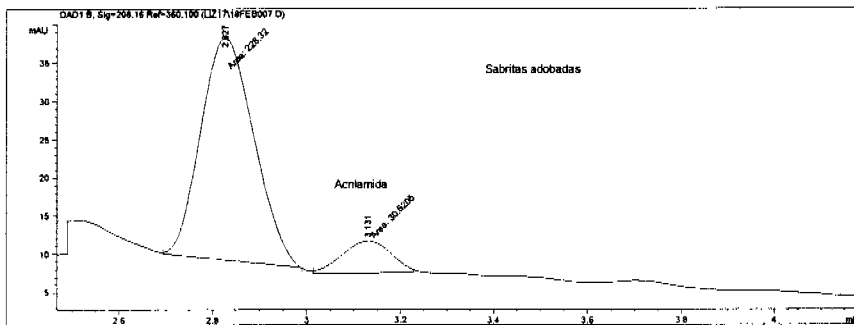


Figura B.45

Sabritas limón

Lote 1

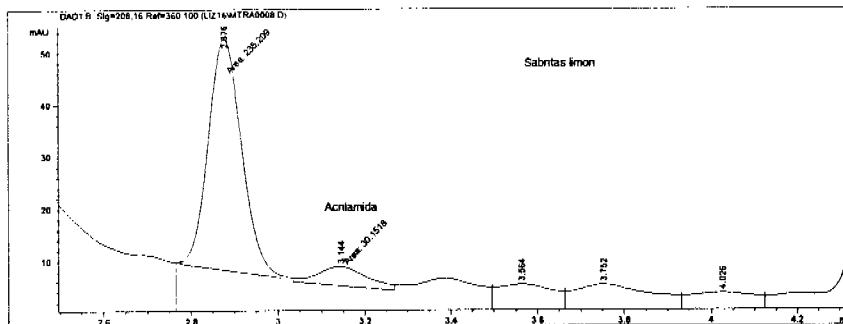


Figura B.46

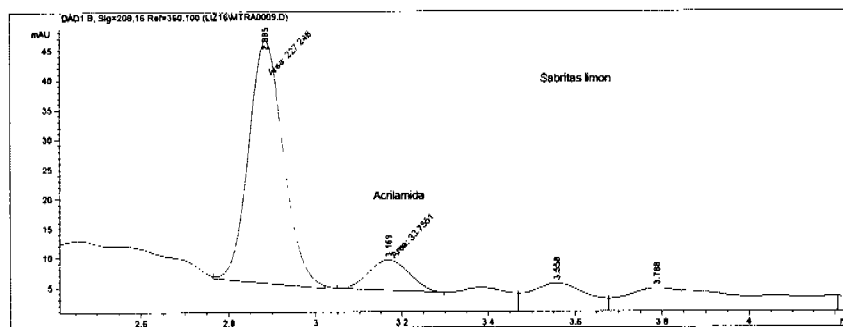


Figura B.47

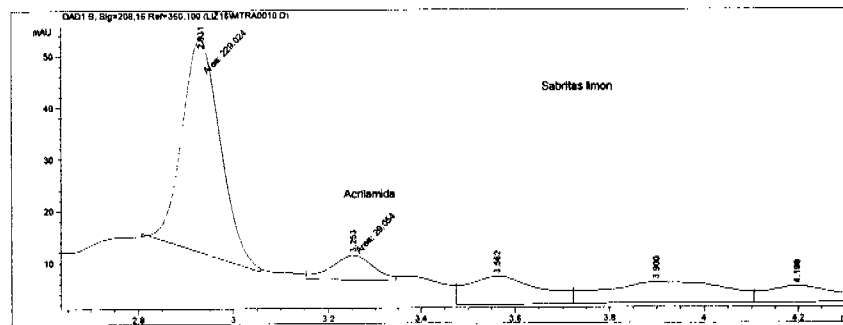


Figura B.48

Lote 2

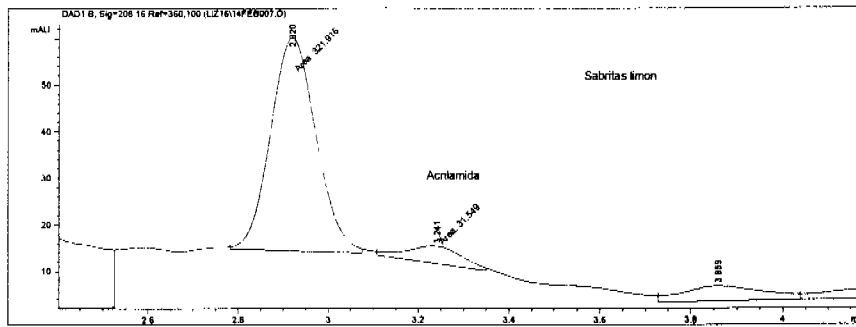


Figura B.49

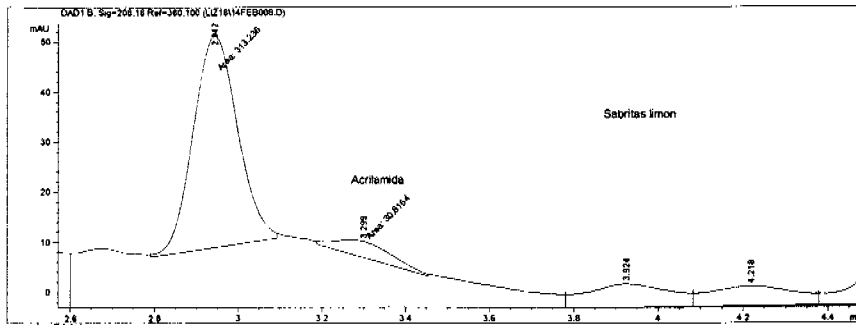


Figura B.50

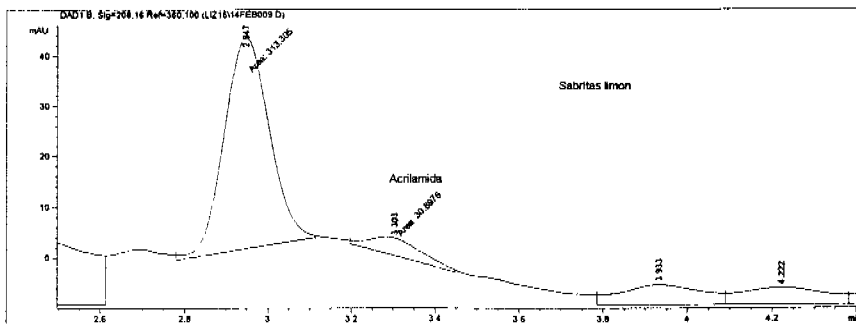


Figura B.51

Lote 3

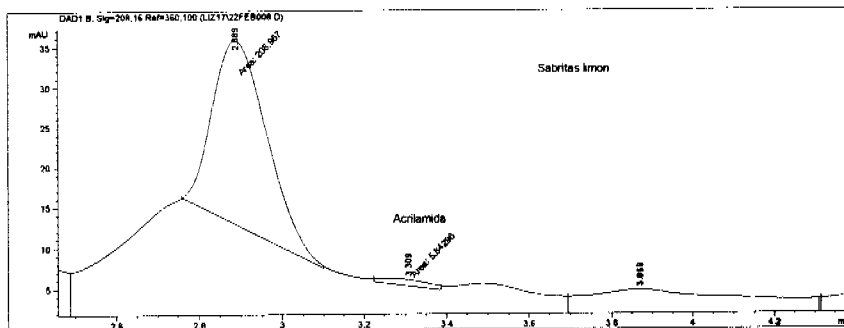


Figura B.52

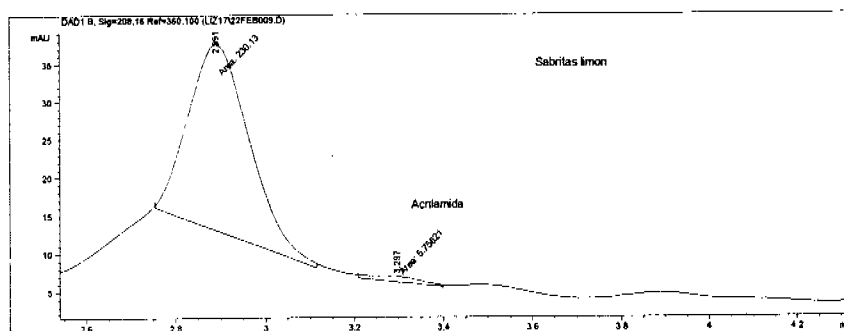


Figura B.53

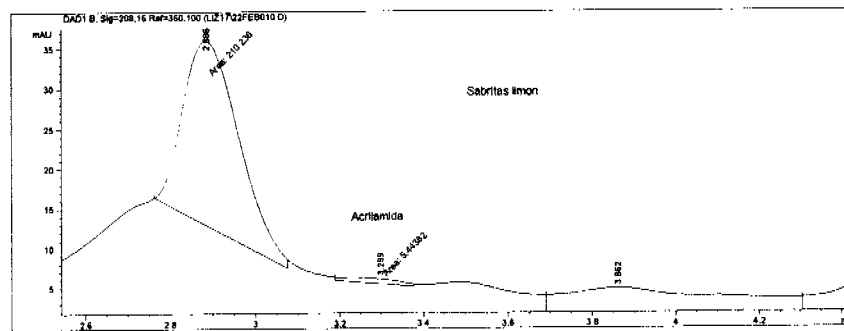


Figura B.54

Lote 4

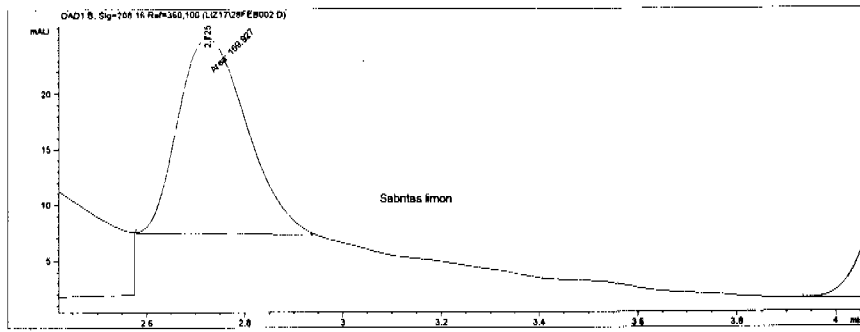


Figura B.55

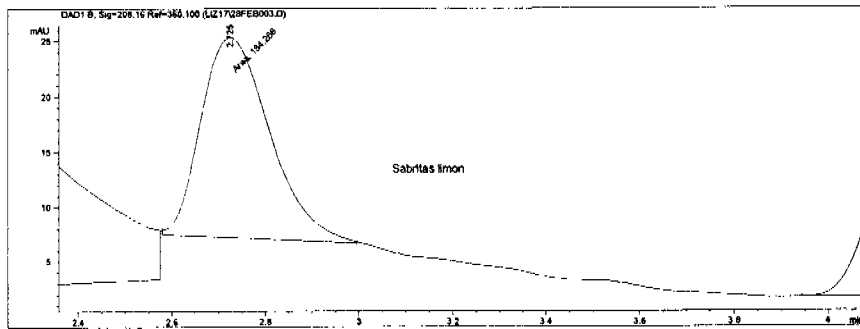


Figura B.56

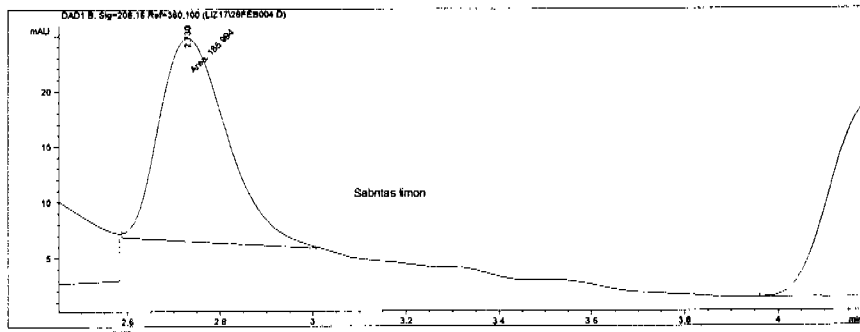


Figura B.57

Lote 5

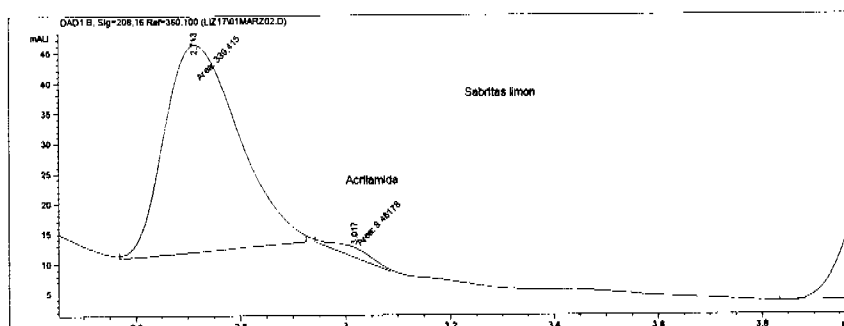


Figura B.58

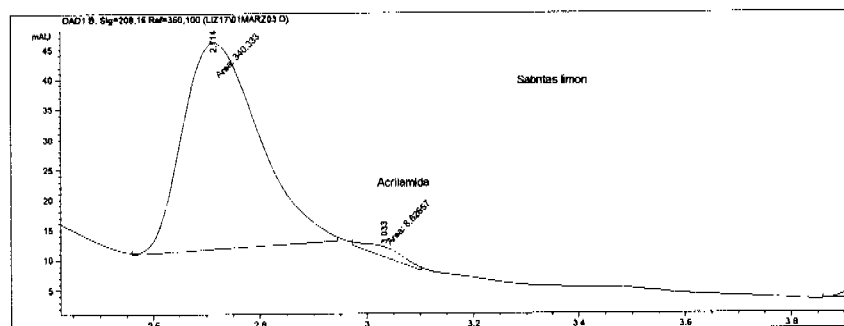


Figura B.59

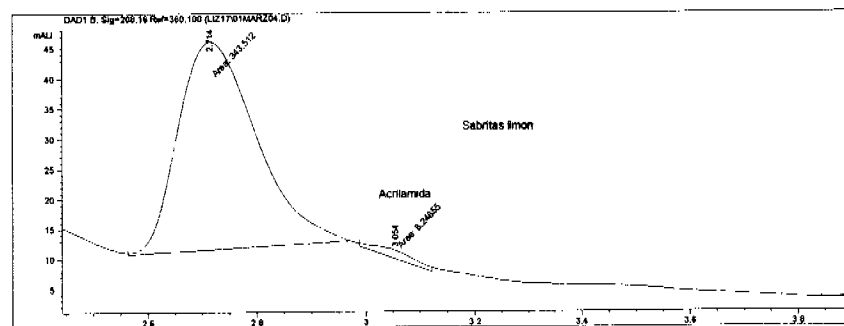


Figura B.60

CHIPS SAL

Lote 1

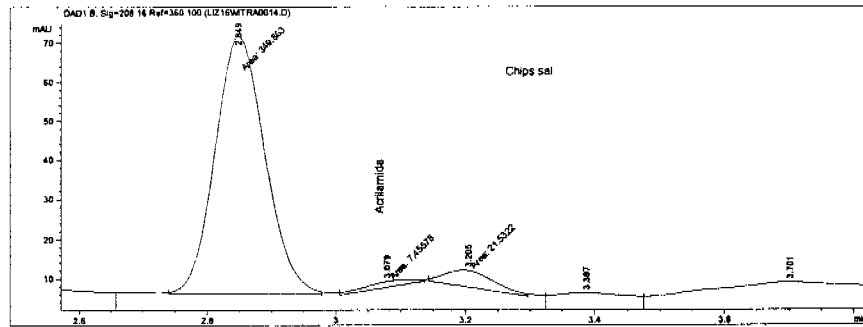


Figura B.61

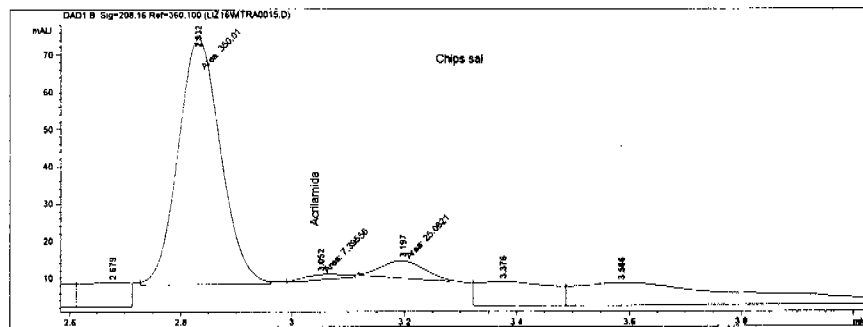


Figura B.62

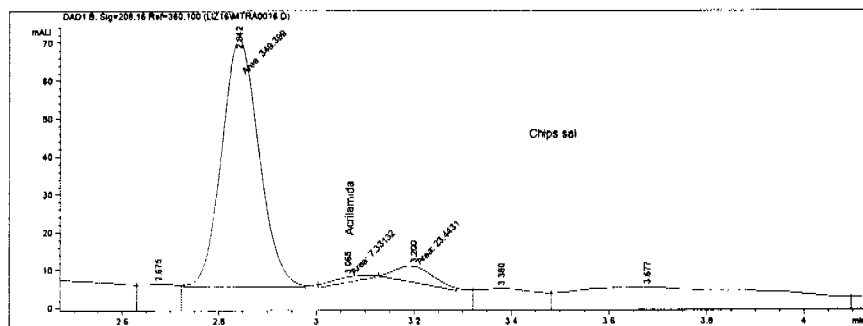


Figura B.63

Lote 2

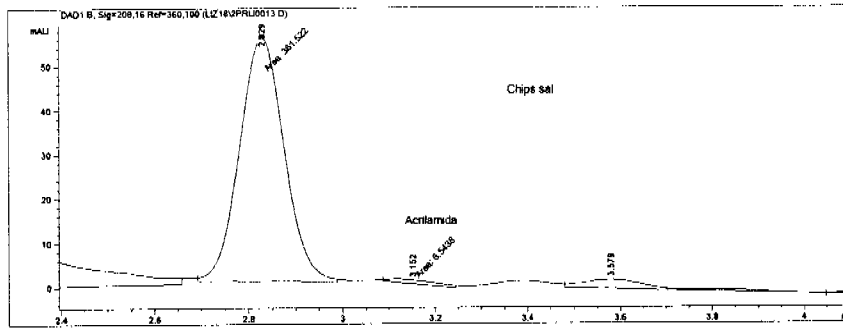


Figura B.64

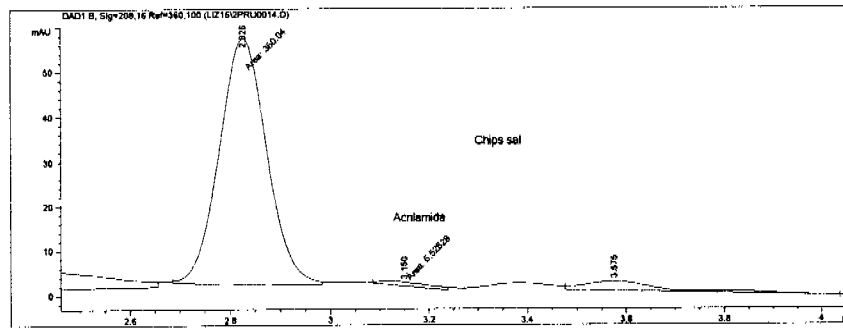


Figura B.65

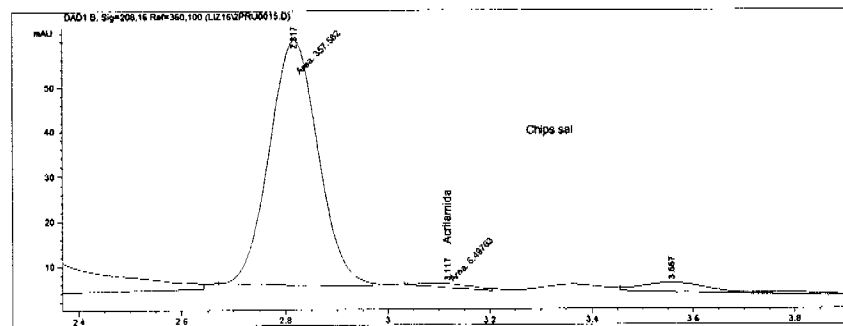


Figura B.66

Lote 3

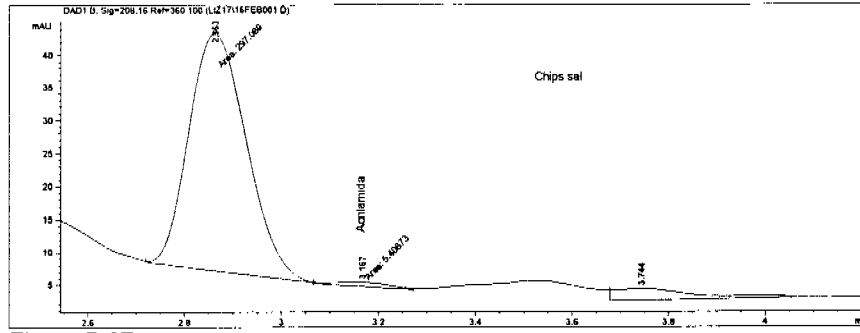


Figura B.67

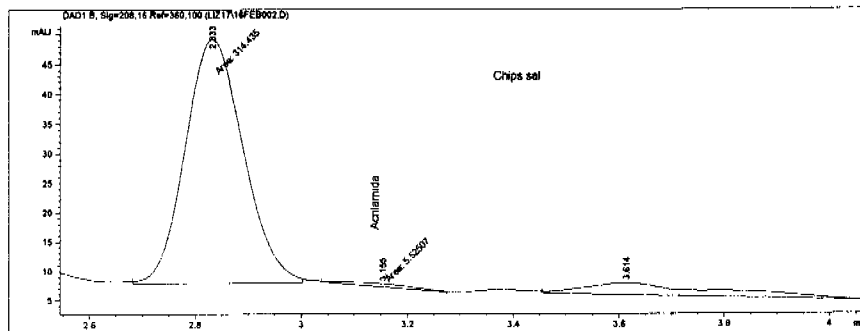


Figura B.68

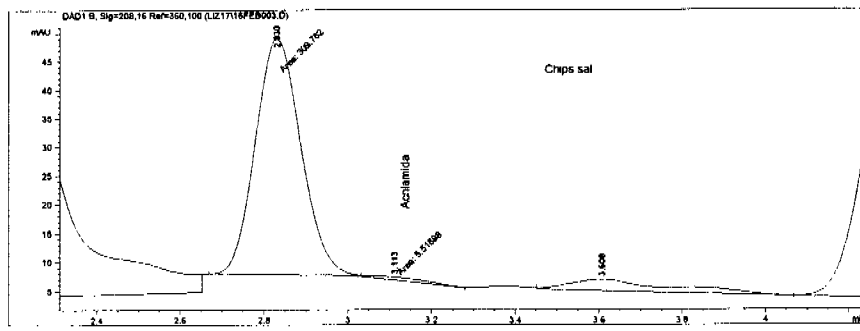


Figura B.69

Lote 4

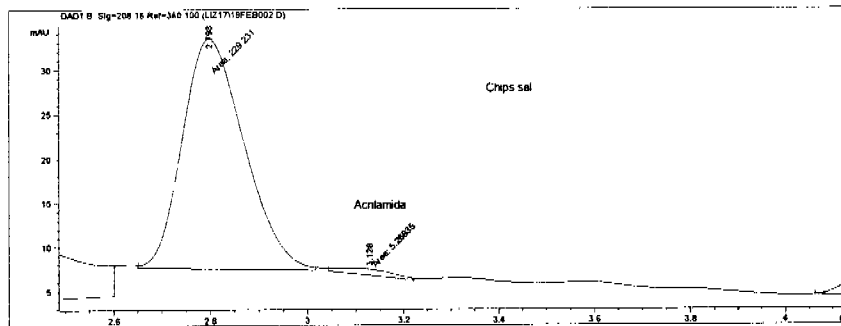


Figura B.70

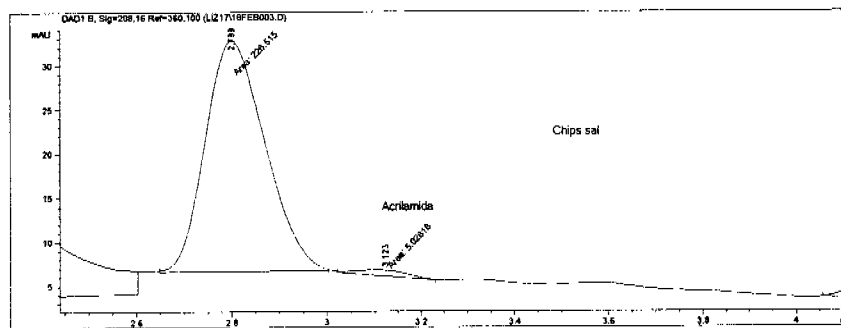


Figura B.71

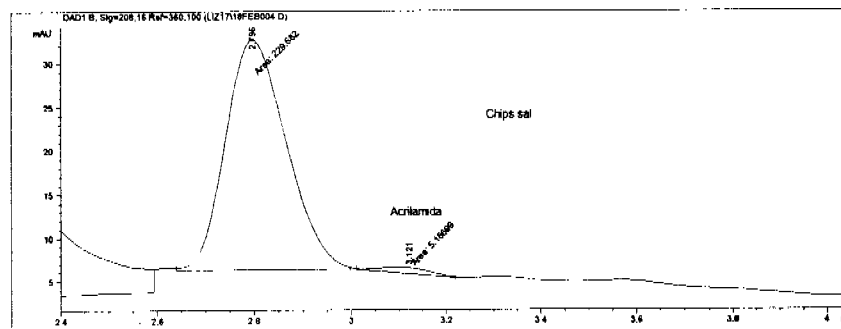


Figura B.72

Lote 5

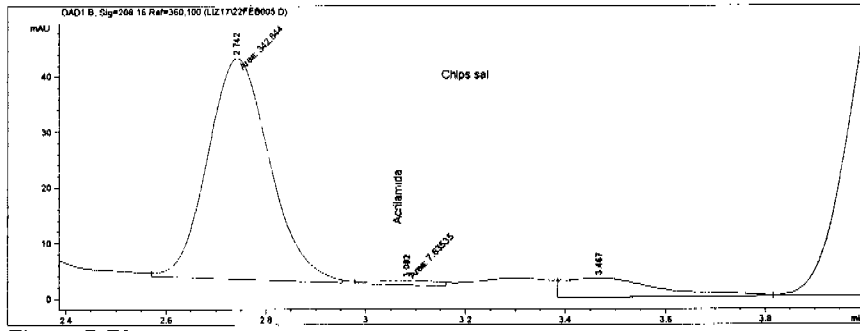


Figura B.73

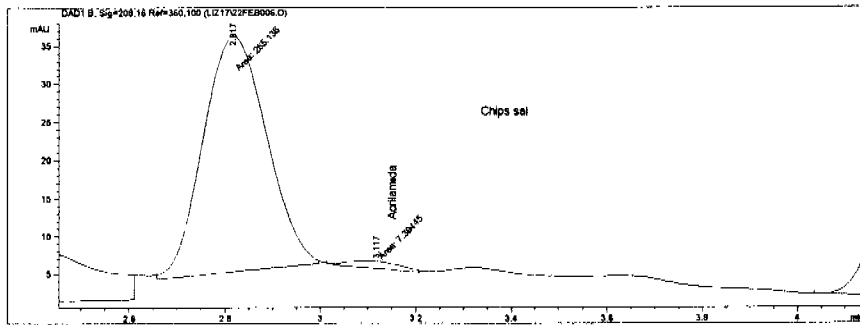


Figura B.74

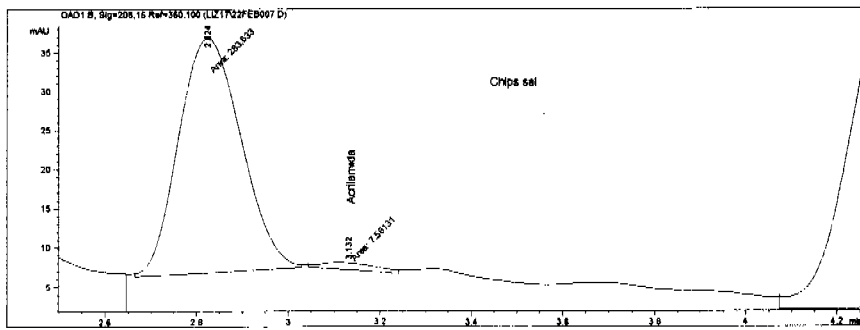


Figura B.75

CHIPS JALAPEÑO

Lote 1

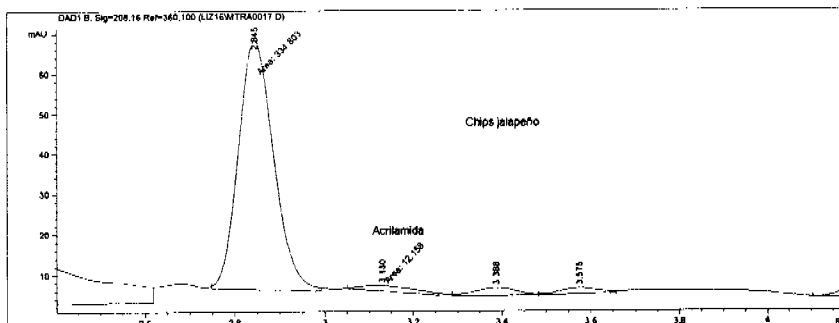


Figura B.76

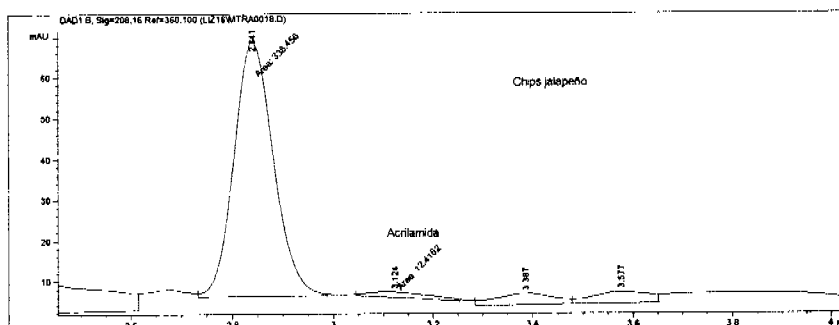


Figura B.77

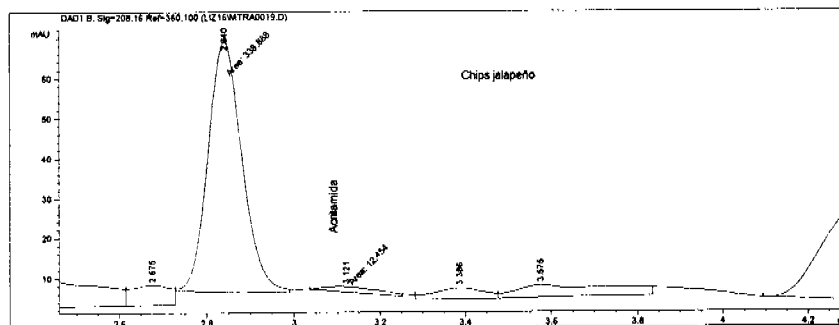


Figura B.78

Lote 2

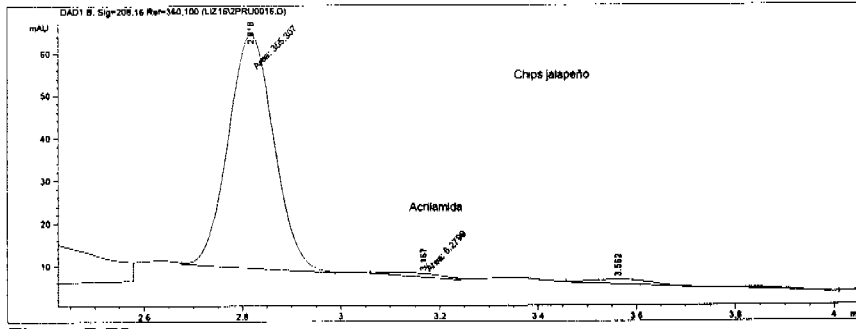


Figura B.79

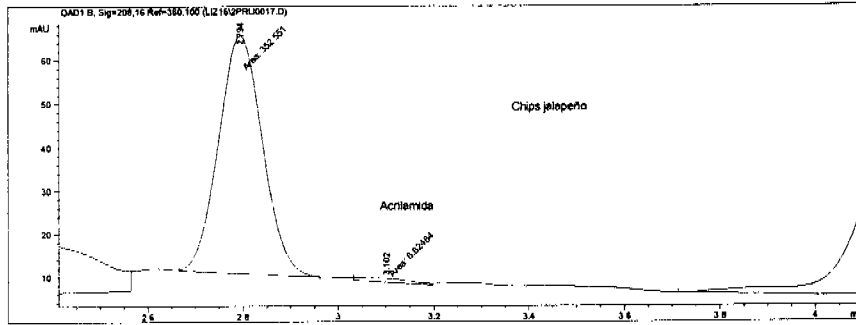


Figura B.80

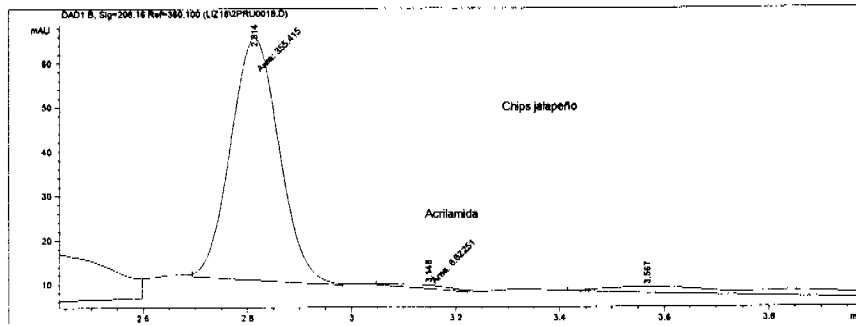


Figura B.81

Lote 3

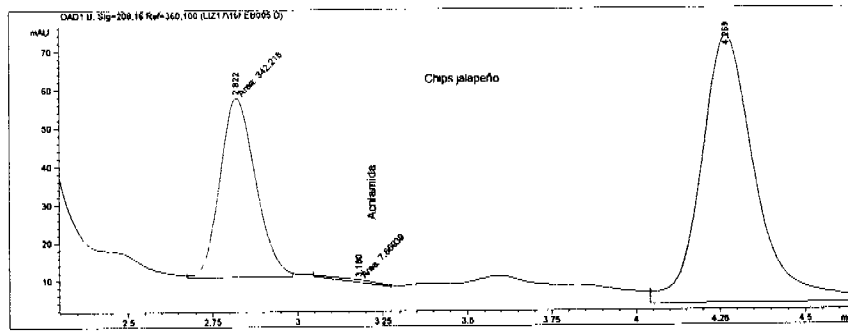


Figura B.82

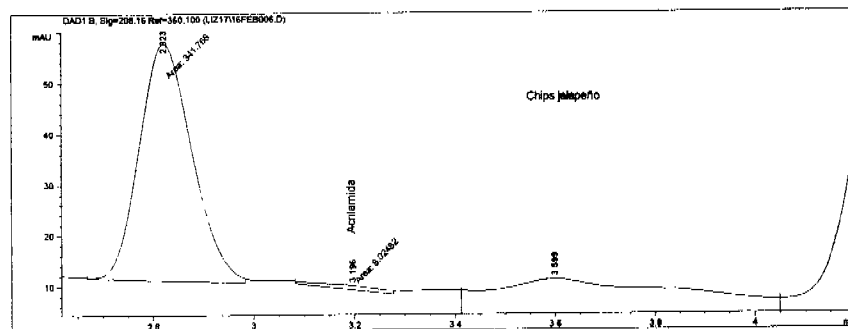


Figura B.83

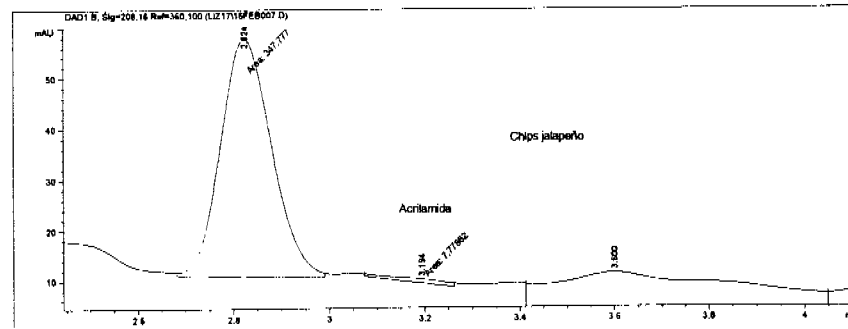


Figura B.84

Lote 4

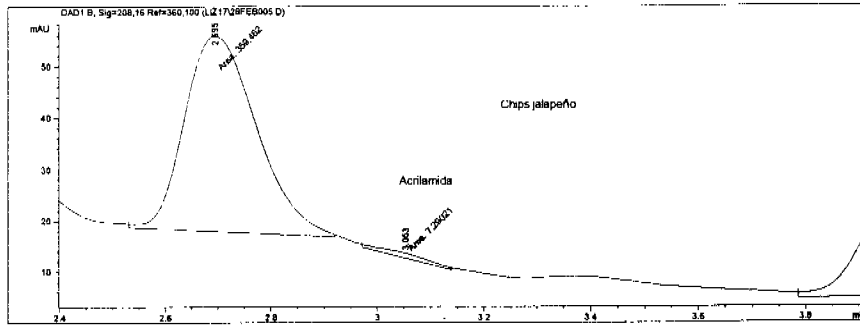


Figura B.85

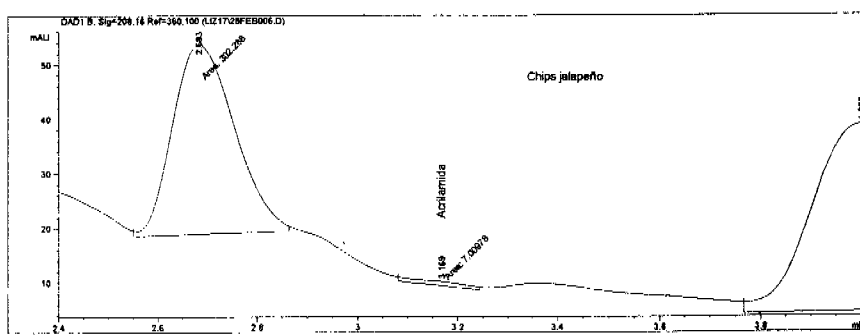


Figura B.86

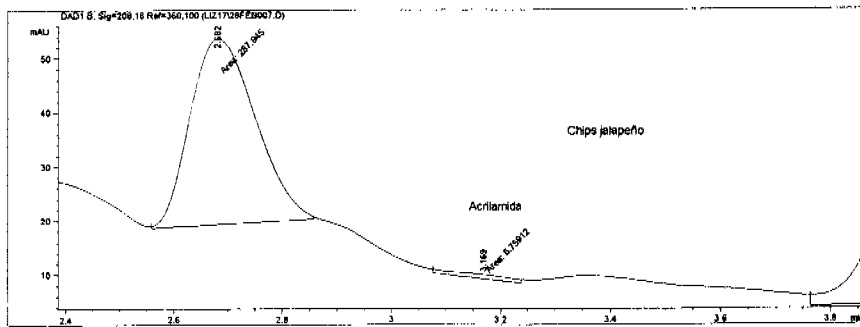


Figura B.87

Lote 5

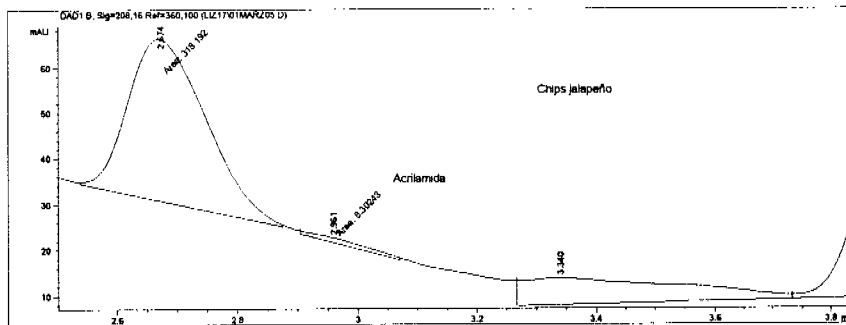


Figura B.88

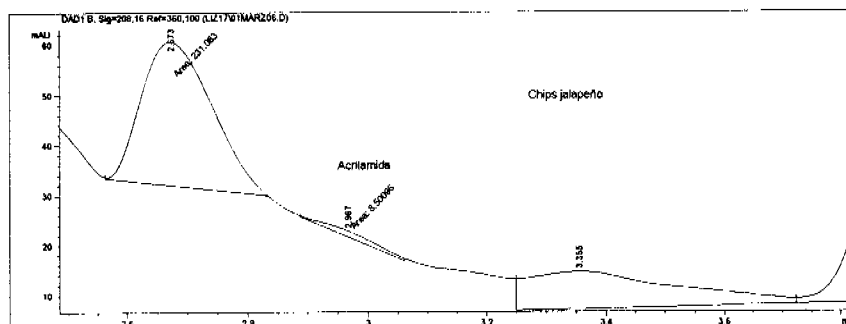


Figura B.89

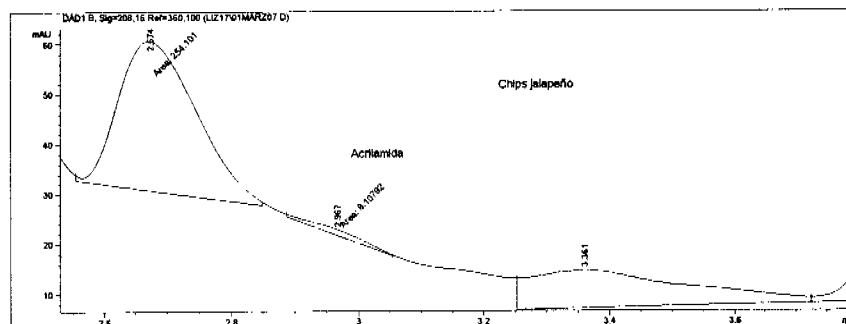


Figura B.90

Mc Donalds

Lote 1

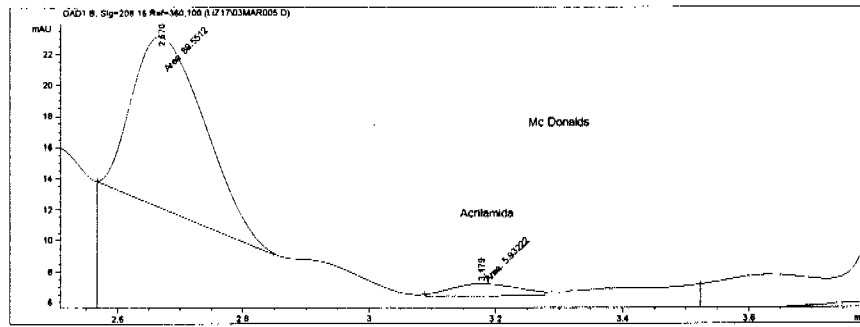


Figura B.91

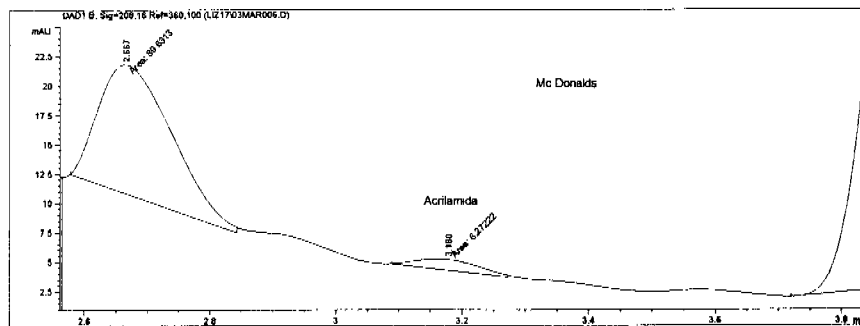


Figura B.92

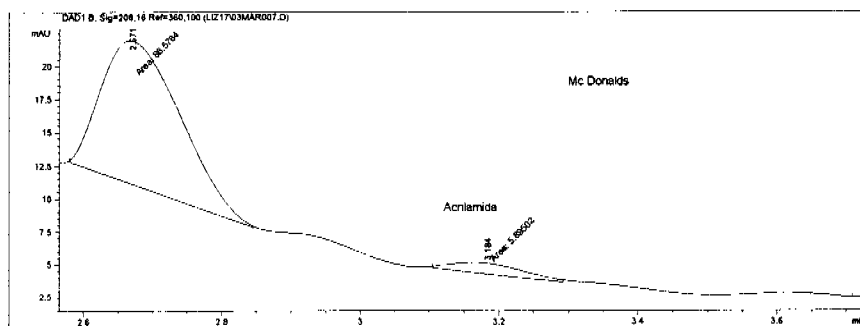


Figura B.93

Lote 2

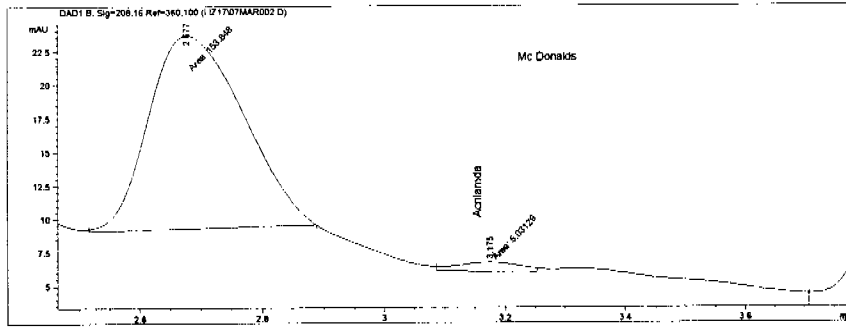


Figura B.94

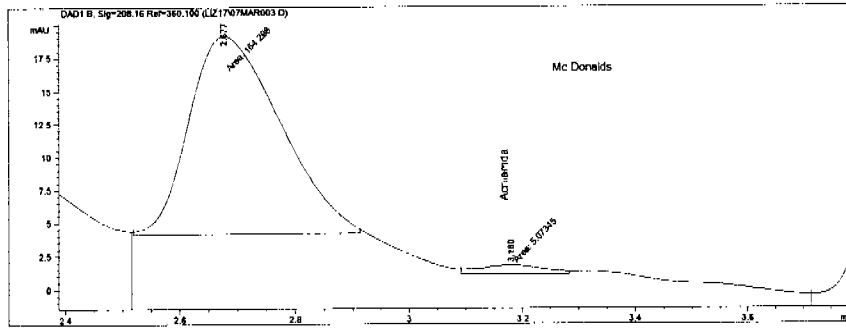


Figura B.95

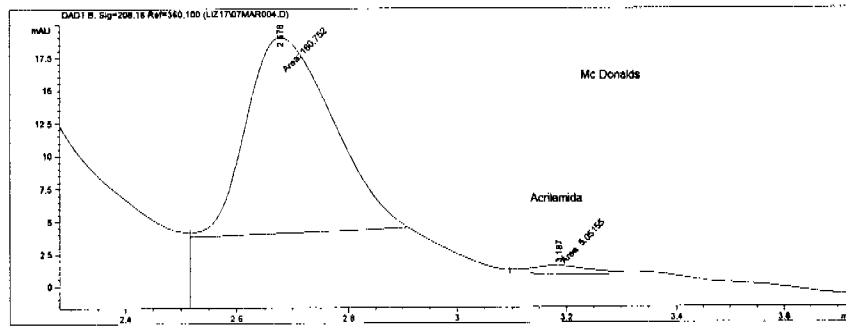


Figura B.96

Lote 3

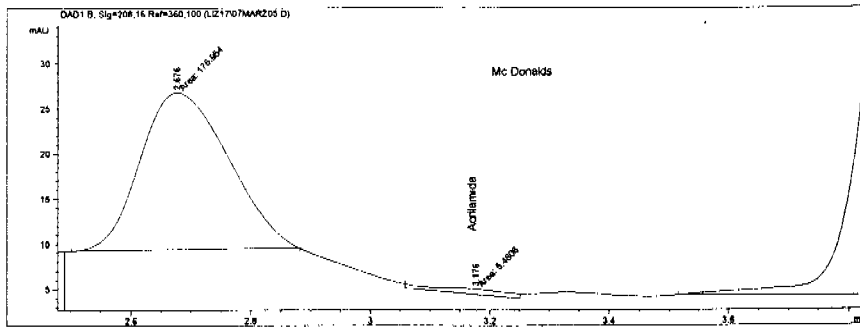


Figura B.97

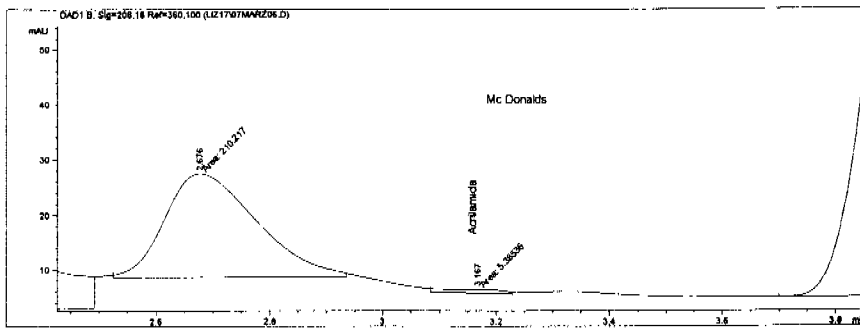


Figura B.98

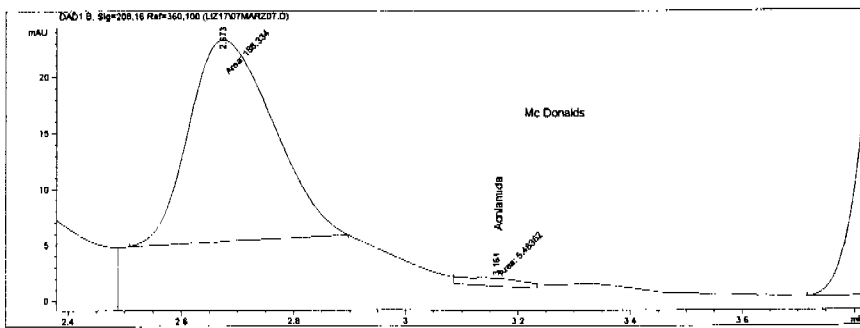


Figura B.99

Lote 4

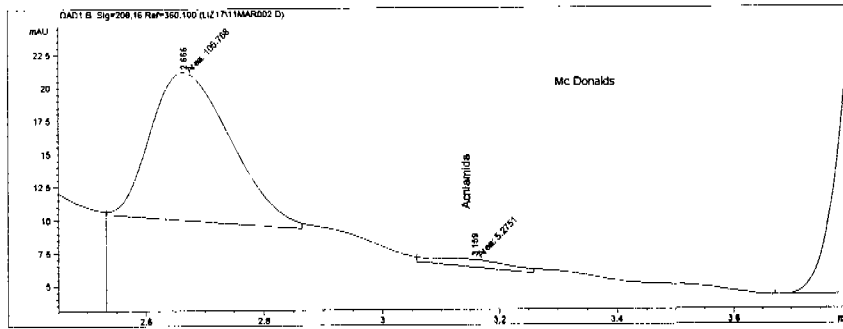


Figura B.100

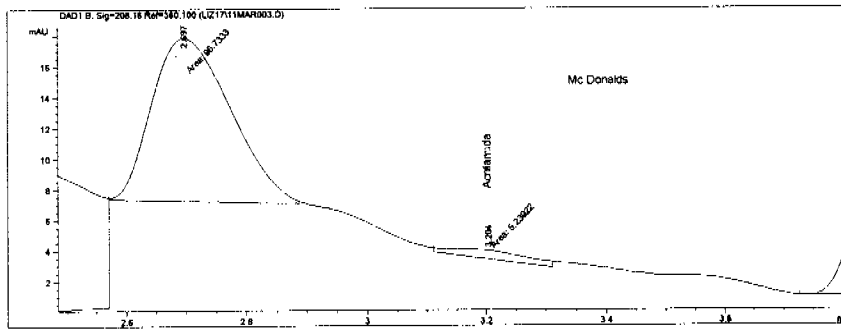


Figura B.101

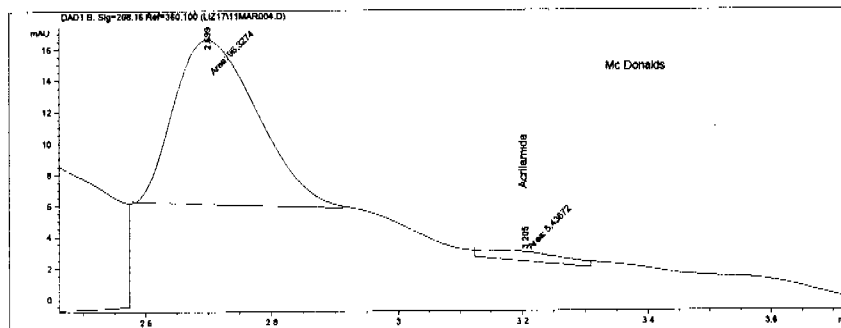


Figura B.102

Lote 5

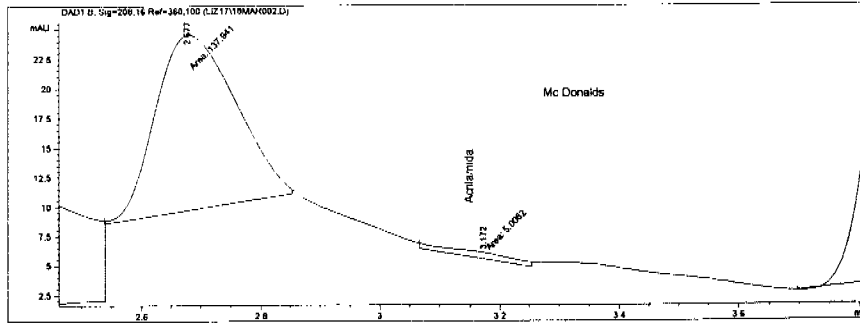


Figura B.103

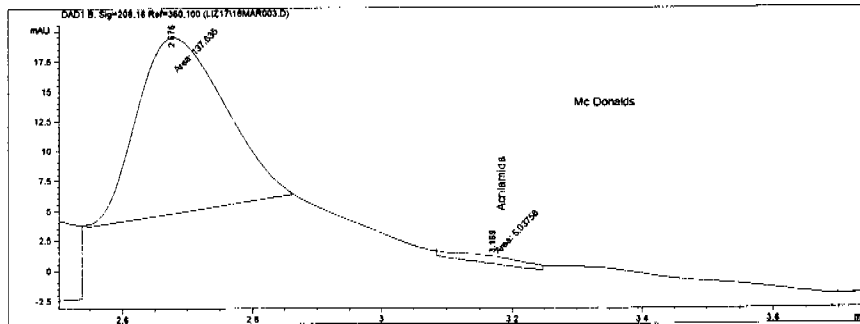


Figura B.104

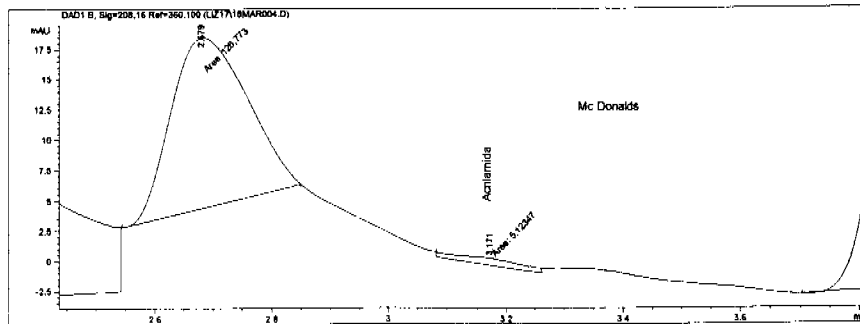


Figura B.105

Burger King

Lote 1

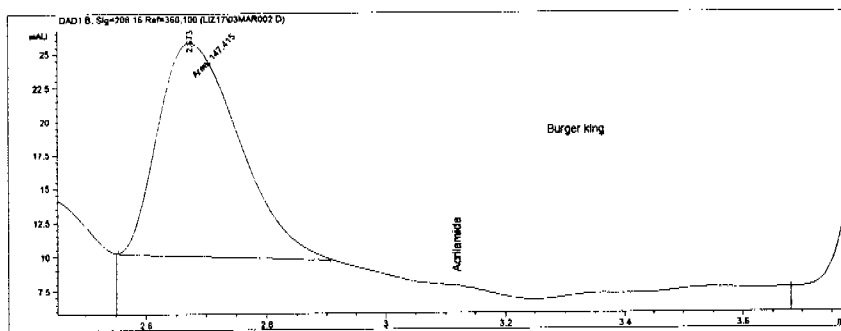


Figura B.106

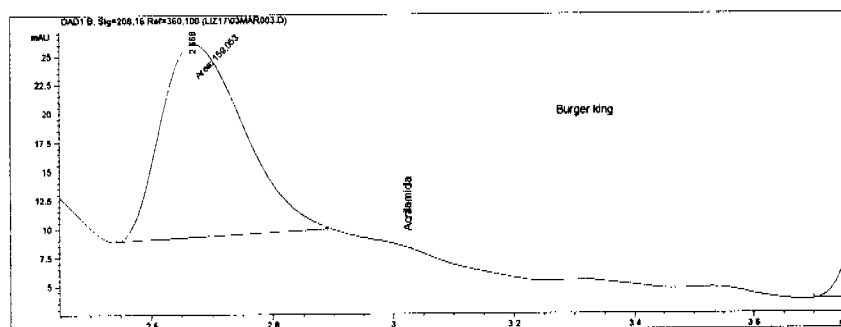


Figura B.107

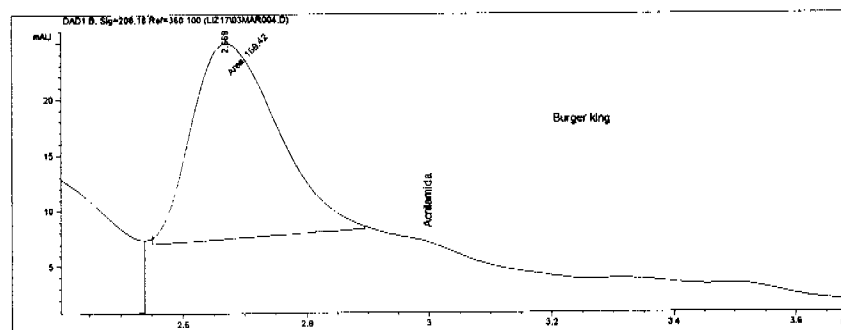


Figura B.108

Lote 2

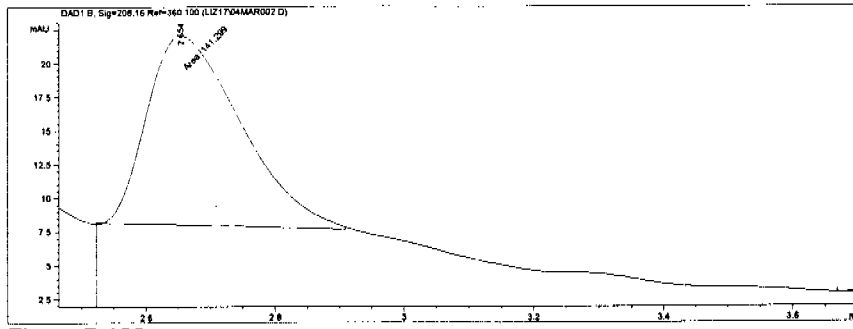


Figura B.109

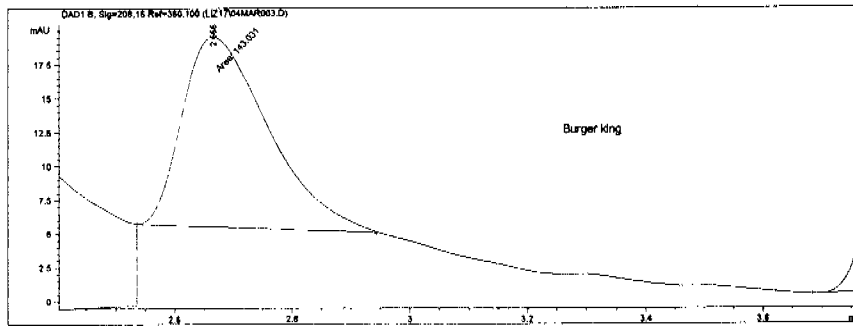


Figura B.110

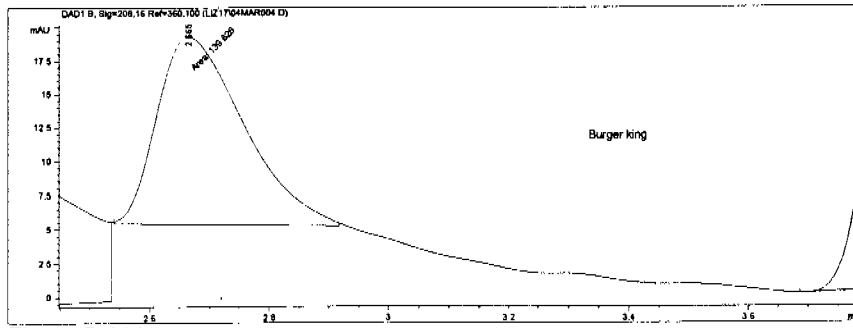


Figura B.111

Lote 3

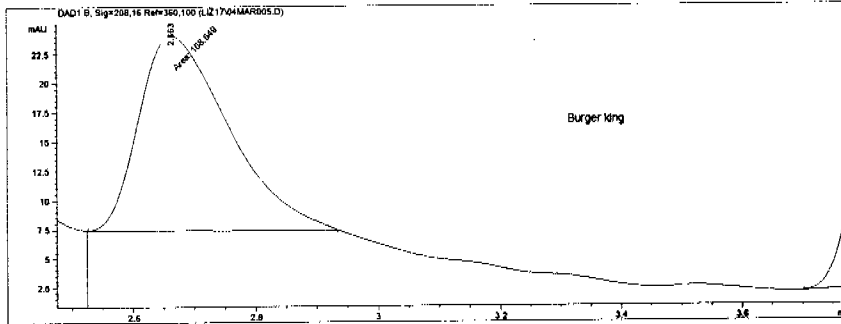


Figura B.112

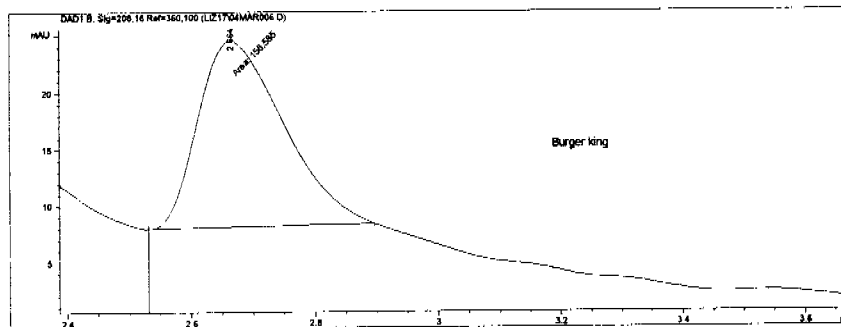


Figura B.113

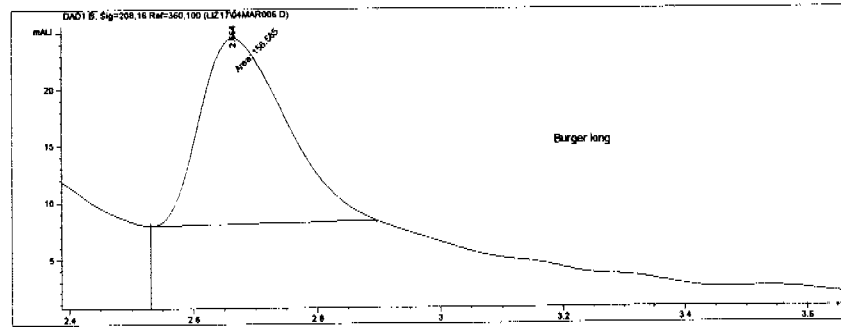


Figura B.114

Lote 4

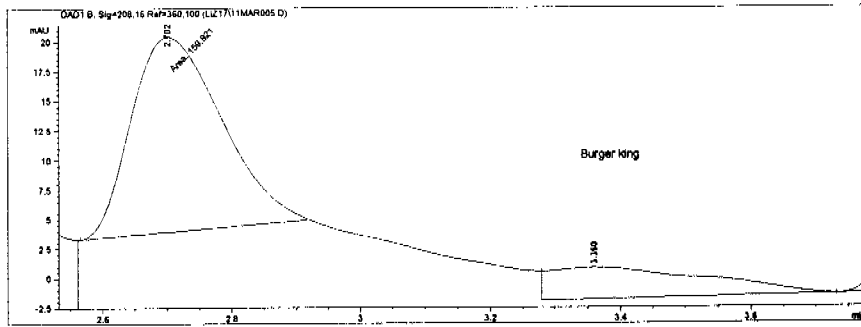


Figura B.115

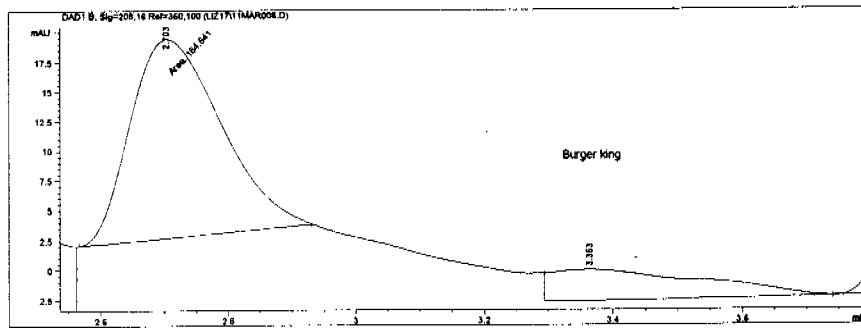


Figura B.116

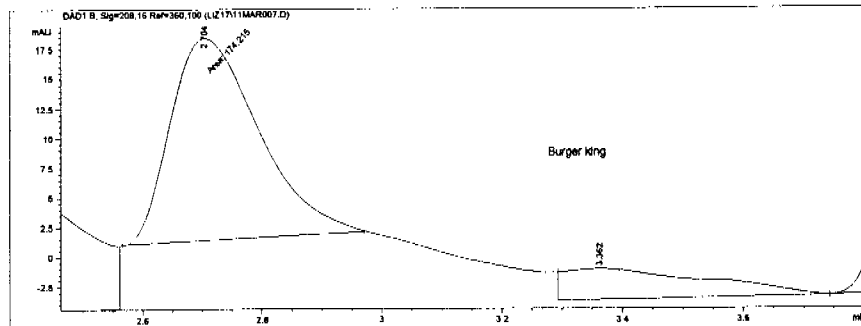


Figura B.117

Lote 5

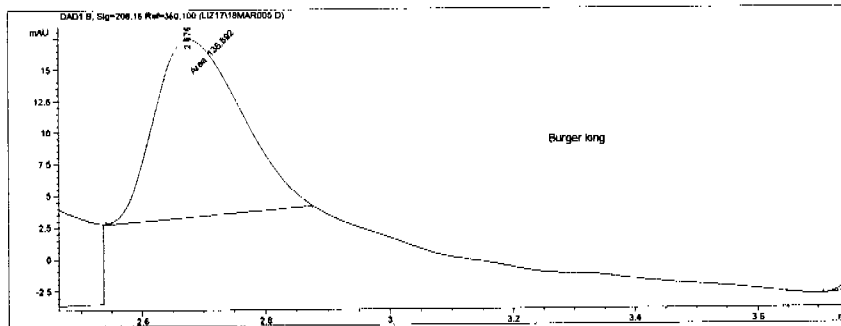


Figura B.118

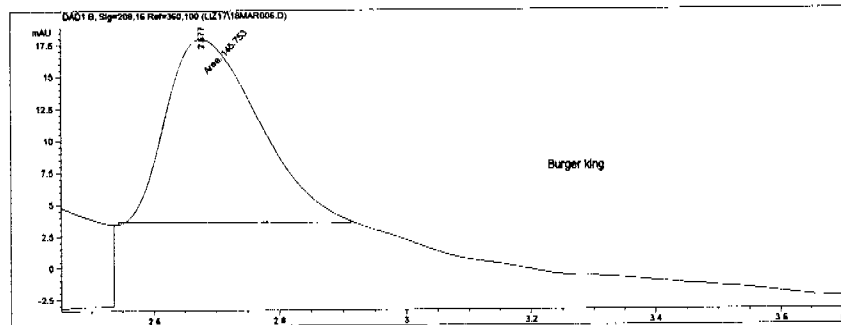


Figura B.119

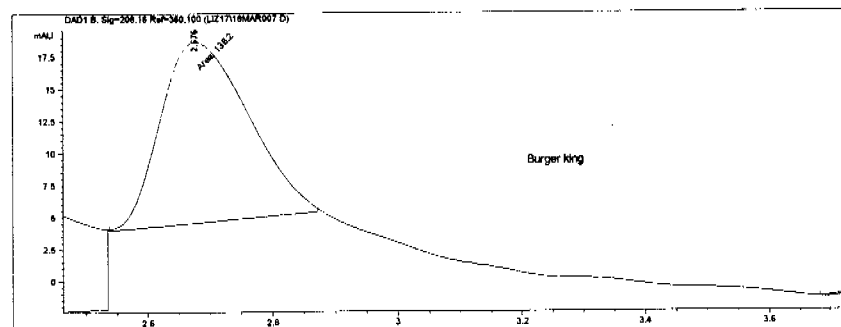


Figura B.120

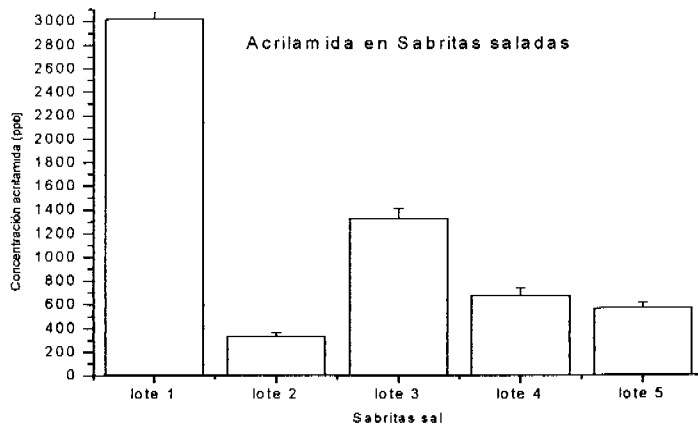


Figura B.121 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas Sabritas saladas con barras de intervalo de confianza

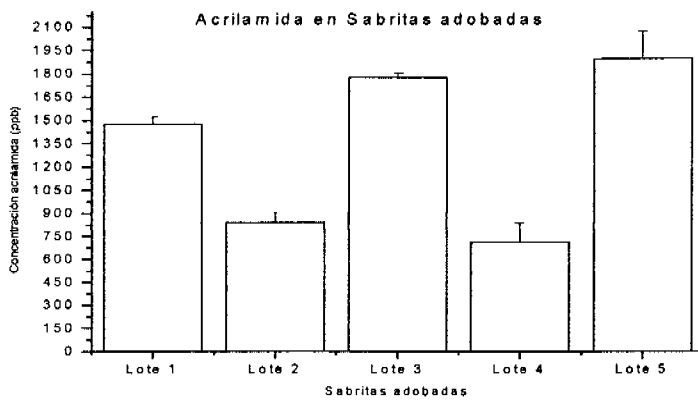


Figura B.122 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas Sabritas adobadas con barras de intervalo de confianza

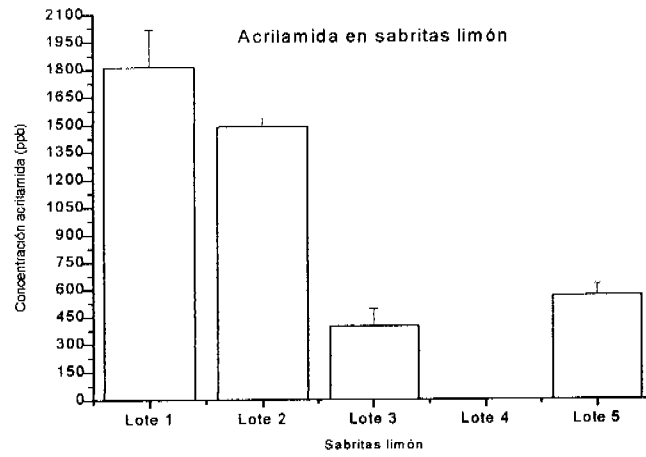


Figura B.123 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas Sabritas limón con barras de intervalo de confianza

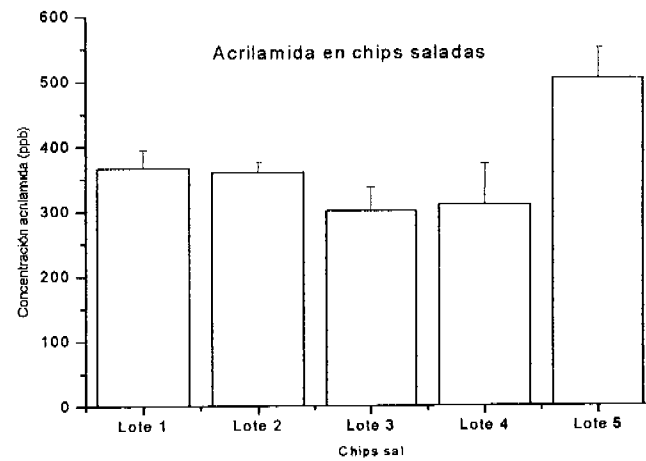


Figura B.124 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas de Chips sal con barras de intervalo de confianza

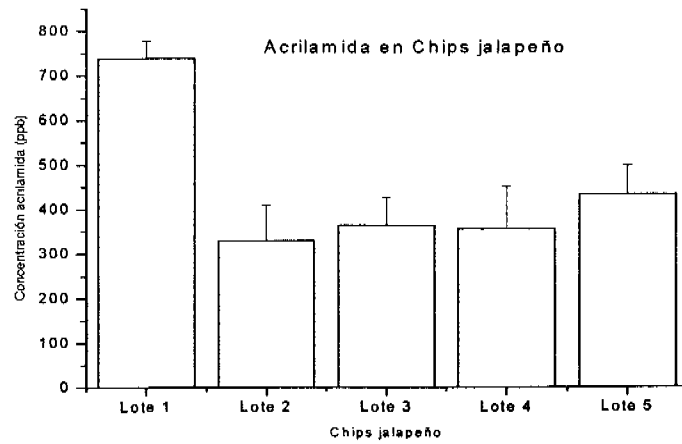
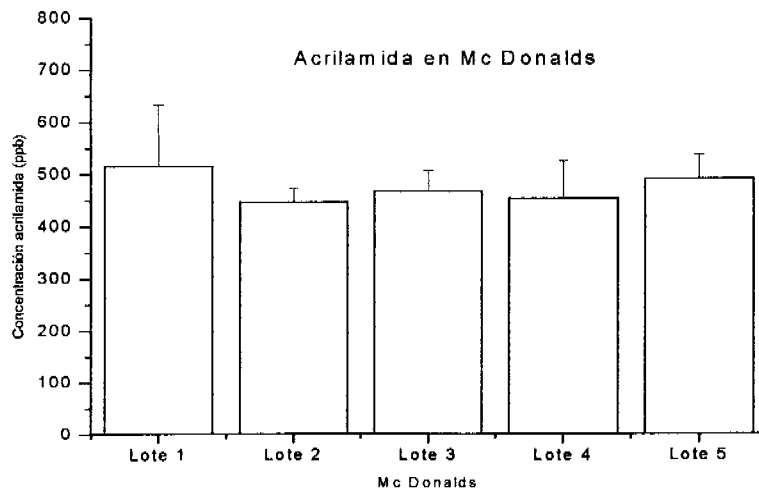


Figura B.125 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas Chips jalapeño con barras de intervalo de confianza



B.126 Gráfica de concentración de acrilamida en ppb para cada lote de papas Mc Donalds con barras de intervalo de confianza

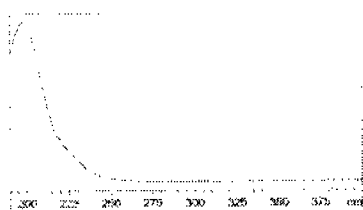


Figura B.127 Espectro UV de estándar de archilamida.

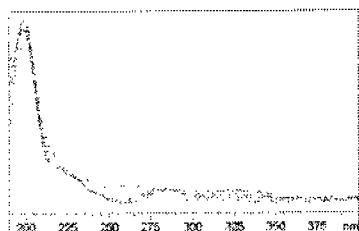
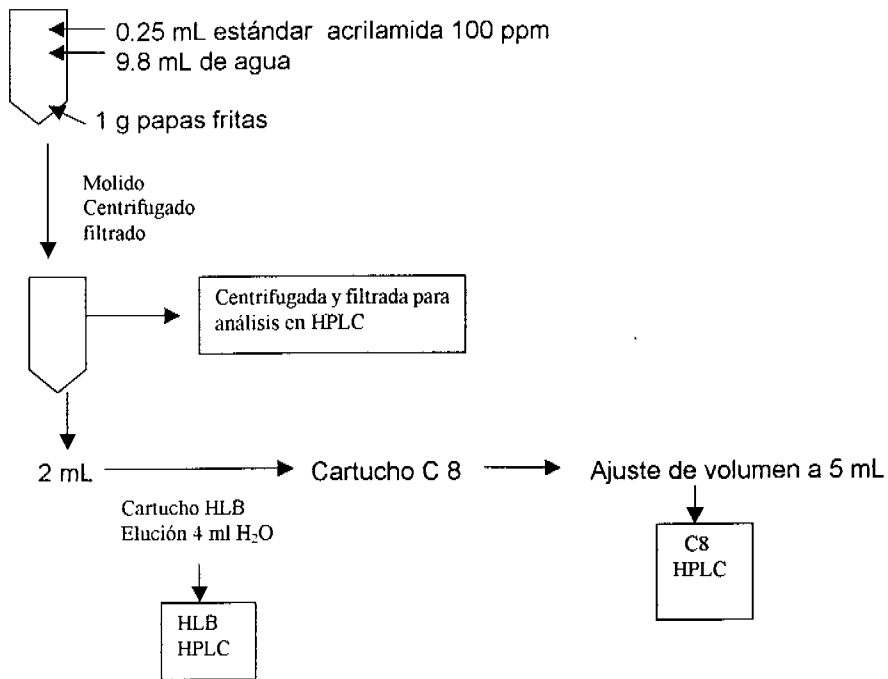


Figura B.128 Espectro UV de pico en tiempo de retención 3.1-3.2 de muestra de papas Sabritas sabor limón.

APENDICE C

Cálculos

C.1 Cálculos de recobro



*Concentración en extracto filtrado y centrifugado

Teóricamente:

$$\text{ppm} = \frac{\mu\text{g}}{\text{mL}}$$

$$\mu\text{g acrilamida} = (0.25 \text{ mL}) \left(\frac{100 \mu\text{L}}{\text{ml}} \right) = 25 \mu\text{g acrilamida}$$

$$\frac{25 \mu\text{g acrilamida}}{10.05 \text{ mL}} = \underline{2.4876 \text{ ppm}}$$

Fortificado 1:

$$2.4876 \text{ ppm} - 100\%$$

$$2.3503 \text{ ppm} - \quad \times \quad = \underline{94.4806 \% \text{ Recobro}}$$

Fortificado 2:

2.4876 ppm – 100%

2.3703 ppm - x = 95.2846 % Recobro

*Concentración en extracto obtenido de cartucho HLB

Teóricamente:

25 µg acrilamida – 10.05 mL

x - 2.0 mL = 4.9751 µg acrilamida

ppm = $\frac{4.9751 \text{ µg acrilamida}}{4 \text{ mL}}$ = 1.2438 ppm

Fortificado 1:

1.2438 ppm - 100%

1.1570 ppm - x = 93.0214 % Recobro

Fortificado 2:

1.2438 ppm - 100%

1.1383 ppm - x = 91.5179 % Recobro

*Concentración en extracto obtenido de cartucho C8

Teóricamente:

ppm = $\frac{4.975 \text{ µg}}{5 \text{ mL}}$ = 0.9950 ppm

Fortificado 1:

0.9950 ppm – 100%

0.6408 ppm - x = 64.4020 % Recobro

Fortificado 2:

0.9950 ppm – 100%

0.6420 ppm - x = 64.5226 % Recobro

C.2 Intervalo de confianza con 95% (tablas 3.16, 3.18, 3.20, 3.22, 3.24 y 3.26)

t student para 3-1 =2 grados de libertad es: 4.3

$$\text{Intervalo de confianza} = t * \frac{\text{desviacion estandar}}{\sqrt{n}} \quad n=3$$

*Para el lote 4 de papas Sabritas saladas se descartó el valor de la inyección 1
 Para el lote 1 de papas Sabritas adobadas se descartó el valor de la inyección 2
 t student para 2-1= 1 grado de libertad es: 12.71 y n = 2

C.3 Concentración de acrilamida en papas fritas y francesa (tablas 3.17, 3.19, 3.21, 3.23, 3.25 y 3.27)

Ejemplo para lote 1 de Sabritas saladas:

$$0.4093 \mu\text{g acrilamida/mL} * 10 \text{ mL} = 4.093 \mu\text{g acrilamida}$$

$$\frac{4.093 \mu\text{g acrilamida}}{1.3561 \text{g papa}} = \mathbf{3.0186 \mu\text{g acrilamida / g papas (ppm)}}$$

$$3.0186 \text{ ppm} * \frac{10^3 \text{ ppb}}{1 \text{ ppm}} = \mathbf{3018.6 \text{ ppb}}$$

C.4 Calculo IC anexado al valor de concentración de acrilamida en papas fritas y francesa (tablas 3.17, 3.19, 3.21, 3.23, 3.25 y 3.27)

Ejemplo para lote 1 de papas Sabritas saladas:

$$\text{IC} = 3.0186 \pm [(0.0191 \mu\text{g}/0.4093 \mu\text{g}) + (0.078 \text{ mL}/10 \text{ mL}) + (0.0001 \text{ g} / 1.3561 \text{g})]$$

↙ Intervalo de confianza
↙ Incertidumbre pipeta
↙ Incertidumbre balanza

$$\text{IC} = 3.0186 \pm 0.0546 \quad (\text{Todo multiplicado por 1000 para pasar de ppm a ppb})$$

$$\text{IC} = 3018.6 \pm 54.6$$

BIBLIOGRAFIA

¹Chemical Safety Data Sheets 4a (Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1991) 4-7.

²Mendel Friedman, "Chemistry, Biochemistry, and Safety of Acrylamide. A Review", *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003) 4504-4526.

³"Risk Assessment of Acrylamide Intake from Foods with Special Emphasis on Cancer Risk", *Report from the Scientific Committee of the Norwegian Food Control Authority* (6 June 2002) 22.

⁴Consultation on the Health Implication of Acrylamide in Food. Summary Report", *FAO/WHO* (25-27 June 2002) 1-12.

⁵Bette Hileman "Acrylamide found in cooked foods" *Government and Policy* Vol. 80 (May 2002) No. 19.

⁶Britt E. Erickson, "Finding Acrylamide", *Analytical Chemistry* (July 2004) 247A-248A.

⁷E.Tarake, et al., "Acrylamide: A Cooking Carcinogen?", *Chem Res. Toxicol.* 13 (2000) No. 6.

⁸"Acrylamide is formed in the Maillard reaction" and "Acrylamide from Maillard reaction products", *Nature* 419 (October 2002). 448-449.

⁹"ACRYLAMIDE MYSTERY SOLVED. Heating asparagines with sugar yields chemical found in cooked foods", *Today's Headlines* 80 (October 2002) No. 40.

¹⁰Tomas M. Amerein, et al., "Potencial of acrylamide formation, Sugars, and free asparagine in potatoes: A comparison of cultivars and farming systems", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.

- ¹¹ K. Hoenicke, et. al., " Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography- tandem mass spectrometry", *Analytica Chimica Acta* 520 (2004) 207-215.
- ¹² J.S.E. Williams, "Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps". *Food Chemistry* 90 (2005) 875-881.
- ¹³ Merce Fernández, "Acrilamida y reproducción humana", *Diario de la seguridad alimentaria* (15 junio 2004)
- ¹⁴ James S. Fritz and Miroslav Macka, "Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis. Review", *Journal of Chromatography A* 902 (2000) 137-166.
- ¹⁵ Judith F. Rubinson y Kenneth A. Rubinson, traducción Ma. T. Aguilar Ortega *Química Analítica Contemporánea*, (México: Pearson Education, 2000), 108-109 y 636-642.
- ¹⁶ John R. Dean, *Extraction Methods for Environmental Analysis*, (Great Britain: Wiley 1998), 34-43.
- ¹⁷ Oscar Alberto Quattrocchi, et. al., *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica*, (Argentina: Merk, 1992), 10-151.
- ¹⁸ Brian A. Bidlingmeyer. *Practical HPLC methodology and applications*. (E.U.: John Wiley and sons, 1992)
- ¹⁹ Douglas A. Skoog, et. al., *Principios de Análisis instrumental*, (España: Mc Graw Hill, 2001). 744, 749 y 786-793.
- ²⁰ Daniel C. Harris. *Análisis Químico Cuantitativo*. (España: Reverté, 2001) 720-725.

- ²¹Harold Mc Nair. **Memorias de curso de HPLC.** (México,ABC Instrumentación, 2004).
- ²² **Manual de referencia de inyector automático HP 1100.** (Alemania: Hewlett Packard, 1995).
- ²³ **Manual de referencia detector de diodos HP 1100** (Alemania: Hewlett Packard, 1995).
- ²⁴ **Manual de referencia sistema de bombeo cuaternario HP 1100** (Alemania: Hewlett Packard, 1995).
- ²⁵ M. Murkovic, "Acrylamide in Austrian Food", **Journal of biochemical and biophysical methods** 61 (2004) 161-167.
- ²⁶ Trisa Robarge, Eric Phillips y Meredith Conoley, "Análisis of acrylamide in food by GC-MS", **THEAPPLICATIONSBOOK** (September 2003) 2-3.
- ²⁷ Sonja Riediker y Richard H. Stadler, "Analysis of acrylamide in food by isotopedilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry", **Journal of Chromatography** 1020 (December 2003) 121-130.
- ²⁸ U.S. Food and Drug Administration. Detection and Quantitation of Acrylamide in Foods [en línea, disponible en <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/acrylami.html>;internet; accesado el 25 febrero 2003].
- ²⁹J.C. Miller y J.N. Miller, **Estadística para química analítica**, (E.U.: Addison-Wesley Iberoamericana, 1993), 100-106.
- ³⁰ Gorbach S.G., et.al., "Derivation of the limits of detection and determination applying the calibration curve concept". **Hoechst,Bayer and University of Muster.** (Germany:1991), 3-43.

³¹EUROSADE. Riesgos de la acrilamida en la alimentación [en línea disponible en www.mayorgoma.com/a/topic.asp?TOPIC; internet; accesado el 27 abril 2005].