

Universidad Católica de Santa María
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y
Biotechnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica



**VALIDACIÓN DE UNA TÉCNICA ANALÍTICA MEDIANTE CROMATOGRFÍA
LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN (HPLC) PARA LA CUANTIFICACIÓN DE
ACRILAMIDA EN DIFERENTES TIPOS DE PAPAS FRITAS - AREQUIPA 2018**

Tesis presentada por la Bachiller:

Paredes Pinto, Alejandra Cristina

Para optar el Título Profesional de

Química Farmacéutico

Asesor:

PhD. Cárdenas García, Jaime

AREQUIPA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD CATOLICA DE SANTA MARIA
Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas
y Biotecnológicas
Escuela Profesional de Farmacia y Bioquímica

Expediente N°. 2018000003405
N° Trámite en Fac. 1752-2018
Fecha 17-07-2018

FORMATO DE TITULACION PROFESIONAL

DE: PAREDES PINTO, Alejandra Cristina

TITULO DEL PROYECTO DE TESIS:

"DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO USANDO CROMATOGRAFIA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LA CUANTIFICACION DE ACRILAMIDA EN DIFERENTES MUESTRAS DE PAPAS FRITAS-AREQUIPA 2018"

DICTAMINADORES: 1) Q. F. Mocita De La Fuente Torres 2) Mgter. Jeaneth Medina Pérez

DICTAMEN DE PLAN: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación, como Dictaminadores del Plan de Tesis presentado por la recurrente, se ha procedido a la revisión del trabajo de investigación y hechas las observaciones y sugerencias correspondientes, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad

Atentamente

Firmas:  

(Devolver antes de 8 días hábiles)

Fecha 16/11/18

ASESOR: Dr. Jaime Cárdenas García

DICTAMEN DE ASESOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación se ha asesorado el presente Trabajo de Investigación y después de efectuadas las observaciones, considero que el título debe cambiar a: "DESARROLLO Y VALIDACION DE UN METODO ANALITICO USANDO CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LA CUANTIFICACION DE ACRILAMIDA EN DIFERENTES MUESTRAS DE PAPAS FRITAS - AREQUIPA 2018" y luego de verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe con los resultados, discusión y conclusiones correspondientes considero se encuentra APTO para continuar con los trámites estipulados en el Reglamento de Grados y Títulos de nuestra Facultad

Atentamente

Firma 

Fecha 8/7/19

DICTAMINADORES BORRADOR DE TESIS:

- 1) Q. F. Juan Ramírez Orellana
- 2) Mgter. Mocita De La Fuente Torres
- 3) Mgter. Jeaneth Medina Pérez

DICTAMEN DE BORRADOR: Señor Decano de la Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas, en atención a su designación como Dictaminadores del Borrador de Tesis le manifestamos que: habiéndose concluido con el trabajo de investigación presentado por el recurrente, intitulado: "VALIDACION DE UNA TECNICA ANALITICA MEDIANTE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) PARA LA CUANTIFICACION DE ACRILAMIDA EN DIFERENTES TIPOS DE PAPAS FRITAS- AREQUIPA 2018"; verificado el cumplimiento de los objetivos y la redacción del informe correspondiente, consideramos que se encuentra APTO para continuar con los tramites de acuerdo lo estipulado en el Reglamento de Grados y Títulos de la Facultad.

Atentamente

Firma 

(Devolver antes de 15 días hábiles) Fecha

JURADOS: Presidente Q. F. JUAN RAMIREZ ORELLANA
Vocal MAG. MOCITA DE LA FUENTE TORRES
Secretario MAG. JEANETH MEDINA PEREZ

SUSTENTACIÓN DE TRABAJO:

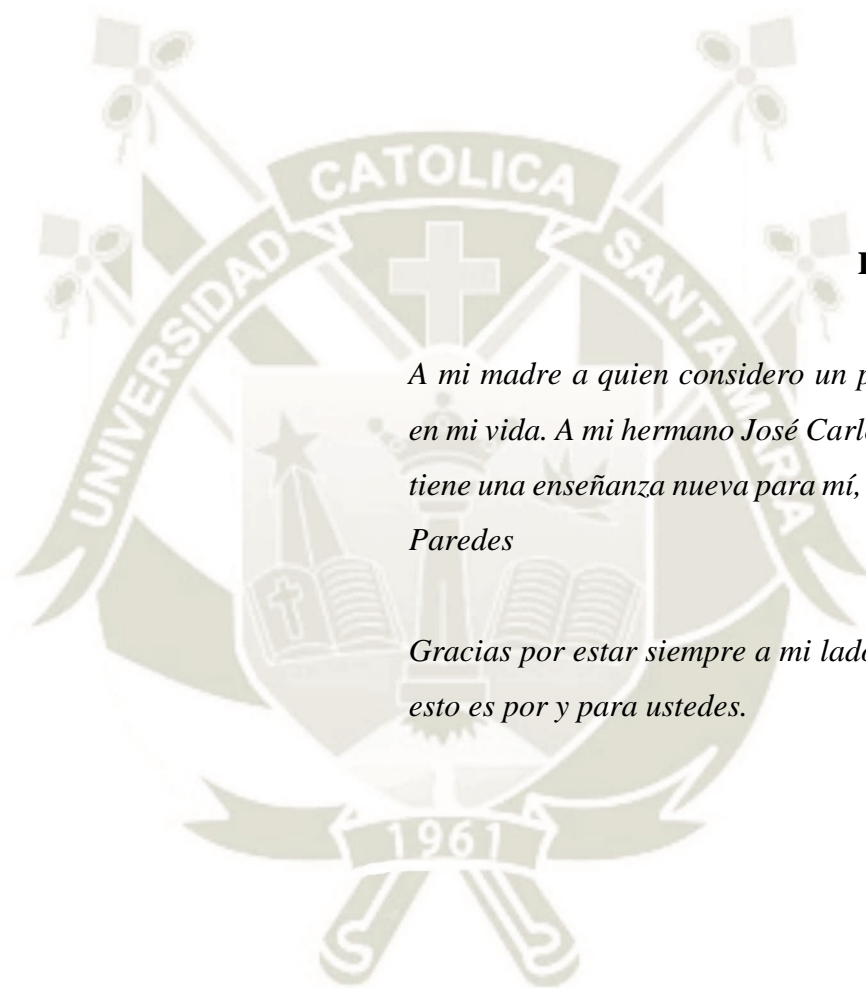
Fecha: 12/12/19

Hora: 19.00

Local: C- 402 (SUM)

DECANO





DEDICATORIA

A mi madre a quien considero un pilar fundamental en mi vida. A mi hermano José Carlos quien cada día tiene una enseñanza nueva para mí, y a mi padre José Paredes

Gracias por estar siempre a mi lado y confiar en mí, esto es por y para ustedes.

AGRADECIMIENTOS

A mi asesor el Dr. Jaime Cárdenas García, por su confianza hacia mi proyecto, dejándome aportar un poco al amplio mundo de la ciencia.

Agradezco al Laboratorio de ensayo y control de calidad por todas las enseñanzas que me ha dado y permitirme hacer uso de sus instalaciones.

A mis mejores amigas quienes estuvieron apoyándome moralmente en el transcurso del desarrollo de esta tesis.

Gracias por su tiempo y dedicación.

ÍNDICE

RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
INTRODUCCIÓN	xv
HIPÓTESIS	xviii
OBJETIVOS	xix
CAPÍTULO I MARCO TEÓRICO	1
1. Marco Teórico	2
1.1. Acrilamida.....	2
1.1.1. Generalidades	2
1.1.2. Propiedades físicas	2
1.1.3. Propiedades químicas	3
1.1.4. Propiedades analíticas.....	3
1.1.5. Toxicología.....	3
1.1.5.1. Genotoxicidad y carcinogenicidad	4
1.1.5.2. Neurotoxicidad	5
1.2. Formación de acrilamida en alimentos	6
1.3. Variables que influyen la presencia de acrilamida en papas fritas.....	9
1.4. Métodos de análisis.....	10
1.4.1. Requerimientos legales.....	10
1.4.2. Técnicas de análisis	10
1.4.3. Validación de métodos	10
1.4.4. Tratamiento de la muestra	11
1.4.4.1. Extracción.....	11
1.4.5. Desarrollos en el análisis instrumental.....	13
1.4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	13
1.4.5.2. Cromatografía de gases acoplada con espectrómetro de masas (GC-MS)	14
1.4.5.3. Cromatografía líquida acoplada con espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS)	15
1.4.5.4. Otras técnicas	15
1.5. Antecedentes de análisis por HPLC de acrilamida en papas fritas.....	16
1.6. Antecedentes de acrilamida en alimentos	16
1.7. Legislación.....	20
1.8. Métodos de mitigación.....	22
1.9. Fundamentos de Cromatografía.....	22
1.9.1. Nomenclatura.....	22

1.9.1.1.	Cromatograma.....	22
1.9.1.2.	Tiempo de retención t_R	25
1.9.1.3.	Tiempo muerto t_M	25
1.9.1.4.	Constante de distribución.....	26
1.9.1.5.	Factor de retención o factor de capacidad.....	26
1.9.1.6.	Factor de selectividad.....	27
1.9.1.7.	Resolución cromatográfica.....	27
1.9.1.8.	Eficiencia en cromatografía.....	28
1.9.2.	Factores que causan el ensanchamiento de banda.....	29
1.9.3.	Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	29
1.9.3.1.	Instrumentación.....	30
1.9.3.1.	Sistema de gradientes.....	34
1.10.	Validación de métodos analíticos.....	35
1.10.1.	Linealidad y rango.....	36
1.10.2.	Límite de detección.....	36
1.10.3.	Límite de cuantificación.....	36
1.10.4.	Precisión.....	37
1.10.5.	Exactitud.....	37
CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS.....		39
1.	LUGAR DE INVESTIGACIÓN.....	40
2.	MATERIALES.....	40
2.1.	Materiales de Laboratorio.....	40
2.2.	Equipos y aparatos.....	40
2.3.	Reactivos.....	41
2.4.	Otros materiales.....	41
2.5.	Muestras de estudio.....	41
3.	MÉTODOS.....	41
3.1.	Análisis de acrilamida por Cromatografía líquida de alta resolución.....	41
3.1.1.	Preparación de la fase móvil.....	42
3.1.2.	Preparación de la solución stock del estándar de acrilamida.....	42
3.2.	Validación del método analítico.....	42
3.2.1.	Linealidad.....	43
3.2.2.	Límite de Detección y Cuantificación.....	45
3.2.3.	Precisión.....	46
3.2.3.1.	Precision intermedia.....	47
3.2.3.2.	Repetibilidad.....	47
3.2.4.	Exactitud.....	48

3.3. Recolección de las muestras	48
3.3.1. Primera Parte:	49
3.3.1.1. Prueba F de Snedecor- Fisher.....	50
3.3.2. Segunda Parte:	50
3.4. Tratamiento de la muestra.....	51
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	55
4.1. Tiempo de retención	55
4.2. Validación del método analítico	55
4.2.1. Calibración y linealidad en la determinación de acrilamida.....	55
4.2.2. Límite de Detección y Cuantificación	60
4.2.3. Precisión	60
4.2.3.1. Precisión intermedia	60
4.2.3.2. Repetibilidad	61
4.2.4. Exactitud.....	62
4.3. Resultados de las muestras de acrilamida en las muestras estudiadas.....	64
4.3.1. Primera parte:	64
4.3.1.1. Influencia del solvente sobre el proceso de extracción	66
4.3.2. Segunda parte:	68
4.1. Comparación con reglamentos internacionales	70
CONCLUSIONES	72
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
ANEXOS	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Referencias de análisis de acrilamida por HPLC.	17
Tabla 1.2: Estimación de la exposición dietética de acrilamida en algunos países (15).	19
Tabla 1.3: Niveles documentados de acrilamida en alimentos (19).	20
Tabla 1.5: Valores indicativos de AA en alimentos según la Comisión de Recomendación	21
Tabla 1.6: Valores indicativos de AA en alimentos según la Comisión de Recomendación	21
Tabla 1.4: Acrilamida presente en papas fritas en diversos países analizados por técnicas cromatográficas (15).	23
Tabla 2.1: Condiciones cromatográficas para la determinación de Acrilamida en papas fritas.	42
Tabla 2.2: Concentraciones de acrilamida para la gráfica de calibración.	43
Tabla 2.3: Tipos de papa frita utilizadas en la primera parte de la Investigación y los solventes	49
Tabla 2.4: Muestras de papas fritas analizadas en la segunda parte.	50
Tabla 3.1: Registro del área determinada por HPLC con las determinadas concentraciones de los patrones preparados. Se muestra también las medias de las áreas con la cual se realizó la gráfica de calibración y su Desviación estándar.	56
Tabla 3.2: Análisis estadístico del comportamiento lineal en la gráfica de calibración señal vs concentración de acrilamida.	57
Tabla 3.4: Análisis estadístico del comportamiento lineal en la gráfica de calibración señal vs concentración de acrilamida.	59
Tabla 3.5: Límite de detección y cuantificación de la acrilamida según el método de extracción con metanol.	60
Tabla 3.6: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en días diferentes.	61
Tabla 3.8: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en lecturas consecutivas.	62
Tabla 3.9: Resultados de Repetibilidad	62
Tabla 3.10: Porcentaje de recuperación de acrilamida en la muestra a través de la técnica HPLC.	63
Tabla 3.11: Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en los tres tipos de papas fritas extraídas en agua	64
Tabla 3.12: Resultados del área del pico cromatográfico de la acrilamida en papas fritas extraída en metanol.	65
Tabla 3.13: Concentración de acrilamida en la muestra M extraída por agua (Met1) o metanol (Met2)	67
Tabla 3.14: Análisis estadístico de Fisher para la muestra de papas fritas de comida rápida (Restaurante A) sometida a los métodos de extracción, Met1(agua) y Met2 (metanol).	67
Tabla 3.15: Concentración de acrilamida en ppm correspondiente a las muestras de papas fritas “chips” a granel obtenidas de dos mercados y de dos marcas reconocidas.	69

Tabla 3.16: Resumen de la concentración de acrilamida encontrada en papas fritas de la segunda parte del estudio..... 70

Tabla 3.17: Resultados de concentración de acrilamida en las muestras analizadas 70



ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1: Estructura química de la acrilamida (AA) (13).....	2
Figura 1.2: Metabolismo de la acrilamida (18).	5
Figura 1.3: Mecanismo simplificado de formación de acrilamida (17).	7
Figura 1.4: Formación de acrilamida a partir de asparagina en presencia de α -hidroxicarbonilo (21).....	8
Figura 1.5: Adición de bromo a acrilamida (17).	14
Figura 1.6: Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes. El pico pequeño de la izquierda representa una especie que no se retiene en la columna.....	26
Figura 1.7: Separaciones correspondientes a tres resoluciones distintas.....	28
Figura 1.8: Factores que causan el ensanchamiento de banda: Difusión longitudinal.	29
Figura 1.10: Componentes del sistema de HPLC.	30
Figura 1.11: Esquema de una bomba de HPLC de pistón (61).	31
Figura 1.12: Columna cromatográfica rellena de micropartículas (61).....	32
Figura 1.13: Óptica de un detector espectrofotométrico de doble haz (61).	34
Figura 1.14: Dos cromatogramas isocráticos en columna C18; arriba una fase móvil metanol: agua 60:40 causa tiempos de retención largos; debajo, una fase móvil metanol: agua 80:20, más apolar, causa una elución más rápida, pero menor resolución en la zona inicial.	35
Figura 2.1: Soluciones de acrilamida para la gráfica de calibración.	43
Figura 2.2: Preparación de la gráfica de calibración	44
Figura 2.3: Muestra de papas fritas trituradas y calentadas a 70 °C con el Hotplate stirrer.	52
Figura 2.4: Tubos Eppendorf después de la centrifugación a 12000 rpm y 4°C.	52
Figura 2.5: Separación de la fase lipídica de la muestra con hexano, para su posterior eliminación.	53
Figura 3.1: Se observa una pureza de pico mayor a 99%.	55
Figura 3.2: Cromatograma de la gráfica de calibración de acrilamida.....	56
Figura 3.3: Gráfica de calibración de los estándares de acrilamida en el rango de concentración de 0,05 a 2,0 ppm que como se puede observar tiene un comportamiento lineal.	57
Figura 3.4: Gráfica de aproximación de Huber para estimar el rango de linealidad.	59
Figura 3.5: Cromatograma ampliado de los picos cromatográficos sobrepuestos de un estándar de acrilamida (0.5 ppm) y una muestra de papas fritas de comida rápida, utilizados para calcular el porcentaje de recuperación.....	63
Figura 3.6: Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en los tipos de papas fritas que lograron ser cuantificadas bajo las condiciones de extracción utilizadas.....	65
Figura 3.7: Cromatograma de muestras de comida rápida extraídas en (a) agua y (b) metanol	66

RESUMEN

La acrilamida es un contaminante químico que se genera como un subproducto del proceso de cocción de ciertos alimentos cuando la temperatura supera los 120 °C, como por ejemplo en las papas procesadas. Es altamente tóxica para el ser humano debido a sus características carcinogénicas, mutagénicas y neurotóxicas.

Para su identificación, se desarrolló un método utilizando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Merck Hitachi con las siguientes características: una columna R18 Merck Lichrocart, a una longitud de onda 200 nm, con una fase móvil de acetonitrilo: agua acidificada a pH 2,5 (2:98). Bajo estas condiciones se encontró que la acrilamida tiene un tiempo de retención de 2,8 minutos.

Para la validación del método se trabajó con un gráfico de calibración en un rango de 0,05 a 2,0 ppm con soluciones de acrilamida, esta presenta un factor de correlación r de 0,99996, un porcentaje de linealidad de 99,46%, además de un límite de detección (LD) de 0,013 ppm y un límite de cuantificación (LQ) de 0,045 ppm., un C.V% de 0,6 para la precisión intermedia y repetibilidad, y un porcentaje de recuperación de 90,8%.

Las muestras analizadas fueron papas fritas caseras, papas fritas provenientes de cinco restaurantes de comida rápida de distintos centros comerciales de Arequipa y papas “chips” procedentes de dos mercados de Arequipa y dos marcas reconocidas. La extracción de acrilamida se evaluó en dos tipos de solventes (agua y metanol), encontrándose óptima en solvente metanol (Met2), para las papas fritas. Sin embargo, la extracción de papas “chips” únicamente pudo ser extraída con agua (Met1).

En los resultados se obtuvo una mayor concentración de acrilamida en las papas fritas del Restaurante A ($\sim 1653 \mu\text{g.kg}^{-1}$) y una menor concentración para las del Restaurante B ($\sim 394 \mu\text{g.kg}^{-1}$), lo que demuestra que existen valores por encima de los niveles recomendados para papas fritas procesadas en el Reglamento 2158/2017 de la Comisión Europea ($500 \mu\text{g.kg}^{-1}$). En cuanto a las muestras de papas “chips” únicamente la Marca 2 reportó una concentración de $\sim 156 \mu\text{g.kg}^{-1}$ la cual está por debajo del nivel recomendado para papas fritas “chips” ($750 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Finalmente, en las papas fritas caseras según las condiciones de extracción y medidas cromatográficas no se logró demostrar la presencia de acrilamida en estas.

La importancia de este trabajo además de aportar un método rápido y sencillo para la cuantificación de acrilamida en muestras de papas fritas, es también advertir a la población de nuestro país sobre la presencia de esta sustancia que podría ser perjudicial para la salud, ya que como se observa en este estudio se logró demostrar que en la mayoría de papas fritas de restaurantes de comida rápida existe un contenido considerable de acrilamida; por ello se sugiere la determinación de acrilamida como control de calidad a papas fritas comercializadas en nuestro país.

Palabras Clave: Acrilamida, validación, Cromatografía Líquida de Alta Resolución, papas fritas

ABSTRACT

Acrylamide is a chemical pollutant that is generated as a byproduct of the cooking process of certain foods when the temperature exceeds 120 ° C, as for example in processed potatoes. It is highly toxic to humans due to its carcinogenic, mutagenic and neurotoxic characteristics. For identification, a method was developed using a Merck Hitachi high resolution liquid chromatography equipment with the following characteristics: a Merck Lichrocart R18 column, at a wavelength of 200 nm, with a mobile phase of acetonitrile: acidified water at pH 2,5 (2:98). Under these conditions it was found that the acrylamide has a retention time of 2.8 minutes.

For validation of the method we worked with a calibration graph in a range of 0.05 to 2.0 ppm with acrylamide solutions, this presents a correlation factor r of 0.99996, a linearity percentage of 99.46%, in addition to a detection limit (LD) of 0.013 ppm and a limit of quantification (LQ) of 0.045 ppm., a CV% of 0.6 for intermediate accuracy and repeatability, and a recovery percentage of 90.8%.

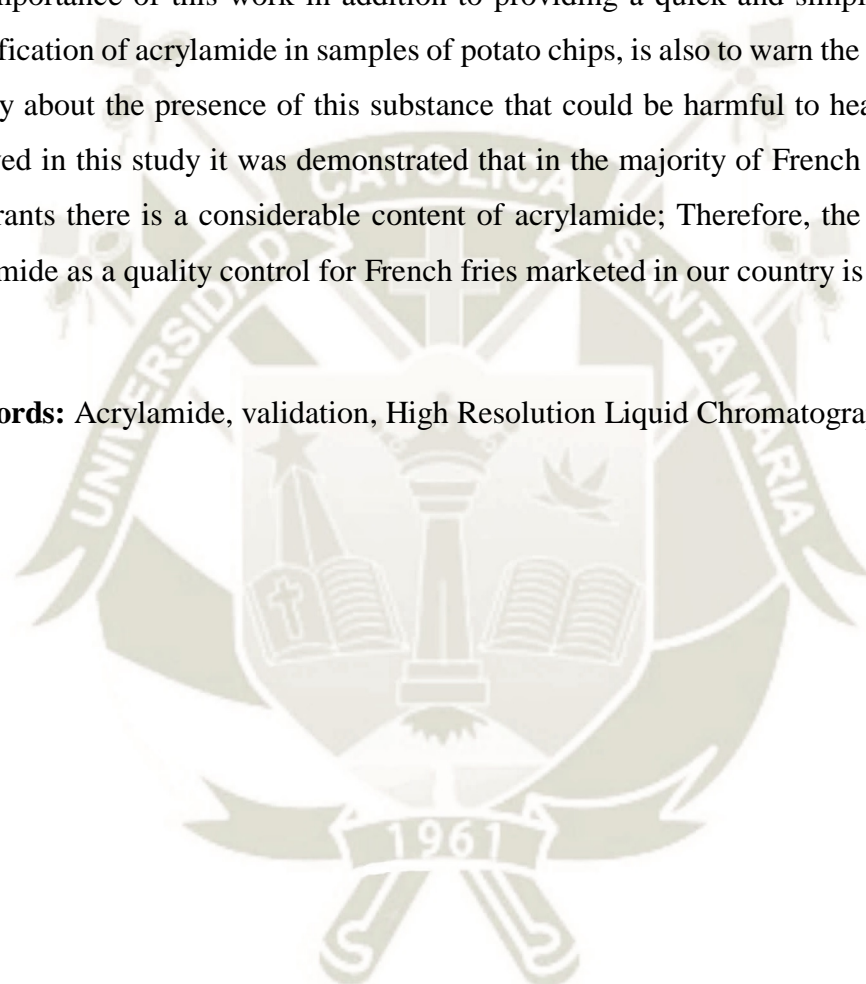
The samples analyzed were homemade potato chips, potato chips from five fast food restaurants in different shopping malls in Arequipa and potatoes "chips" from two Arequipa markets and two recognized brands. The extraction of acrylamide was evaluated in two types of solvents (water and methanol), being optimal in methanol solvent (Met2), for French fries. However, the extraction of potatoes "chips" could only be extracted with water (Met1).

In the results a higher concentration of acrylamide was obtained in the fries of Restaurant A (~ 1653 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$) and a lower concentration for those in Restaurant B (~ 394 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), which

demonstrates that there are values above the recommended levels for French fries processed in Regulation 2158/2017 of the European Commission ($500 \mu\text{g.kg}^{-1}$). As for samples of chips "chips" only Brand 2 reported a concentration of $\sim 156 \mu\text{g.kg}^{-1}$ which is below the recommended level for chips ($750 \mu\text{g.kg}^{-1}$). Finally, in the homemade potato chips according to the conditions of extraction and chromatographic measurements it was not possible to demonstrate the presence of acrylamide in these.

The importance of this work in addition to providing a quick and simple method for the quantification of acrylamide in samples of potato chips, is also to warn the population of our country about the presence of this substance that could be harmful to health, since as it is observed in this study it was demonstrated that in the majority of French fries of fast food restaurants there is a considerable content of acrylamide; Therefore, the determination of acrylamide as a quality control for French fries marketed in our country is suggested.

Keywords: Acrylamide, validation, High Resolution Liquid Chromatography, potato chips



INTRODUCCIÓN

Actualmente existen numerosos métodos de preservación de los alimentos y de mejoramiento de su sabor que han permitido prolongar su vida útil y aumentar la variedad de productos disponibles; sin embargo, estos hábitos alimenticios han dejado de cubrir la calidad y seguridad alimentaria y pasar a cubrir solamente necesidades de supervivencia, sin importar la salud y bienestar de la comunidad (1).

El tratamiento térmico en alimentos es usado para su procesamiento, cocción y conservación, este tratamiento conduce a una serie de transformaciones en el alimento formando nuevos compuestos que inciden, en la aceptabilidad del producto por el consumidor. Sin embargo, en algunos casos, el tratamiento a altas temperaturas, en combinación con otros factores, puede dar lugar a la formación de ciertos compuestos tóxicos que afectan a la seguridad de los alimentos. Estas sustancias químicas se denominan “contaminantes químicos de procesado”, que son compuestos que no estaban presentes en el alimento fresco y que su origen está relacionado con el proceso tecnológico y/o culinario aplicado (2). Uno de los primeros contaminantes de procesado encontrados fue la acrilamida, producido por la aplicación de métodos tradicionales de cocción (2).

La acrilamida es un contaminante del proceso químico que se encuentra en los alimentos como un subproducto del proceso de cocción, cuando la temperatura supera los 120 °C, como al hornear, asar, freír y tostar (3). El aminoácido asparagina (que se encuentra en ciertos alimentos) reacciona con los azúcares reductores a través de la reacción de Maillard produciendo acrilamida (3).

La acrilamida (AA) es altamente tóxica para el cuerpo humano debido a sus características carcinogénicas, mutagénicas y neurotóxicas (4). Puede dañar el ADN y puede metabolizarse a formas más genotóxicas y mutagénicas (como la glicidamida), (5). *In vivo*, tanto la acrilamida como su metabolito pueden unirse a la hemoglobina, las albúminas séricas, el ADN y las enzimas (6). Debido a la presencia de AA en los alimentos, se han desarrollado numerosas investigaciones relacionadas con su determinación.

Según la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (7) (IARC 1994), la Agencia de Protección Ambiental (8), (US, EPA 2001) y el Sistema nacional de notificación y evaluación de sustancias químicas industriales (9) (NICNAS 2002), la acrilamida está clasificada como un compuesto que probablemente sea cancerígeno para los seres humanos. La base de datos de carcinogenicidad incluye un aumento en la incidencia de tumores benignos y/o malignos en múltiples sitios en ambos sexos de ratas y efectos carcinogénicos

en bioensayos en ratones durante un año por varias rutas de exposición (US EPA 2001), (8). La acrilamida es genotóxica *in vivo*, evidenciando un valor positivo en células somáticas en una amplia gama de ensayos en roedores e induce daño genético transmisible en células germinales masculinas de ratones (10,11), informaron que la administración sistémica de acrilamida a ratas Wistar causa efectos perjudiciales sobre la función renal y hepática. De acuerdo a una clasificación en la Unión Europea (Reglamento CE 1272/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, 2013), la acrilamida es considerada como carcinógena (categoría 1A), mutagénica (categoría 1B) y tóxica para la reproducción (categoría 2, fertilidad), (12). El Panel CONTAM evaluó 43 419 resultados analíticos de productos alimenticios y encontraron AA, en los niveles más altos, en sustitutos de café, y en papas fritas (13). La exposición media de AA en la dieta en todas las encuestas y grupos de edad se estimaron en 0,4 a 1,9 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal, por día. Las preferencias en la cocina casera pueden tener un impacto sustancial en la exposición a AA en la dieta humana (13). Tras la ingesta oral, la AA se absorbe desde el tracto gastrointestinal y se distribuye a todos los órganos. La AA se metaboliza ampliamente, principalmente por conjugación con glutatión, pero también por epoxidación a glicidamida (GA) (13). Se considera que la formación de GA representa la ruta subyacente a la genotoxicidad y carcinogenicidad de AA (13). Por lo tanto, la acrilamida se trata de acuerdo con el principio "ALARA" (tan bajo, como sea razonablemente alcanzable, por sus siglas en inglés: As Low As Reasonably Achievable). Debido a esto, las investigaciones en tecnologías de procesamiento buscan obtener alimentos de alta calidad con la menor cantidad de acrilamida (14).

En los últimos años los restaurantes de comida rápida en Arequipa se han multiplicado y por lo tanto el consumo de papas fritas de estos, además de ello siempre ha existido una gran demanda de papas fritas de snacks también conocidas como "chips", que son comercializados en la mayoría de tiendas. Conociendo esta realidad y sabiendo que estos productos alimenticios tienen alta tendencia a la formación de acrilamida en su proceso lo cual podría llegar a ser perjudicial para la salud pública al tener características carcinogénicas, mutagénicas y neurotóxicas; es que se optó por realizar el presente estudio ya que además actualmente no existe alguna norma técnica en nuestro país que asegure la calidad de estos productos.

Como se sabe la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) junto con la espectrometría de masas (MS) son los métodos preferidos en la separación y cuantificación de residuos de acrilamida en los alimentos, debido a su sensibilidad, selectividad y

versatilidad (5) ; de tal forma que para la cuantificación de dicha sustancia en este estudio se decidió utilizar un cromatógrafo líquido de alta resolución , buscando obtener un método rápido y sencillo que permita alcanzar resultados confiables y fidedignos de la concentración de acrilamida en diversos tipos de papas fritas ,como se realizaron en otros países , y a su vez dejar un precedente para el análisis de esta sustancia en otros alimentos procesados ,y por qué no también poder realizar futuros estudios de mitigación .



HIPÓTESIS

Dado que ciertos carbohidratos procesados a elevadas temperaturas pueden generar una sustancia toxica llamada acrilamida; es probable que las papas fritas consumidas por la población de Arequipa contengan dicha sustancia que puede ser identificada y por consiguiente cuantificada mediante una técnica analítica de cromatografía líquida de alta resolución.



OBJETIVOS

Objetivo general

- Desarrollar y validar una técnica analítica mediante cromatografía líquida de alta resolución aplicable a matrices de papas fritas, para la determinar y cuantificar acrilamida.

Objetivos específicos

1. Desarrollar un método analítico para obtener las condiciones cromatográficas adecuadas de la cuantificación de acrilamida.
2. Determinar los parámetros de linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud para la validación del método.
3. Cuantificar acrilamida en papas fritas de restaurantes de comida rápida, “chips”, y caseras, para contrastar los valores hallados con los límites permisibles.
4. Demostrar la importancia de cubrir la calidad y seguridad alimentaria en productos de papas fritas.



CAPÍTULO I

MARCO TEÓRICO

1. Marco Teórico

1.1. Acrilamida

1.1.1. Generalidades

La acrilamida ($\text{CH}_2 = \text{CHCONH}_2$, 2-propenamida, Chemical Abstracts Service No. 79-06-01) es un monómero de vinilo soluble en agua acetona y etanol que se forma en muchos alimentos comunes durante la cocción. Es un sólido blanco inodoro con peso molecular de 71,08 g/mol. Sus sinónimos son amida acrílica y etilencarboxamida (13). La acrilamida es también un componente del humo del tabaco y es fácilmente polimerizable (15).

Asimismo, (Figura 1.1) es un compuesto carbonilo α , β -insaturado con reactividad electrofílica. Por lo tanto, puede reaccionar con grupos nucleofílicos en moléculas biológicas, contribuyendo a la generación de sus efectos tóxicos (13).

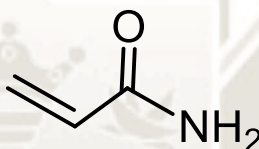


Figura 1.1: Estructura química de la acrilamida (AA) (13).

1.1.2. Propiedades físicas

La acrilamida es un polvo cristalino incoloro e inodoro con un punto de fusión de 84,5 °C y un alto punto de ebullición de 136 °C (a 3,3 kPa), (15). El producto químico está disponible comercialmente como un sólido, una solución acuosa al 30% o al 50%; esta última requiere la adición de estabilizadores para evitar su polimerización (9).

El 90% de acrilamida se utiliza en la fabricación de diversos polímeros, como la poli(acrilamida). Estos polímeros se utilizan como agentes aglutinantes, espesantes o floculantes en aplicaciones como el tratamiento de aguas residuales, el procesamiento de pulpa de papel y el procesamiento de minerales (10). Los polímeros de acrilamida también se utilizan en cosméticos, agentes de acondicionamiento del suelo, plásticos y materiales de envasado de alimentos (10).

1.1.3. Propiedades químicas

La acrilamida experimenta reacciones típicas de productos químicos que contienen un doble enlace vinílico reactivo y un grupo amida. La conjugación limitada que involucra electrones π significa que la AA tiene un fuerte cromóforo para la detección UV y no tiene fluorescencia (16). El grupo carboxamida que retira electrones activa el doble enlace, que reacciona con los nucleófilos mediante mecanismos de reacción de adición de Michael o Diel-Alder. Muchas de estas reacciones son reversibles, y la velocidad de reacción depende de la fuerza del nucleófilo. Estas reacciones son de importancia en los sistemas biológicos (16).

A temperaturas superiores a su punto de fusión, la acrilamida se polimeriza en una reacción rápida y altamente exotérmica. La exposición a la luz ultravioleta también resulta en una polimerización fácil (9).

Los polímeros son hidrófilos con pesos moleculares de entre 1 a 30 millones y cadenas de entre 14000 y 420000 unidades de monómero. Cuando reaccionan con compuestos de amonio cuaternario insaturados, se producen copolímeros catiónicos, mientras que la reacción con ácidos carboxílicos o sulfónicos produce copolímeros aniónicos (9).

1.1.4. Propiedades analíticas

- Muy buena solubilidad, alcoholes, acetona y acetonitrilo.
- Ligeramente soluble en acetato de etilo, diclorometano y dietileter.
- Insoluble en hexano y otros alcanos y alquenos.
- Baja, pero significativa volatilidad.
- No hay absorción UV significativa por encima de 220 nm.
- El grupo amida es protonado por ácidos medios y fuertes (17).

1.1.5. Toxicología

Se han realizado estudios toxicológicos con AA en ratas, ratones, monos, gatos, conejos, cerdos y perros, utilizando varios protocolos de dosificación y rutas de exposición. Se informó que los valores orales de LD50 para AA eran 150 mg.kg^{-1} para ratas, $107 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ b.w.}$ para ratones, y $150\text{--}180 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ b.w.}$ para conejos y cerdos. Los efectos adversos informados en estudios de toxicidad con dosis repetidas de AA en ratas, ratones, monos, gatos y perros consistieron en la pérdida

de peso corporal y los efectos sobre el sistema nervioso reflejados por la parálisis de las extremidades posteriores. En ratones, los efectos informados además de la neurotoxicidad consistieron en efectos en los testículos, incluida la degeneración de los epitelios en espermátidos y espermatoцитos, la reducción de los espermatozoides y la presencia de células gigantes multinucleadas, así como hiperplasia forestal, proliferación de células hematopoyéticas de inflamación del bazo y glándula prepucial, hiperplasia y catarata del epitelio alveolar pulmonar y para ratones hembras quistes ováricos.

En ratas, los efectos informados además de la neurotoxicidad, incluyeron atrofia del músculo esquelético, atrofia testicular, vejigas urinarias distendidas, aumento de la prevalencia de ectasia del conducto en glándulas prepuciales, proliferación de células hematopoyéticas en el bazo, hiperplasia de la médula ósea, atrofia ovárica, degeneración de la retina, células germinales exfoliadas, epidídimo, degeneración de hepatocitos y necrosis hepática, hiperplasia de la médula ósea, infiltración celular del ganglio linfático mesentérico e hiperplasia de la glándula pituitaria.

1.1.5.1. Genotoxicidad y carcinogenicidad

La ingestión oral de acrilamida en humanos, ocasiona que se absorba y se elimine rápidamente en la orina, con una vida media de 3,1 a 3,5 h (18). Las vías de conjugación con glutatión desempeñan un papel importante para ayudar al cuerpo a excretar acrilamida como metabolitos urinarios (Figura 1.2), (18). La acrilamida también se metaboliza *in vivo* en glicidamida, un epóxido químicamente reactivo que podría explicar la mayor parte de los efectos genotóxicos y carcinógenos observados de la acrilamida (19).

Algunos ejemplos de resultados genotóxicos de la acrilamida son la inducción de mutaciones genéticas y anomalías cromosómicas en células cultivadas *in vitro*, y la mutagenicidad *in vivo* en el estudio Big Blue Mouse con glicidamida y acrilamida. Tanto la acrilamida como la glicidamida reaccionan con compuestos nucleófilos a través de la adición de Michael para formar aductos en el ADN (glicidamida) y proteínas (acrilamida y glicidamida).

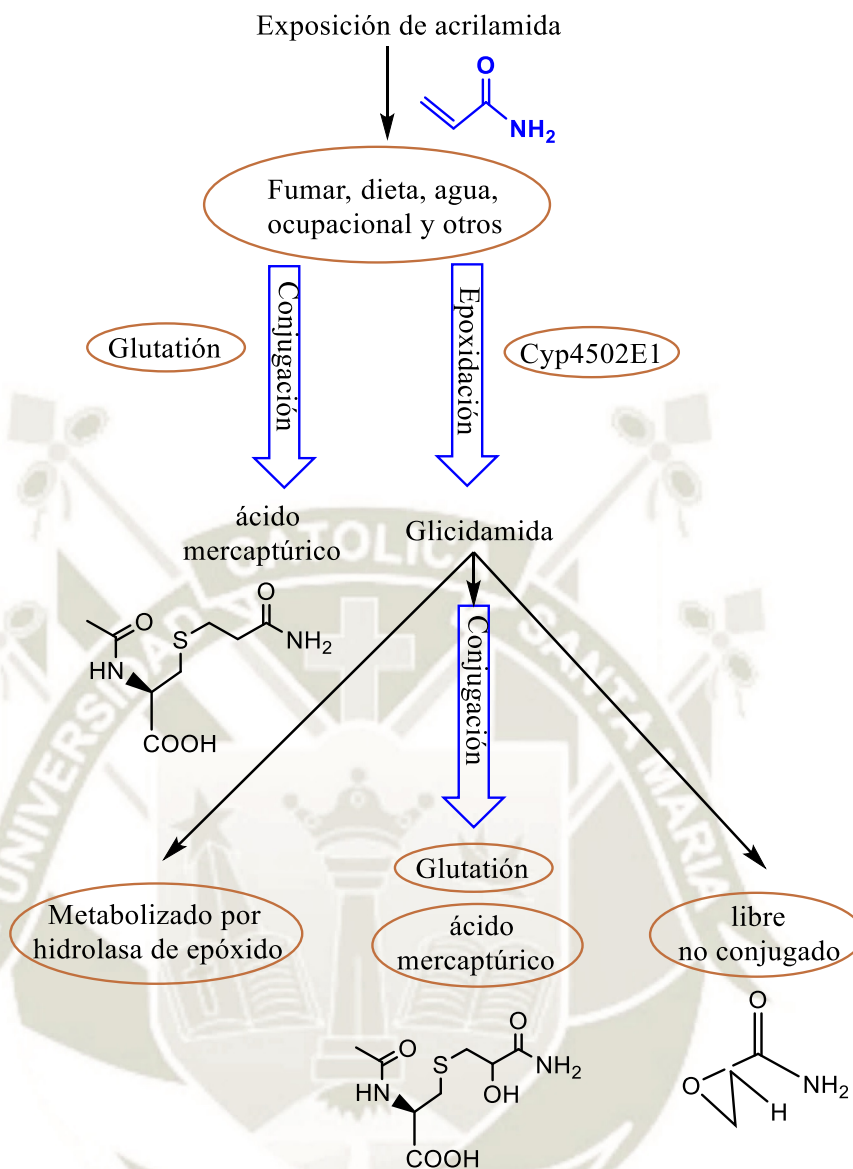


Figura 1.2: Metabolismo de la acrilamida (18).

Los aductos de la acrilamida y la glicidamida en la valina N-terminal de la hemoglobina no son t3xicos, pero son 3tiles como marcadores de la exposici3n *in vivo* a la acrilamida. Se ha demostrado que se producen tres aductos en el ADN a partir de la exposici3n *in vivo* a la glicidamida, y se han encontrado otras bases aductadas en reacciones *in vitro* (19).

1.1.5.2. Neurotoxicidad

La neurotoxicidad (debida a la exposici3n laboral y a otros tipos de exposici3n no alimentaria y de alto nivel) es el 3nico efecto negativo reconocido de la exposici3n humana a la acrilamida. Tanto la Organizaci3n Mundial de la Salud

(OMS) como el Comité Científico de Alimentación de la Unión Europea (SCF) concluyeron que no cabía esperar efectos neurotóxicos de los niveles de acrilamida encontrados en los alimentos en el caso de la neurotoxicidad y se cree que los efectos reproductivos ocurren con dosis mucho más elevadas de las que aparecen en los alimentos (19).

1.2. Formación de acrilamida en alimentos

La observación de niveles relativamente altos en ciertos alimentos ricos en carbohidratos, y niveles más bajos en alimentos ricos en proteínas, puede reflejar la relativa facilidad de formación en los primeros, o puede deberse a la volatilización o reacciones adicionales entre la acrilamida y los componentes de los alimentos en el último caso. Se espera que la acrilamida pueda reaccionar con cualquier componente alimenticio mayor o menor que contenga grupos tiol, amino y, en un grado mucho menor, hidroxilo (20).

Se ha determinado una serie de mecanismos teóricos de formación de acrilamida, comprendida la vía exclusiva de los aminoácidos, de intermedios de acroleína, intermedios de ácido acrílico y precursores de la reacción de Maillard. La reacción de Maillard es la ruta más probable de formación de la acrilamida en productos procesados a altas temperaturas, generalmente por encima de 120 °C, como lo demostraron en otros estudios (14,16), poco después de los primeros informes de la aparición de AA en ciertos productos alimenticios (13). La baja humedad, la alta temperatura y el pH alcalino tienen una influencia positiva en esta reacción (15).

Por tanto, la acrilamida es un intermedio de una secuencia de reacciones químicas de pardeamiento no enzimático entre el aminoácido asparagina y los azúcares reductores, principalmente glucosa y fructosa (6) (Figura 1.3). En el primer paso, la asparagina reacciona con un azúcar reductor, formando una base de Schiff. A partir de este compuesto en una reacción compleja, incluida la descarboxilación y una reacción de eliminación en varias etapas, se forma la acrilamida (17).

En sistemas modelo se demostró que, dependiendo del pH, la temperatura y el nivel de humedad, la base de Schiff es el primer producto de interacción entre los azúcares reductores y los aminoácidos, los cuales pueden sufrir una reorganización de Amadori, reacción de Strecker o ciclizaciones para generar compuestos heterocíclicos que contienen nitrógeno (15) (Figura 1.4). Sin embargo, antes de estas

transformaciones, la base de Schiff puede sufrir reacciones de isomerización, lo que aumenta aún más los productos de reacción de Maillard (15).

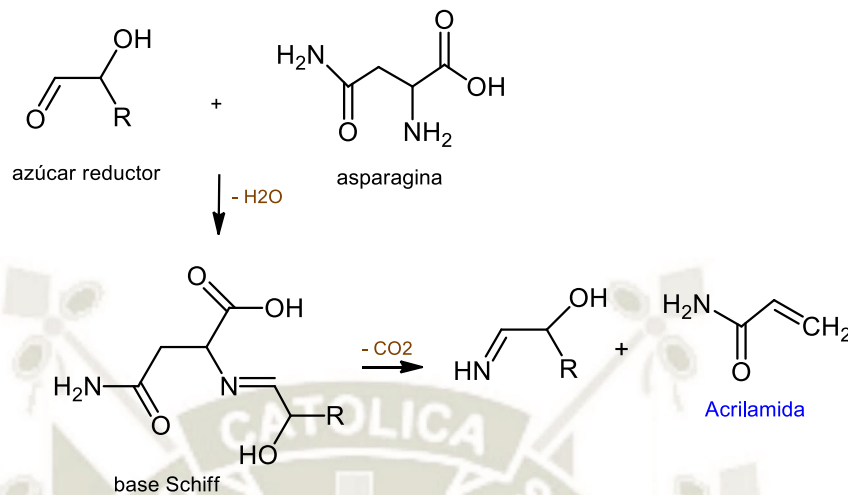


Figura 1.3: Mecanismo simplificado de formación de acrilamida (17).

Se han hipotizado también, otras trayectorias de formación de acrilamida en los alimentos (13,19): a) al calentar la asparagina o la glutamina a 180 °C se forma acrilamida por degradación térmica, aunque sea en niveles mínimos, b) el amoníaco producido por aminoácidos alfa mediante la degradación de Strecker reacciona con ácido acrílico, formado a partir de acroleína en la degradación de lípidos o de ácido aspártico por una vía análoga, c) un radical de ácido acrílico por aplicación de calor a alta temperatura de la acroleína reacciona con un radical amino formado por calentamiento de un aminoácido a elevada temperatura, y d) la 3-aminopropionamida formada por decarboxilación enzimática de la asparagina (por ejemplo en las papas), se degrada y convierte en acrilamida durante la aplicación de calor.

Respecto al efecto de los azúcares reductores, se han reportado mayores niveles de formación de AA en aquellos alimentos que contienen altas concentraciones de fructosa comparados con los que presentan mayor concentración de glucosa; y mayor formación de AA si hay presencia de aldosas que de cetosas (22).

Los alimentos ricos en estos dos precursores se derivan en gran parte de fuentes vegetales, como las papas y los granos (10). La formación de acrilamida es particularmente probable en alimentos ricos en carbohidratos, horneados o fritos.

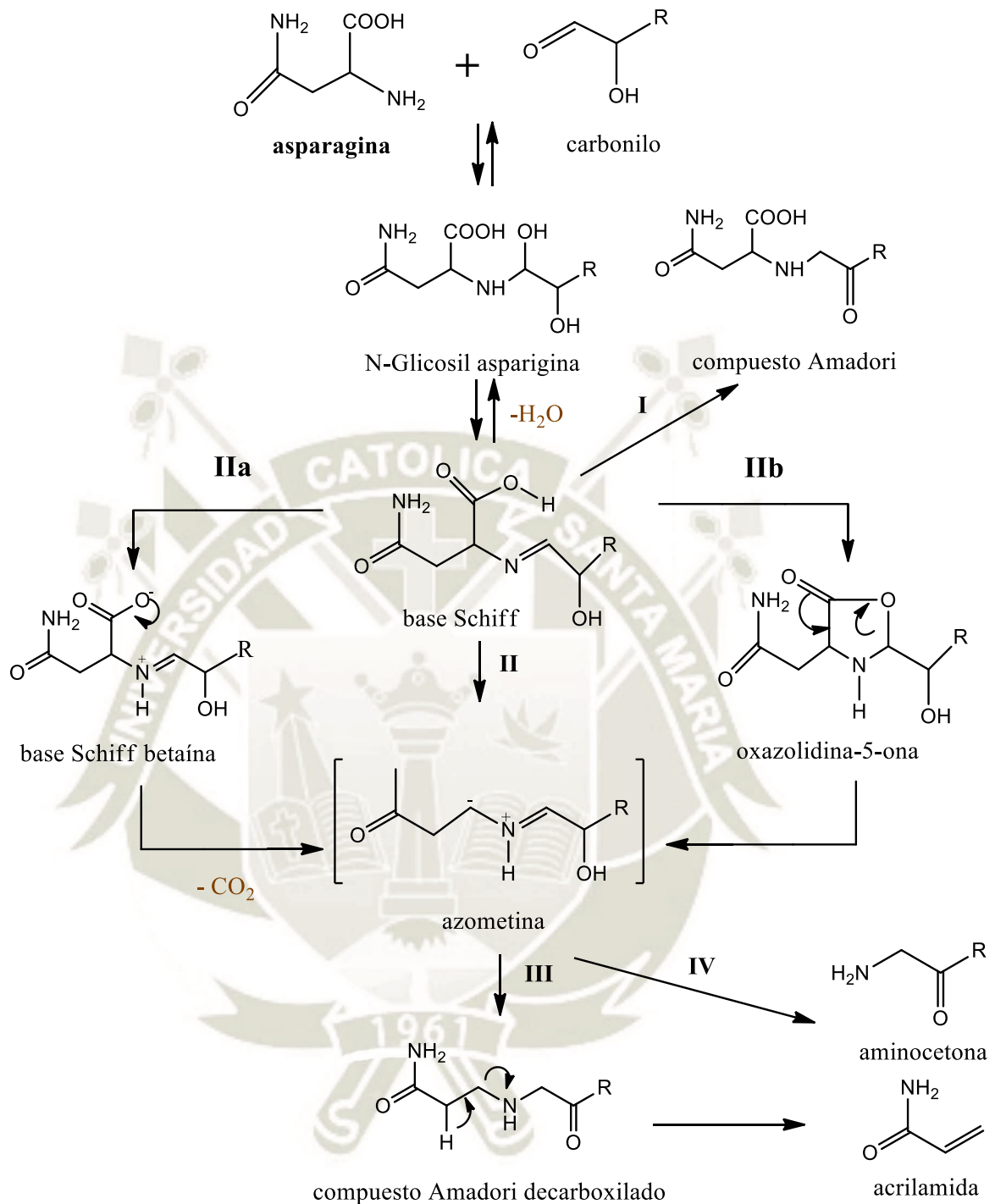


Figura 1.4: Formación de acrilamida a partir de asparagina en presencia de α -hidroxicarbonilo (21).

Entre estos alimentos se encuentran las galletas, pan, tostadas, café y, particularmente, en papas fritas (14).

En un estudio (23), se demostró que cocinar papas húmedas a $120\text{ }^\circ\text{C}$ bajo presión formó $< 20\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de AA, mientras que se formó aproximadamente $10\ 000\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$

cuando se calentó polvo de papa seco, lo que indica la importancia de la evaporación del agua antes de la formación de AA.

1.3. Variables que influyen la presencia de acrilamida en papas fritas

Las papas fritas son propensas a formar acrilamida debido al alto contenido de precursores en el tubérculo y la intensidad del tratamiento térmico aplicado. Se realizaron varios estudios, investigando los factores que afectan la formación de acrilamida durante la fritura y revelaron que debe evitarse un almacenamiento a baja temperatura de las papas (24).

La cantidad final de acrilamida que se puede formar al freír papas puede estar influenciada por distintas otras variables, entre ellas la composición de la papa. La papa proporciona precursores de la reacción de Maillard (azúcares reductores y asparagina) cuya cantidad depende de la variedad de papa, el período de cosecha, las características del suelo y las condiciones de almacenamiento posteriores a la cosecha como la temperatura y el tiempo. Además, el bajo contenido de humedad de la papa también favorece la generación de acrilamida. Las variables del proceso de fritura que interfieren en la formación de acrilamida dependen de la temperatura y el tiempo de cocción, el tamaño de la superficie de contacto con el fluido de calentamiento y la relación entre la papa y el aceite (14).

La fritura genera una estructura compleja formada por una capa externa deshidratada, porosa y crujiente donde se encuentra el aceite y una región húmeda libre de aceite (25). La acrilamida se forma en la capa superficial de las papas: por lo tanto, su tamaño y forma pueden ejercer una influencia sobre la cantidad final de acrilamida. Por lo tanto, cuanto más delgadas y más pequeñas sean las porciones cortadas, mayor será la concentración de acrilamida que se forma en ellas (26). La formación de acrilamida aumenta con la temperatura de cocción y muy marcadamente con el tiempo de cocción. La temperatura óptima para la formación es de alrededor de 180 ° C, aunque a partir de 120 °C, la formación de acrilamida ya está claramente favorecida (14). A temperaturas superiores a 180-200 °C, un aumento drástico de los niveles de acrilamida es seguido por un rápido descenso en esas reacciones debido a la degradación de las mismas.

Otros aspectos a considerar son la superficie de contacto y el volumen de muestras de papa durante la fritura: una amplia superficie de contacto conduce a niveles

significativamente más altos de acrilamida, ya que más precursores están expuestos a temperaturas elevadas. Por otro lado, cuanto mayor sea la cantidad de muestra introducida en el aceite, mayor será la disminución de la temperatura y mayor será el tiempo de fritura requerido para recuperar la temperatura inicial. Por lo tanto, la formación de acrilamida disminuye, pero la calidad de la fritura se degrada. En general, la relación entre la muestra y la cantidad de aceite debe ajustarse para evitar valores inferiores a 140 ° C, obteniendo así un producto de textura y sabor mejorados, pero con una baja concentración de acrilamida (27).

1.4. Métodos de análisis

1.4.1. Requerimientos legales

Según las recomendaciones de la UE, los métodos de análisis deben caracterizarse al menos por los siguientes criterios: precisión, aplicabilidad (matriz y rango de concentración), límite de detección (LOD), límite de cuantificación (LOQ), precisión, repetibilidad, reproducibilidad, recuperación, sensibilidad, linealidad e incertidumbre de la medida (13). Los valores de repetibilidad y reproducibilidad se expresan en una forma reconocida internacionalmente (por ejemplo, los intervalos de confianza al 95% definido por la ISO 5725: 1994 o IUPAC). Para asegurar la comparabilidad de los resultados analíticos, se deben elegir métodos que puedan alcanzar un LOQ de hasta 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ (0,05 ppm) para productos de papa (13).

1.4.2. Técnicas de análisis

Las técnicas de cromatografía líquida acoplada con masas (LC/MS) y cromatografía de gases acoplada con espectrometría de masas en tándem (GC-MS/MS) son las más utilizadas para la cuantificación de acrilamida en alimentos tratados térmicamente. Los métodos basados en cromatografía líquida (LC) permiten la determinación de la acrilamida como tal, mientras que los métodos basados en GC generalmente incluyen la derivatización de la acrilamida antes de su análisis (15) para disminuir la polaridad de la AA y obtener iones característicos con mayor masa molecular (4).

1.4.3. Validación de métodos

En Europa, se llevó a cabo un estudio interlaboratorio para validar un procedimiento analítico con GC-MS y un LC-MS/MS para determinar acrilamida

en productos de panadería (panes crujientes, galletas) y productos de papa (chips), en un rango de concentración de aproximadamente 20 $\mu\text{g.kg}$ hasta 9000 $\mu\text{g.kg}$. El método LC-MS/ MS mostró un rendimiento superior en comparación con el método GC-MS (28).

En China, en el 2005, se publicó la Norma Nacional GB/T 5009.204-2005, un método GC-MS para la determinación de acrilamida en alimentos (29). En el 2010 se publicó la Norma GB 5009.204-2010 que incluye un procedimiento analítico con LC-MS/MS (15).

1.4.4. Tratamiento de la muestra

El bajo peso molecular, la alta reactividad y la falta de cromóforo son desafíos en el análisis de AA a bajas concentraciones en productos alimenticios. La elección de las condiciones óptimas de extracción y los pasos de limpieza posteriores dependen de la matriz de alimentos de interés (13). Los disolventes más usados son el agua y las mezclas de agua y disolventes orgánicos, como el n-propanol o la 2-butanona. Para mejorar la extracción, también se propuso aumentar la temperatura del solvente de extracción o tratar la muestra en un baño de ultrasonidos durante varios minutos. Por ejemplo, la extracción asistida por ultrasonidos basada en líquidos iónicos (ILUAE) se desarrolló para determinar el contenido de AA en muestras de alimentos (30). Para la limpieza de los extractos, se informaron varias combinaciones de materiales de extracción en fase sólida (SPE). Estos incluyen, entre otros, materiales de fase inversa, intercambio aniónico, anión de modo mixto e intercambio catiónico de modo mixto, y materiales de carbono grafitizado (13).

1.4.4.1. Extracción

Las condiciones de extracción parecen ser el parámetro más crítico en la preparación de muestras para la detección de AA en una variedad de alimentos. Muchos factores pueden afectar el rendimiento de extracción de AA de las matrices de alimentos, como el tamaño de partícula de la muestra, el desengrasado, el disolvente de extracción, la relación la muestra- solvente, aplicación de fuerzas mecánicas, temperatura de extracción y tiempo de extracción (16).

El agua se usa más comúnmente para extraer acrilamida de los alimentos (15), debido a que la AA es muy hidrofílica y altamente soluble en agua (16), sin embargo es posible el uso de otros solventes polares (15). Se utiliza el agua a temperatura ambiente para extraer AA, esto minimiza la disolución de compuestos hidrófobos en los productos alimenticios, y también la coextracción de otros compuestos no deseados en la matriz (sales, proteínas, carbohidratos), que podrían interferir con la detección y degenerar el sistema cromatográfico, si no se eliminan por limpieza (31,32).

La extracción incompleta es una posible causa de resultados erróneos en el análisis de acrilamida. Esto puede ocurrir cuando el alimento no está suficientemente macerado o cuando se usa un tiempo de extracción corto o una temperatura de extracción baja (15, 16) La formación de acrilamida durante el procedimiento de extracción es otra posible fuente de error, como por ejemplo un valor alto de pH liberaría acrilamida "oculta" de la matriz alimentaria debido probablemente a la formación de acrilamida a partir de los intermedios de reacción de Maillard (33). Otras interferencias incluyen la contaminación de la acrilamida del material de laboratorio, como los filtros de jeringa (15).

Existen diferentes soportes mecánicos para la extracción de AA de muestras de alimentos reportados por los investigadores. Por ejemplo, un baño de ultrasonidos o un agitador, un *shaker* horizontal, un *shaker* rotatorio, un homogeneizador Ultra Turrax, un oscilador o vibrador de vórtice y un baño de agua con termostato (16).

Se investigó el uso de metanol como medio de extracción en lugar de agua. La adición de agua a una muestra de papa homogeneizada resultó en una suspensión espesa, lo que dificulta la extracción (34). El metanol es muy compatible con las matrices de alimentos que contienen altas cantidades de grasa como las papas fritas. Dado que el metanol no extrae almidón y algunos otros polisacáridos, produce un extracto mucho más claro que el que contiene agua incluso sin centrifugación. Además, puede evaporarse fácilmente bajo una suave corriente de nitrógeno para mejorar el límite de cuantificación (LOQ) por concentración(16).

Existen informes acerca del uso de acetona en la extracción de AA, se debe usar una cantidad suficiente de agua para extraer AA completamente de las muestras (35). Algunos autores informaron que se puede lograr una alta recuperación de la extracción de AA utilizando soluciones acuosas de cloruro de sodio concentradas como solvente de extracción para inhibir la emulsificación durante el pretratamiento de la muestra y desnaturalización parcial de proteínas (16).

Las muestras de alimentos a base de papa y cereales procesados suelen estar compuestas de altas cantidades de coloides (almidón y proteínas) y grasa, que se deben separar después de la extracción con agua. El contenido de grasa puede ocasionar picos que se superponen con el analito o bloquear la columna analítica (16). Se utilizan disolventes como hexano, diclorometano, éter de petróleo y ciclohexano para la extracción de grasa. En dos estudios realizados en China (31,36), encontraron que cuando la temperatura era de 0 °C o 5 °C y la velocidad de centrifugación era de 1300 × g, la capa de aceite se solidificaba y podía eliminarse simplemente por filtración, lo que reducía la interferencia. (37, 38), concluyeron que la eliminación de las grasas con n-hexano de papas fritas fue de aproximadamente 40% en peso total, mejorando el rendimiento de extracción de AA.

1.4.5. Desarrollos en el análisis instrumental.

1.4.5.1. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Se han desarrollado técnicas cromatográficas con técnicas de detección convencionales, generalmente más baratas y más fáciles de operar, para la determinación de acrilamida en algunos alimentos. El análisis de extractos purificados de AA se puede hacer directamente utilizando métodos de cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), (16). Para el análisis de cromatografía líquida (LC), se aplica un detector ultravioleta (UV), (31) o de matriz de diodos (39) a longitudes de onda baja de 210 y 225 nm (rango de moléculas insaturadas), (16), dado que son adecuados para productos alimenticios que contienen altos niveles de AA, debido a que la sensibilidad no es un problema importante (40). La cromatografía iónica con detección UV a 202 nm se utilizó con éxito para la determinación de acrilamida, con una etapa previa de limpieza completa. Los resultados obtenidos fueron

similares a los obtenidos con la detección de MS incluso a un nivel de $0,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ (41). Por lo tanto, la detección de UV se puede usar para la determinación de acrilamida en productos alimenticios como café o pasteles en el rango de $4,0 \times 10^{-2}$ a $5,0 \times 10^{-2} \text{ mg.kg}^{-1}$ para café y pastelería y para papas fritas hasta 2 y 3 mg.kg^{-1} . Estos límites de detección pueden reducirse aún más mediante una limpieza adecuada (41).

1.4.5.2. Cromatografía de gases acoplada con espectrómetro de masas (GC-MS)

Las técnicas basados en GC generalmente incluyen la derivación de acrilamida, que se realiza con ácido bromhídrico, solución saturada de bromo (Br_2) (15) o un método utilizando bromato de potasio en medio ácido (42). El uso de estos reactivos es más conveniente y seguro, y la reacción se realiza en aproximadamente 30 minutos a temperatura de almacenamiento en frío y resultados con buena reproducibilidad. El bromo se agrega a la acrilamida en una reacción rápida y cuantitativa como se muestra en la Figura 1.5. La dibromopropionilamida resultante es más volátil y menos polar que la acrilamida (17).

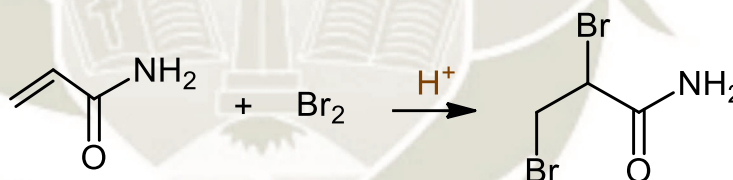


Figura 1.5: Adición de bromo a acrilamida (17).

La GC-MS con bromación se usa en muchos laboratorios, porque el equipo GC-MS es más barato y está disponible en más laboratorios que la LC-MS-MS (17).

La GC-MS/MS también puede realizar un análisis confiable de la acrilamida no derivada, pero se debe tener mucho cuidado de eliminar la asparagina y los azúcares del extracto para evitar la formación de acrilamida en el puerto de inyección caliente del GC (43).

1.4.5.3. Cromatografía líquida acoplada con espectrómetro de masas en tándem (LC-MS/MS)

La LC-MS simple no tiene éxito, porque los iones de los fragmentos de acrilamida son de baja masa y el poder de separación de LC no es muy alto, debido a la pobre retención de acrilamida en fases de separación comunes. Las interferencias pueden ocurrir muy a menudo incluso en matrices simples; por lo tanto, LC-MS/MS es obligatorio para detectar acrilamida no derivada (17).

Los métodos de LC-MS/MS son los métodos más publicados. Se ha investigado comparativamente el efecto de diferentes fases sólidas sobre la retención cromatográfica de acrilamida. La mejor retención se logró con una fase que comprendía carbono grafitico poroso (Hypercarb) utilizando agua como fase móvil (15).

La mayoría de los métodos establecidos emplean ionización por electrospray (ESI). Otro método recomienda la ionización química a presión atmosférica como interfaz reportándose una sensibilidad mejorada para la acrilamida (LOD 0,03 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) y menos efectos de matriz en comparación con ESI (44).

Para mejorar la etapa cromatográfica, se investigó la cromatografía líquida de rendimiento óptimo (UPLC) acoplada a MS/MS. Este método proporciona un procedimiento rápido con un tiempo de ejecución de solo 3 min (45). Además, las partículas híbridas utilizadas en las columnas de UPLC a menudo mostraron una selectividad única en comparación con los empaques de HPLC convencionales (46).

La ventaja del método de UPLC también se relaciona con un aumento en la eficiencia y la resolución de ejecución, porque las partículas con un tamaño de 1,7 μm en las columnas de UPLC permiten el análisis cromatográfico a una presión mucho más alta y una tasa de flujo más rápida (15).

1.4.5.4. Otras técnicas

La cromatografía electrocinética en micro emulsión, una técnica de electroforesis capilar (EC), se ha aplicado para la determinación de acrilamida

sin derivatización (15). Se obtuvo un LOD inferior para EC después de la derivación de acrilamida con ácido 2-mercaptobenzoico para obtener un compuesto iónico ($\text{LOD } 0.07 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), (47). La aplicabilidad de EC acoplada a MS/MS para el análisis de acrilamida en productos alimenticios obtuvo buena linealidad y precisión y se informaron como opciones simples, rápidas y económicas (15). También se utilizó la detección por electroquímica pulsada (48).

Existen otros métodos incluidos los sensores de inmuno ensayo, biosensores electroquímicos y microbalanza de cuarzo (49). Preston et al. (50), produjo un anticuerpo policlonal mediante el uso de ácido 3-mercaptobenzoico (3-MBA)- acrilamida derivada como hapteno y usó de antisueros en un ensayo inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) para la detección de acrilamida. La desventaja de este método es que la acrilamida necesita de una derivatización.

1.5. Antecedentes de análisis por HPLC de acrilamida en papas fritas

En un estudio se propuso el uso de cromatografía líquida en fase normal (NP-HPLC) como un método eficaz para la detección y cuantificación de acrilamida (41). El método se basa en la separación de este analito en una columna polar utilizando ácido sulfúrico 0,01 M como eluyente. En estas condiciones, la acrilamida se convierte en un producto catiónico protonado de amonio. La mejora en el rendimiento y la reducción en los tiempos de análisis se lograron aún más mediante la introducción de un gradiente de acetonitrilo al 20% en la fase móvil. En la Tabla 1.1 se muestra las últimas referencias de análisis de acrilamida por HPLC.

1.6. Antecedentes de acrilamida en alimentos

La Administración de Alimentos y Medicamentos de los EE.UU. informó que ocho categorías de alimentos (papas crujientes, papas fritas comunes, papas fritas al horno, cereales para el desayuno, pan tostado, galletas, pan suave, café) aportan más del 80 por ciento del consumo de acrilamida de la población media. Las estimaciones de la exposición alimentaria realizadas en el Reino Unido revelan que los productos elaborados con cereales y papas son las principales fuentes de acrilamida en la alimentación en el Reino Unido (19), (Anexo1).

Tabla 1.1: Referencias de análisis de acrilamida por HPLC.

Autores	Paleologos y col.(41)	Wang y col.(31)	Khosman y col.(51)	Xu y col.(52)
Muestras	muestras de alimentos enriquecidos sin AA nativo	alimentos fritos chinos nativos a base de harina	papas chips	papas chips
Técnica	HPLC- fase normal	HPLC- fase inversa	HPLC-UV	HPLC- fase inversa
Detección	UV-200 nm	UV- 210 y 225 nm	UV-202 nm	UV-210 nm
Elución	Isocrática	gradiente	gradiente	-
Fase móvil	ácido sulfúrico 0,01 M	4,0 % v /v de ACN en agua	agua: ACN: metanol	metanol /agua (15: 85, v / v)
Valores de AA en papas fritas (ug.kg⁻¹)	843,3	crips: 138	chips: 239,6	-
LOD (µg.kg⁻¹)	10	6	2,46	0,066
LOQ (µg.kg-1)	-	2,3	3,14	-
RSD	< 1%	2,1-10,9 %	4,01 %	4,1 %
Recuperación	95 y 103 %	> 78.0%	-	88.9 y 89.5%

En Canadá, las concentraciones más altas de acrilamida se han detectado en papas fritas y papas chips; las papas contienen asparagina y azúcares naturales, y estos productos generalmente se cocinan a altas temperaturas (10). No se ha detectado acrilamida en las papas hervidas, ya que la temperatura de cocción no es lo suficientemente alta como para causar su formación. La acrilamida también se detectó en cereales para el desayuno, pasteles, galletas, panes, tostadas, productos de cacao y café, aunque en concentraciones más bajas que en las papas fritas y las papas chips. La acrilamida no está presente en ninguno de los ingredientes de estos productos alimenticios antes de la cocción. Según estadísticas en Canadá, las ingestas de acrilamida varían de 0,30 a 1,58 µg kg⁻¹-p.c por día cuando se usan niveles de consumo promedio (10).

En otros estudios (53), se calcularon estimaciones de ingesta de acrilamida para 110 niños alemanes, basándose en los análisis de ácidos mercaptúricos de acrilamida y glicidamida en la orina. Se observó una asociación significativa entre el consumo de papas fritas y el nivel de metabolitos de acrilamida (es decir, concentraciones 2–3

veces mayores de metabolitos en niños que consumen papas fritas más de 3 veces por semana en comparación con aquellos que las consumen menos de una vez al mes), (53).

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA), presentó resultados de la exposición dietética a la acrilamida para ocho países (Brasil, China, Francia, Irlanda, Nueva Zelanda, Noruega, España, Reino Unido), representados en la Tabla 1.2 El modelo combinó los datos de consumo individual con los datos de ocurrencia media obtenidos de las encuestas de monitoreo y con los pesos corporales de los consumidores informados en las encuestas de consumo (15).

Las estimaciones de las exposiciones dietéticas promedio oscilaron entre 0.2 y 1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día para la población adulta en general. Para los consumidores adultos en el percentil alto (95th-97.5th), las estimaciones de la exposición dietética oscilaron entre 0,6 y 1,8 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día (15).

Sobre la base de los pocos datos disponibles para los niños, se observó que los niños tenían exposiciones dietéticas a la acrilamida que eran aproximadamente el doble que las de los consumidores adultos cuando se expresaban sobre la base del peso corporal. El Comité tomó una exposición alimentaria a acrilamida de 1 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día para representar la media para la población general y una exposición de 4 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ de peso corporal por día para representar a los consumidores con alta exposición. Las papas chips (USA=papas fritas a la francesa) contribuyen entre 10-60 % y las papas crips (USA= chips) (10-22%) a la exposición dietética media total de acrilamida (15).

Según el Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias, se muestra una tabla resumen (Tabla 1.3) de los datos producidos en el 2002 sobre la presencia de acrilamida, por lo tanto, no necesariamente refleja los niveles actuales de acrilamida en estos productos.

El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) (15), presentó datos de acrilamida reportados por varios países (Tabla 4). La mayoría de las muestras se analizaron mediante métodos GC-MS/MS o LC-MS/MS, donde el LOD y el LOQ variaron de 1 a 60 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ y de 2 a 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectivamente, para diferentes productos alimenticios.

Tabla 1.2: Estimación de la exposición dietética de acrilamida en algunos países (15).

País	Población	Año	Estimación	Principal contribución
Brasil	578 adolescentes de 11 a 17 años	2004-2006	0,12 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en promedio y 0,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día para el percentil 97,5.	Papas (60 %)
China	4320 personas mayores de 15 años de edad	2000 y 2009	0.19 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en 2000 y 0.29 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en 2007.	Papas fritas y asadas (53,7 %) (2000), (48,7 %) (2007)
Francia	4079 participantes de 3 a 79 años	2008-2009	0,4 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en promedio y 1,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día para el percentil 95 (Población de 17 años). 0,7 y 1.8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día (niños de 3 a 17 años).	Papas chips (45-60 %)
Irlanda	954 adultos de 18 a 64 años	2006	0,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en promedio y 1,8 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día para el percentil 97,5.	Papas (48 %)
Nueva Zelanda	adultos, niños y bebés	2003 y 2005	0,7 y 0,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día (19 años de edad), de 1,4 a 1,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día (adolescentes de 11 a 14 años), de 1,7 a 2,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día (bebés de 6 a 12 meses)	Papas chips (9-23%) papas críps (10-22 %)
Noruega	119 mujeres embarazadas de 22 a 44 años	2003-2004	0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día y 0,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día para el percentil 95.	Papas críps (16 %)
España	Adultos	2005	0,2 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en promedio	Papas chips (23%)
Reino Unido	Adultos	2006	0,6 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día en promedio y 1,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ -p.c por día para el 97,5 percentil.	Papas chips (21%) papas críps (9 %)

Tabla 1.3: Niveles documentados de acrilamida en alimentos (19).

Grupo de alimentos	Grupo de productos alimentarios	Niveles de acrilamida ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)	
		mínimo	Máximo
papas	papas crujientes ^a	117	3770
	papas fritas o a la francesa ^b	59	5200
	papas (crudas)	< 10	< 50
	buñuelos de papa y papas desmenuzadas (fritos)	42	2779

^a Refrigerio de patatas (papas) fritas en cortes finos (en algunas regiones, comprendida América del Norte, se llaman "papas fritas").

^b Productos de papa en cortes más gruesos (llamados papas a la francesa en algunas regiones, comprendida América del Norte, o papas fritas en el Reino Unido).

Las concentraciones medias de acrilamida en las papas oscilaron entre 399 y 1202 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para las papas críps y de 159 a 963 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ para papas chips.

En un estudio en Colombia, se determinó la presencia de acrilamida en papas a la francesa de marca en 12 625 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, papas a la francesa de restaurant (661 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) y papas criollas fritas (142 $\mu\text{g.kg}^{-1}$), analizado por cromatografía de gases acoplado con espectrometría de masas (55).

1.7. Legislación

Sobre la base de los resultados del seguimiento en los Estados miembros de 2007 a 2011, la Comisión de la UE estableció "valores indicativos" para AA en diversos productos alimenticios. Los valores indicativos para las papas fritas se mencionan en la Tabla 1.5, según la Comisión de Recomendación 2013/647/UE. Estos "valores indicativos" no son umbrales de seguridad, sino que solo pretenden indicar la necesidad de una investigación. La recomendación dice: *"Las investigaciones deben continuar incluyendo el Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (HACCP) del operador de la industria alimentaria o un sistema similar con el fin de explorar con el operador de la empresa alimentaria si se han identificado los pasos de procesamiento relevantes susceptibles de la formación de acrilamida y si se han tomado las medidas apropiadas para controlarlos"* (13).

Tabla 1.5: Valores indicativos de AA en alimentos según la Comisión de Recomendación 2013/647/UE (13).

Producto alimenticios	Valor indicativo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Papas fritas listas para comer	600
Papas críps de papas frescas y de masa de papa Galletas a base de papa	1000

El Reglamento 2158/2017 (Comisión Europea 2017) (Anexo2) obliga a los procesadores de alimentos y operadores de negocios alimentarios en Europa a reducir la presencia de acrilamida en sus productos de acuerdo con el principio ALARA, estableciendo medidas proporcionales al tamaño y la naturaleza de los establecimientos (56).

Los productos a base de papa son uno de los principales contribuyentes a la exposición a la acrilamida, y se ha establecido un nivel de referencia de $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para las papas fritas listas para comer (Tabla 1.6). Este valor está en línea con el resultado de la opinión científica de la EFSA sobre la acrilamida en esta categoría de alimentos que determina un contenido promedio de $308 \mu\text{g.kg}^{-1}$ y $971 \mu\text{g.kg}^{-1}$ en el percentil 95 (13). También se compara que entre el 2013 y el 2017, la Comisión Europea disminuyó el valor indicativo de acrilamida en papas fritas, indicando que en este último Reglamento el valor es más estricto.

Tabla 1.6: Valores indicativos de AA en alimentos según la Comisión de Recomendación 2158/2017 (56).

Producto alimenticios	Valor indicativo ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)
Papas fritas listas para comer	500
Papas críps de papas frescas y de masa de papa Galletas saladas a base de papa	750

En los últimos años, algunas iniciativas educativas vinculan el color dorado de la papa frita con niveles más bajos de acrilamida y, por lo tanto, con buenas prácticas de fritura (54). En este sentido, la Asociación Europea de Procesadores de papa lanzó la iniciativa GoodFries (www.goodfries.eu) para servicios de alimentos y

consumidores. La Agencia de Normas Alimentarias en el Reino Unido y la Agencia Española de Seguridad Alimentaria, lanzaron las iniciativas 'Go for Gold' (FSA, 2017) y 'golden and not toasted' (AECOSAN, 2015) respectivamente, ayudando a los consumidores a comprender cómo minimizar la exposición a la acrilamida en casa (57).

1.8. Métodos de mitigación

Se han reportado un número limitado de medidas de mitigación de la acrilamida en papas a nivel industrial. Entre ellas se encuentran:

- Elegir variedades de papa con bajos niveles de azúcares reductores, almacenando las papas por encima de 6 °C y controlando los niveles de azúcar mediante análisis o una prueba de fritura.
- Cortar tiras más gruesas y blanquearlas con agua caliente (papas fritas);
- Controlar la entrada térmica;
- Controlar el contenido final de humedad y color (15).

El Reglamento de la UE estableció que los niveles de acrilamida pueden reducirse mediante enfoques de mitigación, como la implementación de buenas prácticas de manipulación y la aplicación de procedimientos basados en el análisis de peligros y principios de puntos de control críticos (Comisión Europea, 2017), (56).

Debido al alto contenido de asparagina en las papas, los azúcares reductores son normalmente el precursor de acrilamida que limita la velocidad de formación. Las papas fritas y las papas chips de una nueva papa intragénica con niveles muy bajos de asparagina, desarrolladas al silenciar los genes de asparagina sintetasa a través de la transformación del ADN, acumularon tan poco como el 5% de la acrilamida presente en los controles (58).

1.9. Fundamentos de Cromatografía

1.9.1. Nomenclatura

1.9.1.1. Cromatograma

Según IUPAC: “Es un gráfico u otra representación de la respuesta del detector, concentración del eluyente, versus el tiempo” (Figura 1.6). Un cromatograma nos da dos tipos de información (59) :

Tabla 1.4: Acrilamida presente en papas fritas en diversos países analizados por técnicas cromatográficas (15).

	Muestras evaluadas	Procedencia de alimentos	Temporada	Técnica de análisis	LOD (ug.kg-1)	LOQ (ug.kg-1)	Resultados
Brasil	114 (papas, galletas, tostadas, pan, cereales, galletas de almidón de yuca y harina de yuca y café instantáneo o polvo tostado).	supermercados, restaurantes de comida rápida y restaurantes en la región de Campinas	2004-2006	LC-MS / MS	10	20	papas fritas a la francesa (331 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas chips (612 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papa "palha" (al hilo) (549 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
Canadá	644 (café instantáneo, galletas crujientes, chocolate negro, papas fritas, cacao en polvo, nueces mixtas, chips de maíz, zumos de frutas, galletas, ciruelas pasas, galletas saladas, cereales de trigo, avena, maíz o arroz, mantequilla de maní, pan, chocolate con leche, pizza y café listo para beber.	tiendas de comestibles locales de Ottawa y locales de comida rápida	2009	LC-ESI-MS/MS	3	10	papas chips (537 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas fritas a la francesa (426 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
China	1316 (papas chips, pasteles, galletas, palomitas de maíz.	Puntos de venta de alimentos en China	2005-2007	LC-MS / MS	0,001–0,04	3–133	papas chips (740 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
República Popular Democrática de Corea	149 (Papas chips, galletas, galletas, bocadillos de papa, palomitas de maíz, té, confitería, productos de carne y pescado (fritos) y chocolates).	alimentos tradicionales y nacionales	2009	-	-	-	papas chips (963 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) snacks de papa (74 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Unión Europea (incluyendo Noruega y Suiza)	6622 (productos de panadería, alimentos dietéticos, dulce, sustitutos del café, extractos, papas crips, chips y pan de jengibre).	alimentos específicos para personas con diabetes y alimentos	2004-2006, 2007-2008	LC-MS / MS y GC-MS (/ MS).	0,005 y 0,06	1,7 y 100	papas crips (524 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas chips (361 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Francia	197 (papa crips, chips, galletas saladas, galletas, café listo para beber, chocolate, pan / pasteles / rollos, cereales para el desayuno, y productos de carne y pescado.	alimentos compradas en una variedad de tiendas comerciales en ocho regiones y 33 ciudades	2008-2009	LC-ESI-MS / MS	0,004	10	papas crips (954 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas chips (724 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),

Japón	1631 (papas críps, chips, azúcar negro, verduras fritas (guisantes), brotes y espárragos, brócoli, col, calabaza, berenjena, judías, cebolla, galletas, curry, galletas de arroz, bocadillos de papa frita y café listo para beber.	siete supermercados seleccionados al azar en seis ciudades importantes de Japón	2005-2008	GC-MS / MS	0,005	20	papas críps (1202 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas chips (410 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
Países Bajos	359 las galletas saladas, galletas, tostadas, café tostado, pan (blanco, marrón e integral), cacahuates, papas chips, aceitunas, alimentos para bebé, productos de cacao, bizcochos y pan de centeno.	alimentos individuales	2005-2007	-	-	-	papas chips (150 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Noruega	233 (papas críps, galletas, pan crujiente, papas chips, cereales para el desayuno, pan, y café listo para beber.	alimentos individuales	2006	-	-	-	papas críps (780 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) papas chips (279 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)
Polonia	119 (papas críps, chips, café molido, galletas, gachas de trigo y arroz, cereales para el desayuno, platos caseros con carne y verduras y pan blanco.	alimentos tradicionales y nacionales recolectadas en restaurantes y tiendas y hechas en casa		GC-MS / MS después de la derivatización	0,02	40	papas chips (792 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas críps (399 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
Suecia	168 (papa crisps, chips, galletas, cereales y café)	de alimentos y restaurantes	2005-2009	LC-MS / MS	-	-	papas críps (773 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), papas chips (326 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
Turquía	431 (cereales para el desayuno, galletas, patatas críps, fritura de maíz, nueces y semillas tostado, café instantáneo y turco pasteles, galletas, verduras a la parrilla y tradicionales Alimentos turcos	alimentos procesados y alimentos tradicionales turcos, especialmente postres	2005-2008	GC-MS después de la derivación de bromo	0,01	30	papas críps (622 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$),
USA	483 (alimentos para bebés (galletas, galletas para la dentición, etc.), alimentos para bebés (a base de vegetales / carne), cereales para el desayuno, papas chips, papas fritas a la francesa, guisos y productos lácteos.	En 2005 muestras recolectadas de cuatro regiones (Oeste, Norte-central, Sur y Noreste y cestas de mercado), y el estudio de 2006 involucró una región (Norte-central, cesta de mercado)	2005-2006	LC-MS	0,01		papas chips (398 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$) papas fritas a la francesa (425 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$)

Información Cualitativa:

El tiempo de retención casi siempre es constante bajo las mismas condiciones cromatográficas. Esto nos sirve como un parámetro de identificación de sustancias.

Información Cuantitativa:

El área del pico de cada componente es proporcional a la concentración del componente en la mezcla, y este valor es utilizado para realizar cálculos de concentración.

Un cromatograma también puede utilizarse para evaluar la eficiencia de separación y la performance de la columna. Los principales parámetros de evaluación son:

- Factor de capacidad: k' .
- Selectividad: α .
- Número de platos teóricos: N .
- Resolución: R_s .

1.9.1.2. Tiempo de retención t_R

Es el tiempo que transcurre después de la inyección de la muestra hasta que el pico de concentración del analito alcanza el detector; es el tiempo que tarda un compuesto en salir de la columna; es el tiempo que tarda en aparecer el máximo de un pico. La velocidad lineal promedio de migración del soluto \bar{v} es:

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (1.1)$$

Donde, L es la longitud de la columna que esta rellena.

1.9.1.3. Tiempo muerto t_M

Es el tiempo necesario para que la especie no retenida alcance el detector; es el tiempo de migración de la especie no retenida.

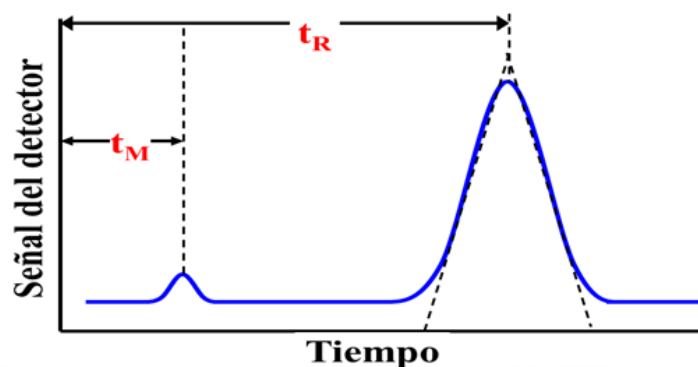


Figura 1.6: Cromatograma característico de una mezcla de dos componentes. El pico pequeño de la izquierda representa una especie que no se retiene en la columna.

1.9.1.4. Constante de distribución

En general, los equilibrios de distribución implicados en cromatografía se describen por ecuaciones sencillas que suponen la transferencia de un analito entre las fases estacionaria y la móvil. Así, para el soluto A, se puede escribir:



La constante de equilibrio K para este proceso se denomina constante de distribución o coeficiente de distribución, y mide la distribución del analito entre la fase estacionaria y la fase móvil. Se define como:

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1.3)$$

Donde C_S es la concentración molar del soluto en la fase estacionaria y C_M es la concentración molar en la fase móvil.

1.9.1.5. Factor de retención o factor de capacidad

Es un parámetro que describe la velocidad de migración de los solutos (analitos) en la columna. Para una especie A, el factor de capacidad k'_A se define como:

$$K'_A = \frac{K_A V_S}{V_M} \quad K'_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.4)$$

Donde K_A es el coeficiente de distribución de la especie A, V_S es el volumen de la fase estacionaria y V_M es el volumen de la fase móvil. Cuando el factor de

capacidad para una especie es mucho menor que la unidad, la elución tiene lugar tan rápidamente que es difícil determinar con exactitud los tiempos de retención, estos son demasiado cortos. En cambio, cuando el factor de retención es del orden de 20 o 30 o tal vez mayor, los tiempos de retención son excesivamente largos.

1.9.1.6. Factor de selectividad

El factor de selectividad α de una columna para dos especies A y B se define como:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad \alpha = \frac{K'_B}{K'_A} \quad \alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (1.5)$$

Donde K_B es el coeficiente de distribución para la especie más fuertemente retenida B, y K_A es el coeficiente de distribución para la menos retenida, o que eluye con más rapidez, la especie A. Según esta definición α siempre es mayor que la unidad, porque B es el compuesto más retenido ($t_R > t_R$). Donde k'_B y k'_A son los factores de capacidad de B y de A, respectivamente.

1.9.1.7. Resolución cromatográfica

La resolución cromatográfica R_S de una columna es una medida cuantitativa de su capacidad para separar dos analitos. La resolución de una columna se define como:

$$R_S = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad R_S = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} \quad (1.6)$$

Donde W_A y W_B son la anchura de los picos A y B.

A partir de la Figura 1.7 se deduce que si $R \geq 1,5$ la separación de los componentes es completa, no será así si $R < 1,5$. Por lo que, para una fase estacionaria dada, la resolución puede mejorarse alargando la columna, aumentando así el número de platos. Aunque una consecuencia negativa del aumento de platos es el incremento del tiempo requerido para la separación.

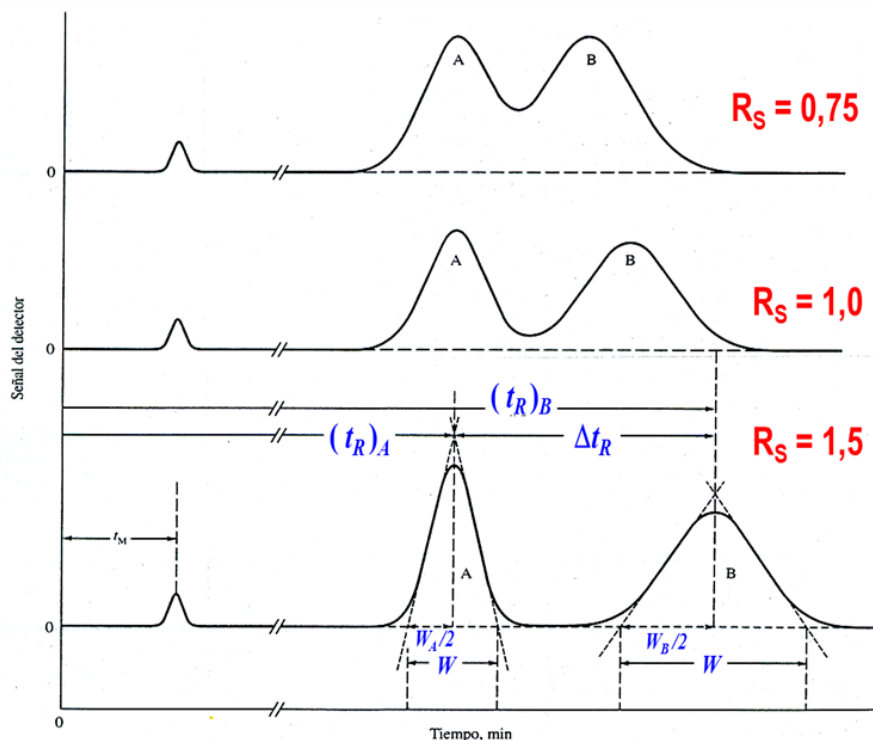


Figura 1.7: Separaciones correspondientes a tres resoluciones distintas.

Dónde: $R_s = 2\Delta Z / (W_A + W_B)$.

1.9.1.8. Eficiencia en cromatografía

La eficiencia se define en base a dos términos, que son medidas cuantitativas de la eficiencia de una columna: la altura del plato H y el número de platos N . Los dos están relacionados por la ecuación:

$$N = \frac{L}{H} \quad (1.7)$$

Donde L es la longitud (normalmente en centímetros) del relleno de la columna.

La eficacia de la columna cromatográfica aumenta cuanto mayor es el número de platos, y cuanto menor es la altura de plato. Existen diferencias en las eficacias por diferencias en el tipo de columna y/o el tipo de fases móvil y estacionaria. Existe otra ecuación para calcular el número de platos N :

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.8)$$

1.9.2. Factores que causan el ensanchamiento de banda

Difusión Longitudinal

Es la tendencia con la cual las moléculas viajan a través de la columna. Su magnitud es inversamente proporcional a la velocidad de flujo (Figura 1.8).

Este factor es importante si:

- El tamaño de la fase estacionaria es pequeña ($< 10 \mu\text{m}$).
- La velocidad de la fase móvil es lenta.



Figura 1.8: Factores que causan el ensanchamiento de banda: Difusión longitudinal.

Resistencia a la transferencia de masas

La resistencia a la transferencia de masa es propia de la facilidad con la cual las moléculas de la muestra se equilibran entre la fase móvil y la fase estacionaria. Es directamente proporcional a la velocidad de flujo.

Para prevenir esto:

- Deben de utilizarse partículas pequeñas (o de películas delgadas) o superficies porosas como fase estacionaria.
- Deben de utilizarse solventes de baja viscosidad.
- Pueden obtenerse una alta razón de análisis a expensas de la resolución y viceversa.

1.9.3. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) representa la culminación moderna del desarrollo de la cromatografía líquida. El usuario comienza colocando muestras en una bandeja para inyección automática en la columna. El solvente (fase móvil) se bombea continuamente a través de la columna, y los

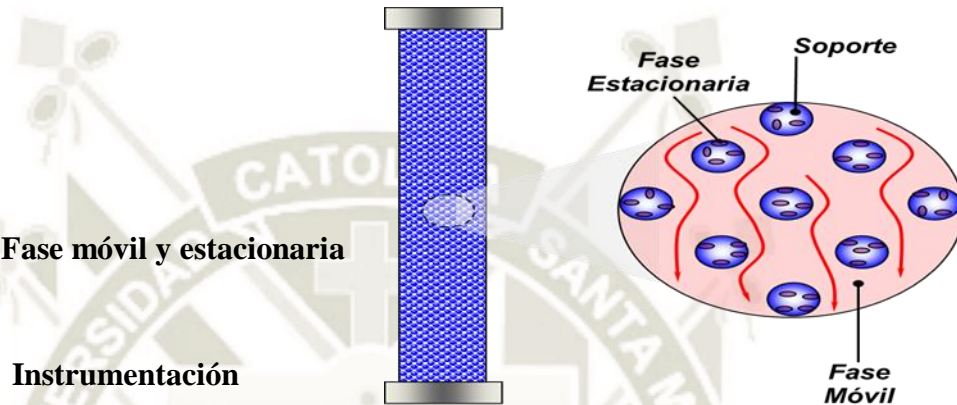
compuestos separados son detectados continuamente por un detector cuando salen de

la columna. La señal del detector resultante representada en función del tiempo es el cromatograma (60).

Básicamente es un sistema compuesto de un reservorio de fase móvil, bomba, inyector, columna de separación y detector.

Figura 1.9: Fase móvil y estacionaria en HPLC.

1.9.3.1. Instrumentación



En la Figura 1.10, se muestra un diagrama de la instrumentación de un sistema de cromatografía líquida de alta resolución y posteriormente se detalla sus partes.

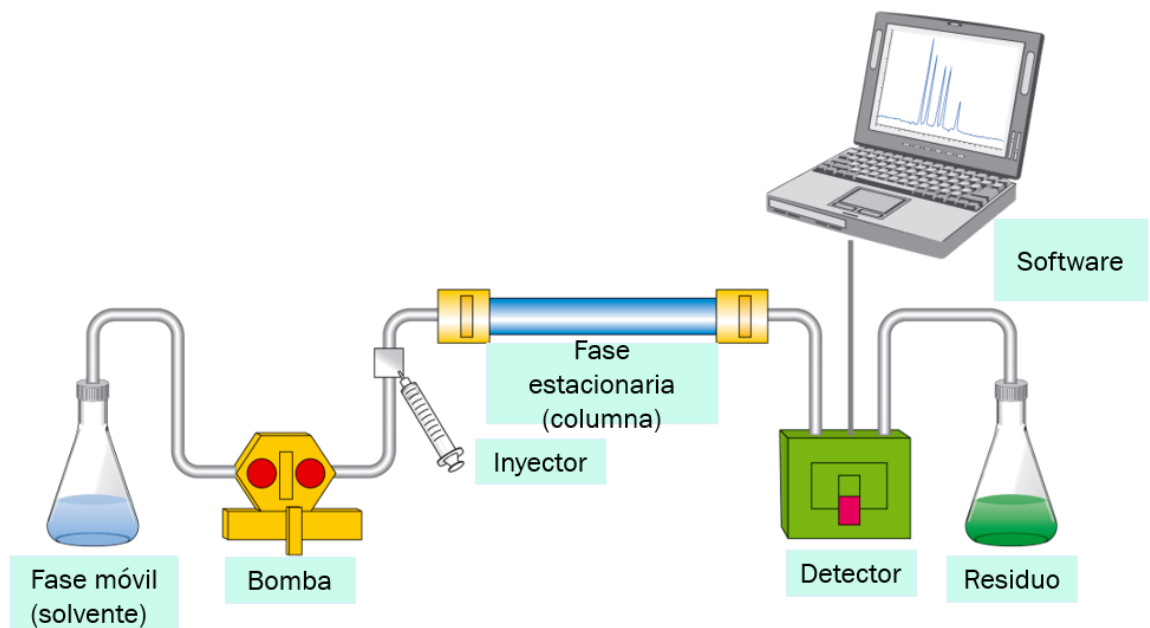


Figura 1.10: Componentes del sistema de HPLC.

Bombas

La bomba tiene la función de proveer un flujo continuo del eluyente a través del inyector, la columna y el detector. Los requisitos de una bomba para HPLC son (59):

- Rango de flujo: de 0.01 a 10 mL/min
- Rango de presión: de 1 a 5000 psi
- Pulsos de presión: menos del 1% para HPLC normal e inverso y menos del 0,2% para el HPLC de exclusión de tamaño.

En HPLC se emplea casi exclusivamente bombas de pistón (Figura 1.11), que confieren a la fase móvil alta presión (61).

Existen distintos tipos de bombas:

- De presión constante: son fáciles de usar y con bajo mantenimiento, además evitan los pulsos de presión. El problema es que requiere una vigilancia constante del flujo, puesto que las variaciones pueden producir fallos.
- De flujo constante: son capaces de mantener el flujo.

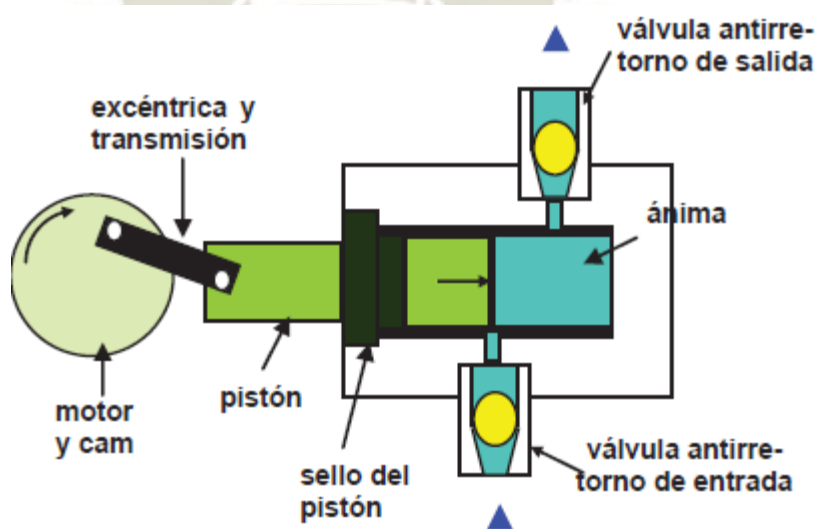


Figura 1.11: Esquema de una bomba de HPLC de pistón (61).

Inyectores

Los inyectores deben introducir muestras líquidas en un rango de volumen desde 0,1 mL a 100 mL con una alta precisión y alta presión que poseen válvulas de 6 puertos con un bucle que permite no solo la inyección de muestra sino también la purga del sistema y la eliminación de burbujas (59). Se encuentra interpuesto entre la salida de la bomba y la columna y es un dispositivo hermético. La mayoría de los equipos utilizan inyectores de válvulas, por su reproducibilidad y por resistir altas presiones (61).

Columna

La columna es un cilindro usualmente metálico que alberga micropartículas con la fase estacionaria (Figura 1.12) y es la parte más importante del sistema cromatográfico.

Normalmente compuesta de acero inoxidable del tipo 316, con diámetros internos desde 2,6 a 5 mm, normalmente con filtros de acero poroso.

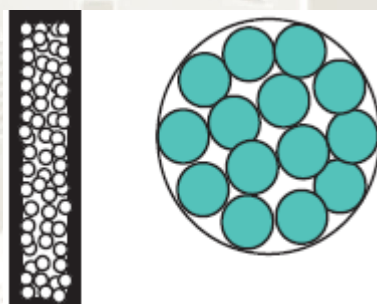


Figura 1.12: Columna cromatográfica rellena de micropartículas (61).

Las columnas HPLC han sufrido continuas mejoras que han contribuido a alargar su vida útil, rellenas con partículas más rígidas y robustas, de diámetro cada vez menor y tamaño más homogéneo. Existen rellenos porosos con gran variedad de diámetros de poro, nuevos núcleos poliméricos, de zirconio, titanio, carbón poroso, alúmina, etc., en rellenos más uniformes cuya superficie particular mejor recubierta presentan menores niveles de metales residuales. Cada cierto tiempo se debe verificar el estado de la columna mediante un test específico con patrones, comprobando los límites de cada

parámetro cromatográfico, mediante pruebas de idoneidad (*Suitability Test*) (61).

Tubos conectores

Todos aquellos tubos que transportan las sustancias de columna a columna, de columna a detector o de detector a detector. No deben superar los 0,634 mm de diámetro interno o causaran picos en las mediciones.

Filtros

Situados entre la bomba y el inyector de muestras, para evitar la entrada de ciertas sustancias y evitar el colapso de la columna. Normalmente estos filtros están compuestos de acero poroso.

Medidores de presión

Son indicadores de fallos en el sistema, nos indica cuando un flujo continuo falla por motivos de presión y si existe alguna fuga en la infraestructura del sistema (59).

Termostatos de columna

Son importantes para mantener la columna a una temperatura óptima, sobretodo en análisis cualitativo, puesto que las variaciones de temperatura pueden cambian la viscosidad del eluyente e influir en el volumen retenido (59).

Detectores

El detector de HPLC precisa dos propiedades: responder ante muestras en estado líquido y hacerlo en régimen de flujo continuo, para generar los cromatogramas, gráficos *on-line* de su señal continua frente al tiempo cuando las muestras atraviesan su celda de flujo continuo (61). Los detectores se pueden clasificar por su fundamento físico-instrumental en: detectores ópticos, basados en la interacción de la radiación con los analitos (detectores UV-VIS, arreglo de diodos, fluorimétricos, refractométricos, polarimétricos, de *light scattering*); detectores eléctricos, basados en la medida de una propiedad eléctrica (electroquímicos, conductimétricos); otros detectores (radiométricos, viscosimétricos) y detección hibridada, acoplando HPLC a otras técnicas (LC-MS, LC-ICP, LC-RMN, LC-FTIR, etc.).

Un buen detector adicionalmente debe mostrar mínima deriva y ruido, alta sensibilidad, rápida respuesta, varios órdenes de linealidad, pequeño volumen muerto, ser robusto, tener un manejo sencillo, no ser destructivo para las muestras y mostrar cierta selectividad ante los posibles contaminantes.

Los detectores espectrofotométricos (UV-VIS y de cualquier otro tipo) se basan en la absorción de la radiación, regida por la conocida ley de Lambert-Beer, cuyo enunciado establece que “la reducción de energía radiante de un haz de radiación monocromático es proporcional a la intensidad o potencia del haz y a la cantidad de sustancia absorbente situada en su trayectoria”.

Un detector espectrofotométrico de HPLC (Figura 1.13) consta de: fuentes de radiación, generalmente dos, una que emite radiaciones UV (lámparas de deuterio) y otra radiación visible (lámparas de tungsteno-halógeno), aunque algunos montan una sola lámpara de vapor de xénon para ambas regiones UV-VIS. Estas fuentes emiten radiación policromática, que un selector de longitud de onda reduce a radiación monocromática.

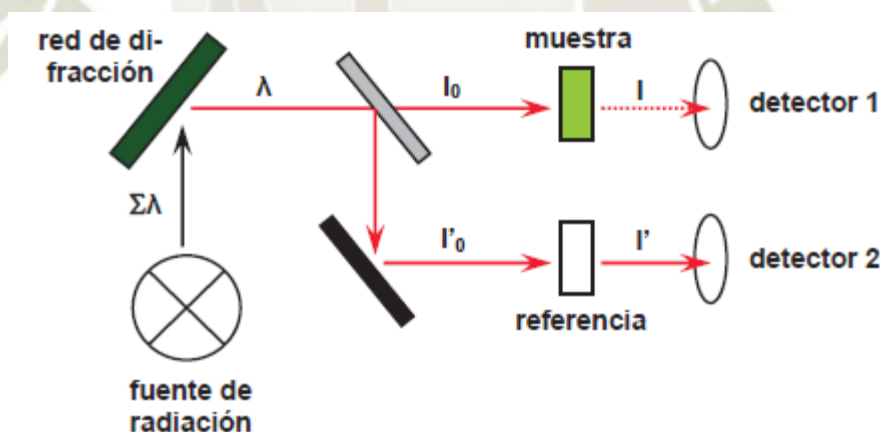


Figura 1.13: Óptica de un detector espectrofotométrico de doble haz (61).

1.9.3.1. Sistema de gradientes

Los gradientes de elución modifican la composición de la fase móvil durante el cromatograma, con dos propósitos: separar picos poco resueltos y, por otra parte, acortar los tiempos de análisis (Figura 1.14). Los equipos de HPLC responden a dos configuraciones: isocráticas y con gradientes.

El análisis isocrático utiliza la misma fase móvil a lo largo del cromatograma, con el mismo poder de elución y, por tanto, requiere una sola bomba. El análisis de gradientes permite variar la fase móvil durante el análisis, precisando un controlador programable, donde se programa el tiempo y composición de la fase móvil.

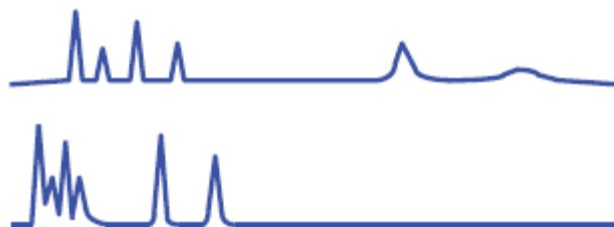


Figura 1.14: Dos cromatogramas isocráticos en columna C18; arriba una fase móvil metanol: agua 60:40 causa tiempos de retención largos; debajo, una fase móvil metanol: agua 80:20, más apolar, causa una elución más rápida, pero menor resolución en la zona inicial.

1.10. Validación de métodos analíticos

La validación del método de prueba analítica se completa para garantizar que la metodología analítica sea precisa, específica, reproducible y robusta en el rango especificado en el que se analizará un analito. La validación del método proporciona una garantía de fiabilidad durante el uso normal, y este proceso a veces se denomina como "el proceso de proporcionar evidencia documentada de que el método hace lo que se pretende" (60,62).

En 1987, la Asociación de Drogas y Alimentos de los Estados Unidos (FDA) designó por primera vez las especificaciones enumeradas en la edición actual de la Farmacopea de los Estados Unidos (USP) como aquellas legalmente reconocidas para determinar el cumplimiento de la Ley Federal de Alimentos, Medicamentos y Cosméticos. A su vez, se publicó información que actualiza las directrices anteriores y proporciona más detalles y se armoniza con las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH) (60) , por lo que es preferible utilizar las características y requerimientos de validación de esta última .

En la validación según la guía ICH Q2 se enumeraran las pruebas necesarias y los criterios de aceptación para un método , aunque en resumidas cuentas no hay directrices oficiales sobre la secuencia de experimentos de una validación (62).

La terminología y las definiciones involucradas en esta guía se detallan a continuación:

1.10.1. Linealidad y rango

La linealidad es la capacidad del método para obtener resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito dentro de un rango dado. Para los métodos de ensayo de este estudio generalmente se realiza mediante la preparación de soluciones estándar a cinco niveles de concentración ente el 80 y 120 % del objetivo. La aceptabilidad de los datos de linealidad se juzga al examinar el coeficiente de correlación y la intersección y de la línea de regresión lineal para el gráfico de respuesta frente a la concentración. Un coeficiente de correlación de $> 0,999$ generalmente se considera como evidencia de un ajuste aceptable. Además, la regresión lineal aplicada a los resultados debe tener un intercepto significativamente diferente a 0, este resultado se consigue mediante una evaluación estadística. Tomando la línea de regresión como la media, se calcula un porcentaje de CV para los datos y este valor no debe ser mayor que 2,0 % (62).

1.10.2. Límite de detección

El límite de detección (LOD) se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que puede detectarse, no cuantificarse. Es una prueba límite que especifica si un analito está o no por encima o por debajo de un cierto valor. Se expresa como una concentración en una relación señal/ruido especificada, generalmente (3:1). El LOD también se puede calcular en función de la desviación estándar de la respuesta (SD) y la pendiente (S) de la gráfica (s) de calibración en niveles que se aproximan al LOD según la fórmula: $LOD = 53,3 (SD / S)$. La SD de la respuesta se puede determinar en función de la SD del blanco, de la SD residual de la línea de regresión o la SD de las intersecciones y de las líneas de regresión (62).

1.10.3. Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se define como la concentración más baja de un analito en una muestra que se puede determinar con una precisión y exactitud aceptables en las condiciones operativas establecidas del método. A veces, se usa

una relación de señal a ruido de 10: 1 para determinar el LOQ. El método de cálculo se basa nuevamente en la SD de la respuesta y la pendiente de la (S) grafica (s) de calibración de acuerdo con la fórmula: $LOQ=10 (SD/S)$, (62).

La medición tanto del Límite de detección como el de cuantificación se realiza mediante el análisis de un número adecuado de muestras y el cálculo de la desviación estándar de los resultados del área de picos cromatográficas hallados mediante el estudio por HPLC.

1.10.4. Precisión

La precisión de un método analítico se define como la concordancia entre los resultados de las pruebas individuales de los análisis repetidos de una muestra homogénea y normalmente se expresa como porcentaje de la desviación estándar relativa (RSD) para un número estadísticamente significativo de muestras (62). Las directrices de ICH describen que la precisión puede calcularse de tres maneras diferentes: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad (60).

La Repetibilidad se expresa como la desviación estándar de los resultados analíticos, cuando el análisis es desarrollado en un laboratorio, por un analista con un equipo establecido y en un tiempo relativamente corto.

La Precisión Intermedia también es expresada como la desviación estándar de los resultados analíticos, cuando el análisis es desarrollado en días diferentes en el mismo laboratorio, por el mismo analista y con el mismo equipo establecido.

El ICH muestra una directriz para la recopilación de datos, basada en la obtención de al menos 6 réplicas que se medirán en 100 % de la concentración objetivo de prueba. Para la documentación en apoyo de la precisión del estudio se debe incluir la desviación estándar la cual no debe ser superior al 2,0%. (62)

1.10.5. Exactitud

La Exactitud generalmente se determina de cuatro maneras (62). Primero, puede evaluarse analizando una muestra de concentración conocida (materiales de referencia) y comparando el valor medido con el valor verdadero. El segundo enfoque es comparar los resultados de las pruebas del nuevo método con los resultados de un procedimiento alternativo bien caracterizado existente que se sabe que es preciso. El tercer enfoque, basado en la recuperación de cantidades

conocidas de analito, se realiza mediante la adición de analito en matrices. Para los métodos de ensayo, las muestras enriquecidas, la directriz del ICH recomienda que como mínimo las muestras enriquecidas se preparen por triplicado en tres niveles en un rango de 50 a 150% de la concentración objetivo. El cuarto enfoque es la técnica de las adiciones estándar, que también se puede utilizar para determinar la recuperación del analito enriquecido. Este enfoque se utiliza si no es posible preparar una matriz de muestra. El criterio de precisión para un método de ensayo es que la recuperación media será de 95 -105 % para muestras mayores a 1ppm y 90 -107 % para muestras menores a esta concentración (62).





CAPÍTULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

1. LUGAR DE INVESTIGACIÓN

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Ensayo y Control de Calidad (H-204 /205) de la Universidad Católica de Santa María en la ciudad de Arequipa, en los meses de agosto y septiembre del 2018.

2. MATERIALES

2.1. Materiales de Laboratorio

- Vaso de Precipitados PYREX de 80 y 120 mL
- Fiolas de 1, 2 ,5 y 10 mL.
- Micro pipeta de 100-1000 μ l, marca KYNTEL
- Fiolas de 10, 50 y 100 mL
- Bureta de 25 mL calibrada
- Lunas de reloj
- Pera de decantación
- Matraz Kitasato de 1 L (boca 40/35)
- Botellas de vidrio de 1L
- Tubos Eppendorf de 1 mL
- Espátulas

2.2. Equipos y aparatos

- Equipo de Cromatografía Líquida de Alta resolución MERCK HITACHI (modelo La Chrom), equipado con:
 - Detector DAD (*Diode Array Detector*) MERCK HITACHI (modelo L-2430)
 - Bomba programable MERCK HITACHI (modelo L-2130)
 - Organizador LaChrom (modelo L-2000)
 - Columna MERCK LICHROCAR 250 mm x 4 mm RP-18 (5 μ m)
 - *Software* HPLC “*System Manager Version 4.1*”
- Balanza Analítica electrónica de cinco dígitos marca OHAUS (1- 400 mg)
- Balanza Analítica electrónica de cuatro dígitos marca KERN
- Bomba al Vacío de alto rendimiento 4
- Hotplate stirrer VELP (370 °C- 200 rpm)
- Vortex Homogeneizador BARNSTEAD
- Baño de Ultrasonido BRANSON

- Centrifuga Refrigerada
- Purificador de agua tipo I PURELAB CLASIC UV Elga
- Potenciómetro ORION

2.3. Reactivos

- Estándar de Acrilamida con pureza $\geq 99\%$ (Biolab Reagent A96520)
- Acetonitrilo grado HPLC (Merck)
- Metanol grado HPLC
- Hexano grado analítico
- Ácido ortofosfórico
- Agua ultra pura

2.4. Otros materiales

- Agitadores magnéticos
- Soporte de membrana con placa porosa 40/35
- Embudo de filtración al vacío
- Viales para HPLC
- Membranas de filtración Nylon 0,22 μm para HPLC (RephiQuick)
- Jeringa desechable de 5 mL

2.5. Muestras de estudio

Se estudiaron tres tipos de papas fritas, las cuales se escogieron teniendo en cuenta su origen y las distintas formas de preparación, para que así puedan representar de manera significativa a las papas fritas consumidas por la población de Arequipa. Estas fueron: papas fritas de restaurantes de comida rápida, “chips” y caseras.

3. MÉTODOS

3.1. Análisis de acrilamida por Cromatografía líquida de alta resolución

Para la identificación de los tiempos de retención de acrilamida se usó el estándar con una pureza mayor al 99 %. Las condiciones cromatografías se detallan en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1: Condiciones cromatográficas para la determinación de Acrilamida en papas fritas

<i>Fase móvil</i>	Acetonitrilo : agua acidificada pH 2,5 (2 :98)
<i>Columna cromatográfica</i>	Rp 18 Merck Lichrocart
<i>Flujo</i>	1 mL/min
<i>Volumen de inyección</i>	20 µl
<i>Tiempo de corrida</i>	10 min
<i>Sistema</i>	Isocrático
<i>Detector UV</i>	200 nm

Se realizaron diferentes pruebas para así identificar la proporción correcta de la fase móvil, la velocidad de flujo y el tiempo de retención adecuado que permita una separación óptima de la acrilamida. Se utilizó un sistema isocrático con una fase móvil A (acetonitrilo) y una fase móvil B (acuosa).

3.1.1. Preparación de la fase móvil

Se preparó una fase móvil que consistió en una mezcla de acetonitrilo y agua acidificada en una relación de 2:98. Para la acidificación de la fase móvil acuosa, se agregó 3 gotas de ácido ortofosfórico (50%) a 600 mL de agua ultra pura obteniendo un pH de 2,5. El agua acidificada y el acetonitrilo se filtraron al vacío con un filtro de 0,2 µm, antes del análisis cromatográfico.

3.1.2. Preparación de la solución stock del estándar de acrilamida

Para la preparación de la solución stock se pesó 10 mg del estándar de acrilamida en una balanza analítica de cinco dígitos y se transfirió a una fiola de 100 mL el cual se completó con metanol grado HPLC. Se obtuvo una solución stock de 100 ppm y se conservó a 4 ° C.

3.2. Validación del método analítico

Según los criterios antes mencionados acerca de lo requerido para una validación, se evaluaron los siguientes parámetros: linealidad, límite de detección, límite de cuantificación, precisión y exactitud.

3.2.1. Linealidad

La linealidad tiene la función de encontrar la proporcionalidad entre la concentración del analito y su respuesta respectiva, por lo que esta se estimó identificando señales de detección en función de la concentración del analito realizando una línea de regresión a través de una gráfica de calibración

A partir de la solución stock de 100 ppm que se obtuvo como se muestra en la Figura 2.1, se tomó una alícuota de 2,5 mL y se llevó a una fiola de 50 mL con agua ultrapura, para así tener una solución de 5 ppm. De la solución de 5 ppm se tomaron alícuotas de 0,1; 0,2; 0,5; 1 y 2 mL llevando a cada una de ellas a fiolas de 10 mL, enrazándolas con agua ultrapura, obteniendo concentraciones de 0,05; 0,1; 0,5; 1 y 2 ppm (Figura 2.1 ,2.2 y Tabla 2.2). Las soluciones se filtraron con discos de 0,2 μm y se colocaron en viales de HPLC para realizar la lectura cromatográfica. Este proceso se realizó 6 veces por cada estándar de acrilamida.

Tabla 2.2: Concentraciones de acrilamida para la gráfica de calibración.

<i>Concentración acrilamida (ppm)</i>	<i>Alícuota solución 5 ppm (mL)</i>	<i>Volumen total mL</i>
0,05	0,1	10
0,1	0,2	10
0,5	0,5	10
1	1	10
2	2	10



Figura 2.1: Soluciones de acrilamida para la gráfica de calibración.

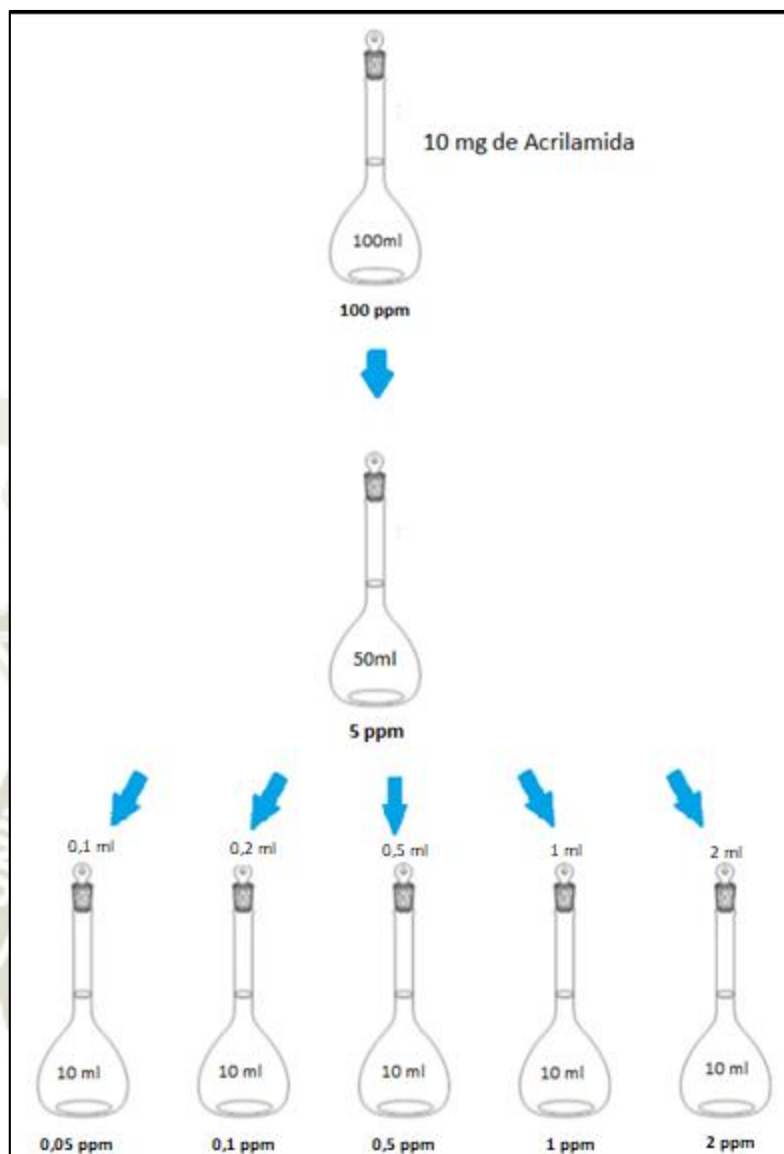


Figura 2.2: Preparación de la gráfica de calibración

A partir de las señales (área del cromatograma) de estas concentraciones se pudo obtener la ecuación de la recta:

$$Y = b \cdot X + a \quad (2.1)$$

El valor de b está dado por:

$$b = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \quad (2.2)$$

y el valor de a por:

$$a = \frac{\sum Y_i - b \sum X_i}{n} \quad (2.3)$$

Dónde:

X: la concentración del analito

Y: valor del área del pico cromatográfico

b: valor de la pendiente de la recta

n: número de mediciones

El coeficiente de regresión lineal (r) se determinó para evaluar el ajuste lineal propuesto:

$$r = \frac{\sum X_i Y_i - \frac{\sum X_i \sum Y_i}{n}}{\left(\sqrt{\sum X_i^2 - \frac{(\sum X_i)^2}{n}} \right) \left(\sqrt{\sum Y_i^2 - \frac{(\sum Y_i)^2}{n}} \right)} \quad (2.4)$$

Este coeficiente da cuenta de la bondad del ajuste de la gráfica a los datos experimentales. Su valor oscila entre 0 y 1, valores de r próximos a 1 implican un mejor ajuste.

Además, se realizó una prueba estadística utilizando un Análisis ANOVA de regresión, que tiene como fundamento las siguientes premisas: $H_0 = 0$ y $H_1 \neq 0$. Donde en el caso de la hipótesis nula (H_0), se acepta que la pendiente sea igual a b , entonces no existiría correlación en la gráfica de calibración. En el caso de la hipótesis alternativa (H_1) se afirma que no existe igualdad entre estos valores y por ello existiría correlación en la gráfica de calibración.

3.2.2. Límite de Detección y Cuantificación

A partir de la gráfica de calibración se puede calcular el LD y LC. La recta se extrapola a una concentración cero y se obtiene un estimado de la respuesta del blanco Y_{bl} . Para el cálculo de la desviación estándar del blanco, se grafica una recta de la concentración frente a la desviación estándar de cada medida y se extrapola a concentración cero, de este modo se obtiene el estimado S_{bl} .

-Límite de detección

El límite de detección se refiere a la concentración mínima detectable del analito, más no necesariamente cuantificable en una muestra con las condiciones establecidas. Este puede expresarse según las unidades en las que se estén trabajando, en este caso ppm. El límite de detección se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{Y_{bl} + 3S_{bl}}{b} \quad (2.5)$$

-Límite de Cuantificación

El límite de cuantificación se refiere a la concentración mínima detectable del analito que pueden determinarse con precisión y exactitud aceptables con las mismas condiciones establecidas. Este puede expresarse según las unidades en las que se esté trabajando en este caso ppm. El límite de cuantificación es característico de las valoraciones cuantitativas de muestras que poseen bajas concentraciones como el caso de la acrilamida, ya que es un compuesto formado de la materia prima que ha sido sometida a un proceso. El límite de cuantificación se expresa mediante la siguiente ecuación:

$$LC = \frac{Y_{bl} + 10S_{bl}}{b} \quad (2.6)$$

Para todo ello es necesario contar con la gráfica de calibración que fue elaborada en el proceso de linealidad. Con dicha gráfica y sus respectivos datos reemplazados en las ecuaciones descritas, se obtuvo los valores del límite de cuantificación y de detección.

3.2.3. Precisión

La precisión está definida como la dispersión de la medida alrededor de un valor central o medio, cuando el método se aplica repetidamente. Se expresa como la desviación estándar y puede ser medida por la repetibilidad de un método analítico. La desviación estándar σ , también se puede expresar como desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV). La desviación estándar se expresa como:

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2}{n-1}} \quad (2.7)$$

Donde:

$$\bar{X} = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad (2.8)$$

La desviación estándar relativa (DSR) o coeficiente de variación (CV) se expresa como:

$$CV = \frac{S \times 100}{\bar{X}} \quad (2.9)$$

Estas desviaciones permiten determinar la incertidumbre en la estimación de la medida en distintas escalas (error aleatorio). Estos parámetros se evalúan a partir

de al menos seis lecturas del estándar y en condiciones repetitivas (mismo día, instrumento y analista), así como en condiciones reproducibles (diferentes días, instrumento y analista). Según la USP, la CV no debe superar el 2%, en lecturas (6veces) de la solución estándar.

Para cumplir con este parametro se realizo las siquientes pruebas :

3.2.3.1. Precision intermedia

Para el calculo de este nivel se utilizo un estandar de 0,8 ppm el cual fue elaborado diluyendo 1,6 mL,de la solucion de 5ppm elaborada en el proceso de linealidad , en una fiola de 10 mL. La determinacion de la precision intermedia se dio mediante el analisis de 6 de estos estandares , bajo el mismo tratamiento , el mismo equipo , mismo analista pero en diferentes dias (analizando una muestra por dia).

Ademas de calcular el coeficiente de Variacion (Ecuacion 2.9) es necesario calcular también la desviación estándar relativa según Horwitz que relaciona la DSR o C.V de Horwitz de un método con la concentración del analito de la muestra. La ecuación para la precisión intermedia está dada por:

$$CV \text{ de Horwitz}(\%) = 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (2.10)$$

Donde C es la concentración del analito

3.2.3.2. Repetibilidad

Para calcular la repetibilidad se realizo 6 lecturas repetidas de un estandar de 0,8ppm elaborado de la misma manera que para la precision intermedia , con el mismo equipo y el mismo analista.

Al igual que en la precision intermedia ,es necesario que ademas de calcular el coeficiente de Variacion (Ecuacion 2.9) se calcule el C.V de Horwitz que para la repetibilidad se calcula de la siguiente manera:

$$CV \text{ de Horwitz}(\%) = 0,5 \times 2^{(1-0,5 \log C)} \quad (2.11)$$

Donde C es la concentración del analito

3.2.4. Exactitud

La exactitud (error sistemático) corresponde a la diferencia entre el valor obtenido (media) y el valor verdadero. La exactitud se reporta como porcentaje de recuperación de una cantidad conocida de analito que es agregada a la muestra. La desviación se expresa como:

$$B = \bar{X} - \hat{X} \quad (2.12)$$

La desviación relativa como:

$$B\% = \frac{B}{\bar{X}} \cdot 100 \quad (2.13)$$

Y la recuperación está dada por:

$$R = \frac{\bar{X}}{\hat{X}} \cdot 100 \quad (2.14)$$

Donde \bar{X} es el valor medio y \hat{X} , el valor verdadero. De todas ellas, la más utilizada es la recuperación; si bien el valor verdadero de concentración no se conoce, solo puede estimarse; es posible preparar una muestra por un procedimiento más exacto que el evaluado (por pesada, dilución de peso, etc.) para utilizarla como referencia. La recuperación del analito siempre debe de acercarse al 100 %.

Para determinar el grado o la proporción en el cual método de análisis instrumental re-evalúa la señal de una concentración definida de analito adicionada a una muestra problema, es así que se ejecutó el test de recuperación agregando 0,5 ppm de analito a un volumen definido de extracto de acrilamida proveniente de una muestra de papas fritas del Restaurante de comida rápida A extraída mediante el método Met2.

3.3. Recolección de las muestras

Se optó por realizar el estudio en dos partes, de tal manera que la primera tenga la función de una prueba piloto que permita reconocer las mejores condiciones de extracción de cada tipo de papa frita; posteriormente en la segunda parte, con las condiciones y resultados que se obtuvieron en la primera parte se pudo detectar adecuadamente muestras de ciertos tipos.

La recolección de las muestras, de ambas partes, se dio mediante la compra o elaboración de las papas fritas el mismo día de análisis, seguidamente fueron transportadas al laboratorio bolsas de polietileno para proceder inmediatamente al análisis de estas.

La distribución y obtención de muestras se dio de la siguiente manera:

3.3.1. Primera Parte:

Esta prueba piloto se realizó recolectando cada muestra por 4 días consecutivos, quedando un total de:

- Cuatro muestras papas fritas de comida rápida que se obtuvieron tomando en cuenta el restaurante que está ubicado en todos los principales centros comerciales de Arequipa. (Restaurante A)
- Cuatro muestras de papas fritas caseras, las cuales fueron sometidas a un proceso de cocción no mayor a 135 °C.
- Cuatro muestras de papas fritas “Chips” que se obtuvieron de reconocidas marcas y cuatro muestras de papas “chips” a granel de mercados de Arequipa.

Estas muestras se extrajeron en dos solventes: agua y metanol (Met1 y Met2), como se puede observar en la tabla 2.3

Tabla 2.3: Tipos de papa frita utilizadas en la primera parte de la Investigación y los solventes en los que se extrajeron.

<i>Papas fritas</i>	<i>Muestras</i>	<i>Solvente</i>
<i>Comida Rápida</i>	M(Restaurante A)	Metanol
		Agua
<i>Caseras</i>	C	Metanol
		Agua
<i>Chips</i>	CH	Metanol
		Agua

Para poder determinar la precisión y reproducibilidad de la extracción de acrilamida sometida a diferentes métodos (Met1 y Met2) se realizó un test Fisher como se muestra a continuación:

3.3.1.1. Prueba F de Snedecor- Fisher

En una prueba estadística empleada para la comparación de varianzas.

Sean dos conjuntos de datos:

$\{x_1\}$ con varianza s_1^2 y tamaño n_1

$\{x_2\}$ con varianza s_2^2 y tamaño n_2

Consideramos la hipótesis nula que dice que las varianzas no presentan diferencias significativas entre sí. $H_0: \sigma_1^2 = \sigma_2^2$. Si $s_2^2 \geq s_1^2$, $F = \frac{s_2^2}{s_1^2} \geq 1$. Se compara con F_{tab} (0,05, n_2-1 , n_1-1). Si $F < F_{tab}$ se admite H_0 .

Las aplicaciones consisten en:

- Comprobar que dos métodos son igual de precisos.
- Comprobar que las varianzas son iguales para ver qué tipo de test de comparación de medias usar.
- Comprobar que en la reproducibilidad no interviene factores distintos a los encontrados en el estudio de repetitividad.

Los resultados obtenidos con las muestras analizadas en la Tabla 2. permitieron realizar un esquema de muestreo para la segunda parte de la experimentación.

3.3.2. Segunda Parte:

Para esta parte de la experimentación se recolectó muestras por 6 días consecutivos, las cuales fueron distribuidas de la siguiente manera:

- Muestras de papas fritas de comida rápida que fueron obtenidas de cinco restaurantes (Restaurante A, B, C, D y E) ubicados en los principales centros comerciales de Arequipa.
- Dos muestras de papas “Chips” a granel que fueron obtenidas de los mercados más representativos de la ciudad y dos marcas de papas “chips” que son comúnmente vendidas en las tiendas.
- Dos muestras de papas fritas caseras, sometidas a un proceso de cocción no mayor a 135 °C.

En la Tabla 2.4 se muestra el

Tabla 2.4: Muestras de papas fritas analizadas en la segunda parte.

<i>Papas fritas</i>	<i>Abreviatura</i>	<i>Origen</i>
<i>Comida rápida</i>	M1	Restaurante A
	M2	Restaurante B
	M3	Restaurante C
	M4	Restaurante D
	M5	Restaurante E
<i>Chips</i>	M6	A granel 1
	M7	A granel 2
	M8	Marca Chips 1
	M9	Marca Chips 2
<i>Caseras</i>	M10	Caseras1
	M11	Caseras2

3.4. Tratamiento de la muestra

La técnica empleada para la extracción de acrilamida en las matrices de estudio se realizó tomando como referencia el método de extracción utilizado por Paleólogos y col. (41) el cual se adecuó de la siguiente manera:

Se trituraron cinco gramos de cada una de las muestras de papas fritas de comida rápida en un mortero (para evitar la pérdida de muestra); en el caso de las papas chips se trituraron en una licuadora. Seguidamente se transfirieron a un vaso de precipitados de 80 mL y se agregaron 15 mL de agua destilada o metanol, según corresponda a la muestra, esto se mezcló durante 3 a 5 minutos utilizando una bagueta hasta obtener una masa homogénea. Se tapó el vaso con una luna de reloj para evitar la pérdida de vapores y se colocó en el *Hotplate stirrer* sobre un baño de María de 70 ± 5 ° C, con una agitación de 200 rpm por media hora (Figura 2.3). La mezcla obtenida se separó en tubos Eppendorf y se centrifugó a 12000 rpm a 4 °C por veinte minutos (Figura 2.4). Seguidamente se extrajo el sobrenadante (utilizando una micropipeta), este se transfirió a una fiola de 10 mL y se enrazó con el solvente correspondiente (metanol o agua); se agitó por un minuto en el vortex y se filtró dos veces al vacío con papel filtro N° 42. Finalmente se trasvasó la solución a una pera de decantación de 35 mL y se añadió 30 ml de hexano (por 1mL de solución 3 mL de hexano) por tres veces, de este modo se eliminó todos los lípidos que se puedan encontrar en el extracto (Figura 2.5) los cuales podrían ocasionar problemas en la

lectura cromatográfica bloqueando la columna polar. La mezcla se agitó fuertemente y se dejó reposar por un minuto. La fase lipídica de la parte superior fue eliminada y se recuperó la fase acuosa en una fiola de 5mL. Finalmente se agregó el extracto a un vial de HPLC usando una jeringa descartable y una membrana Nylon de disco de $0,22\ \mu\text{m}$ a un vial de HPLC y se procedió con la lectura cromatográfica.



Figura 2.3: Muestra de papas fritas trituradas y calentadas a $70\ ^\circ\text{C}$ con el Hotplate stirrer.

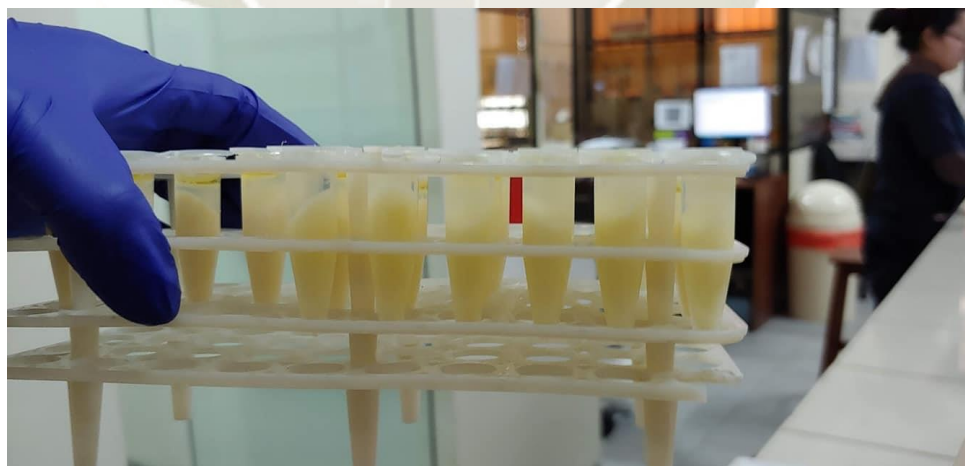
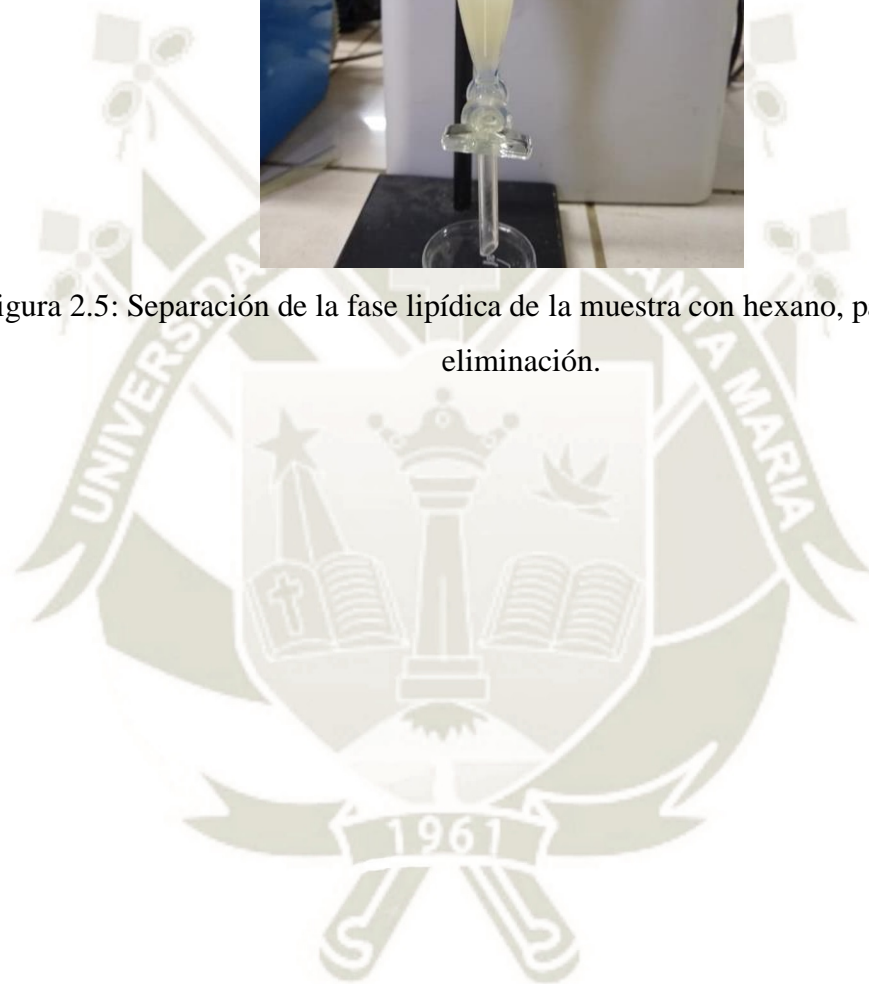



Figura 2.4: Tubos Eppendorf después de la centrifugación a $12000\ \text{rpm}$ y $4\ ^\circ\text{C}$.



Figura 2.5: Separación de la fase lipídica de la muestra con hexano, para su posterior eliminación.





CAPÍTULO III
RESULTADOS Y DISCUSIONES

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Tiempo de retención

La fase móvil utilizada que constaba de acetonitrilo y agua acidificada en una relación de 2:98, permitió que la acrilamida tuviese un tiempo de retención de 2,8 minutos, como se muestra en la figura 3.1

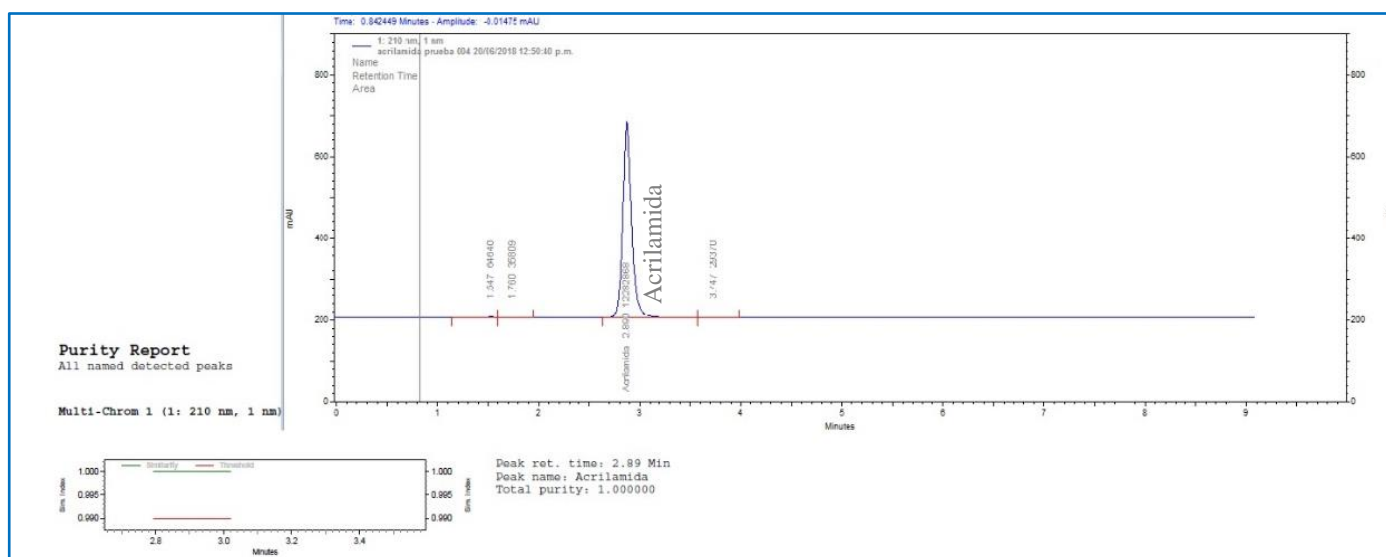


Figura 3.1: Se observa una pureza de pico mayor a 99%.

Como se puede observar el tiempo de retención es bajo, esto gracias a la influencia del pH de la fase móvil, a la cual con la adición del ácido otoposforio (50%) se le logra volver ácida y de esta manera lograr disminuir el pH y tornar a la acrilamida, que tiene un Pka elevado, en hidrofóbica para que logre reaccionar directamente con la columna de fase reversa RP18.

Seguidamente con estas condiciones se procedió a validar el método

4.2. Validación del método analítico

4.2.1. Calibración y linealidad en la determinación de acrilamida

En esta primera etapa se pretende determinar si el método de extracción y detección de acrilamida mediante solventes presenta un comportamiento lineal. Para lo cual, se evalúa la relación existente entre la señal y la concentración de los patrones elaborados (Figura 3.2). El registro de los mismos se resume en la Tabla 3.1 y la

señal del análisis de acrilamida por HPLC correlacionada con la concentración promedio del analito es representada en la Figura 3.3.

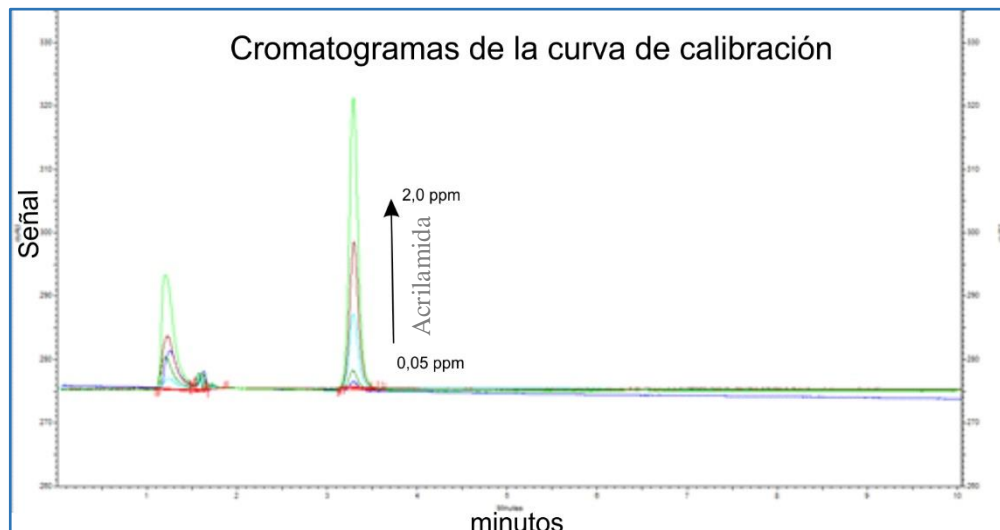


Figura 3.2: Cromatograma de la gráfica de calibración de acrilamida.

Tabla 3.1: Registro del área determinada por HPLC con las determinadas concentraciones de los patrones preparados. Se muestra también las medias de las áreas con la cual se realizó la gráfica de calibración y su Desviación estándar.

$(ppm)^{(a)}$	<i>Área cromatográfica</i>						$\bar{X}^{(b)}$	$SD^{(c)}$
0,05	14192	15348	12654	13205	14206	14560	14028	968
0,1	40409	40185	36063	39905	40502	39945	39502	1701
0,5	242739	238539	214077	223128	235060	239548	232182	11173
1	462177	456212	462211	463913	456882	460025	460237	3120
2	927344	921452	906783	928529	928579	919484	922029	8398

*(a) concentración de los estándares *(b) promedio de las áreas cromatográficas *(c) desviación estándar

En el rango de concentración de 0,05 a 2,0 ppm, el comportamiento de la señal presenta una linealidad aparente con la concentración, sin embargo, es requerido estimar cuantitativamente el porcentaje de linealidad y verificar si este comportamiento se extiende a lo largo del rango de concentración mencionado.

La gráfica de calibración registra una pendiente igual a $464747,355 \text{ ppm}^{-1}$ y un intercepto de 5670,369 u.a., junto a una desviación estándar de 2052,492 (S_b) y

2067,342 (S_a), respectivamente. El coeficiente de correlación (r) asociado a la fiabilidad del ajuste lineal presenta un valor igual a 0,99996, y que al ser superior a 0,999 corrobora la linealidad existente en relación entre la señal obtenida por HPLC y la concentración del analito (Tabla 3.2).

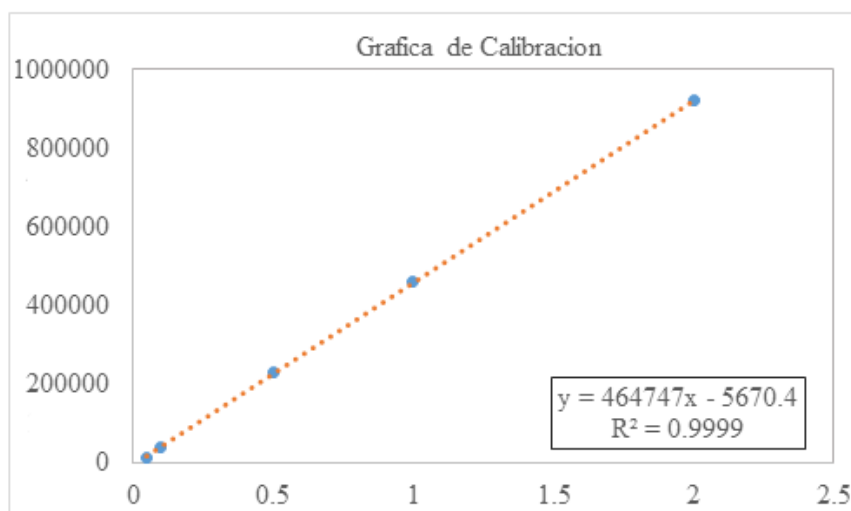


Figura 3.3: Gráfica de calibración de los estándares de acrilamida en el rango de concentración de 0,05 a 2,0 ppm que como se puede observar tiene un comportamiento lineal.

Asimismo, el porcentaje de linealidad puede ser estimado a partir de la pendiente (b) y su desviación estándar (S_b) conforme a:

$$\% \text{ linealidad} = \left(1 - \frac{S_b}{b}\right) \times 100 \quad (3.1)$$

Observándose que este parámetro presenta un valor de 99,46 %, y que al estar presente en el rango de 95 – 100 % confirma adicionalmente la linealidad entre ambos parámetros.

Tabla 3.2: Análisis estadístico del comportamiento lineal en la gráfica de calibración señal vs concentración de acrilamida.

<i>Ecuación lineal</i>	$y = bx + a$	$Y = 464747,35X - 5670,369$
<i>Pendiente</i>	b	464747,355
<i>Intercepto</i>	a	-5670,369
<i>Desviación estándar de la pendiente</i>	S_b	2052,492
<i>Desviación estándar del intercepto</i>	S_a	2067,342
<i>Coef. De correlación</i>	r	0,99996

Para corroborar si existe correlación entre las áreas obtenidas se realizó un análisis ANOVA , bajo la premisa de plantear dos Hipótesis : H_0 y H_1 en las cuales $b= 0$ y $b\neq 0$ respectivamente ; en el caso de la primera (hipótesis nula), se aceptara que la pendiente es igual a b , por lo tanto no existirá correlación alguna en la gráfica de calibración por el contrario en la segunda (hipótesis alternativa) , se afirmara que hay diferencia entre ambos valores y por lo tanto si hay correlación en la gráfica de calibración . Los resultados del análisis estadístico están especificados en la Tabla 3.3

Tabla 3.3: ANOVA de regresión lineal para Acrilamida

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	4.3351E+11	4.3351E+11	30242,6655	0,00003
Residuos	2	28668639,5	14334319,8		
Total	3	4.3354E+11			

Fuente: Elaboración propia

Como se observa el valor F encontrado es de 30242,7 y se encuentra muy por encima del Valor Crítico F el cual es 0,00003, con ello podemos decir que existe una evidencia experimental para rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, con un nivel de confianza al 95%. Esto significa que hay una correlación entre los valores encontrados al realizar las mediciones para la gráfica de calibración de acrilamida.

Tanto el coeficiente de correlación y su análisis estadístico, como el porcentaje linealidad confirman el comportamiento del ajuste, sin embargo, este comportamiento puede variar a lo largo de rango de concentración, y principalmente en los extremos del mismo. Para discernir tal variación se realiza la aproximación práctica de Huber mediante la representación gráfica de los factores de respuesta $R_{y/x}$, que se derivan de dividir el valor de la señal de HPLC entre su respectiva concentración; y el valor de la concentración de acrilamida (Figura 3.4).

Tabla 3.4: Análisis estadístico del comportamiento lineal en la gráfica de calibración señal vs concentración de acrilamida.

Concentración (ppm)	0,05	0,1	0,5	1,0	2,0
$R_{y/x}$ (ppm^{-1})	5,448	5,597	5,667	5,663	5,664
Mediana de $R_{y/x}$ (ppm^{-1})	5,663				

Por ende, con el análisis desarrollado en la Tabla 3.4, se puede deducir que a valores de concentración superior a 0,05 ppm la tendencia de los factores de respuesta se acerca al valor de su mediana, lo cual indica que a concentraciones de acrilamida en el rango de 0,05 a 2,0 ppm es posible cuantificar e interpolar la concentración de otras muestras.

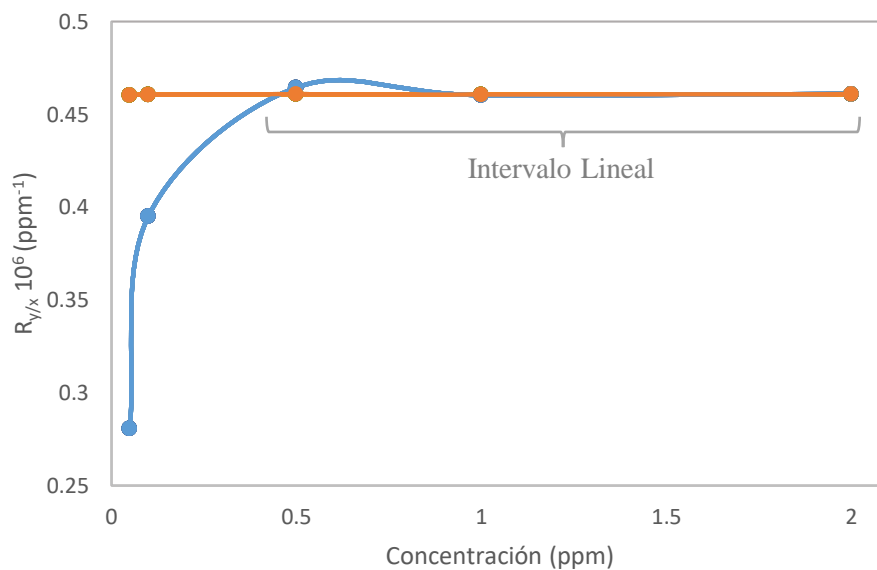


Figura 3.4: Gráfica de aproximación de Huber para estimar el rango de linealidad.

Según las directrices de la Conferencia Internacional sobre Armonización (ICH), para la aceptabilidad de los datos de linealidad se debe corroborar que el gráfico de respuesta frente a la concentración presente un coeficiente de correlación de $> 0,999$. Entonces se puede afirmar que el análisis desarrollado es aceptable ya que presenta un coeficiente de correlación de 0,9999. Además, que como se indica la regresión lineal aplicada a los resultados debe tener un intercepto significativamente diferente a 0, este resultado fue conseguido mediante la evaluación estadística ANOVA, que nos indicó confirmar dicha afirmación y confirmar la linealidad del método desarrollado.

4.2.2. Límite de Detección y Cuantificación

Para especificar la mínima concentración de acrilamida detectable se determina el valor del límite de detección (LOD) (ecuación 2.5) y de cuantificación (LOQ) (ecuación 2.6) que presenta este método de análisis. Con este fin, se asocia la respuesta del blanco (en ausencia de acrilamida) al valor del intercepto “ a ” y su desviación estándar (S_o) muy cercana al valor registrado por el intercepto (S_a).

De esta manera, se determina que el valor de LOD y el LOQ es igual a 0,0133 ppm y 0,0445 ppm, respectivamente. En otros términos, la mínima concentración detectable de acrilamida extraída por solventes es igual a 0,013 ppm y la mínima concentración cuantificable de manera precisa será igual a 0,045 ppm. En concordancia, este último valor es cercano al límite inferior del rango de linealidad de Huber discutido anteriormente.

Tabla 3.5: Límite de detección y cuantificación de la acrilamida según el método de extracción con metanol.

<i>Límite de detección (LD)</i>	0,013 ppm
<i>Límite de cuantificación (LC)</i>	0,045 ppm

Según las recomendaciones de la UE para asegurar la aceptabilidad de los resultados analíticos, se deben elegir métodos que puedan alcanzar un LOQ de hasta $100 \mu\text{g.kg}^{-1}$ (0,05 ppm), lo que certifica que este estudio con un límite de cuantificación de 0,045 ppm es aceptable para el análisis de acrilamida en papas fritas.

4.2.3. Precisión

Como ya se había definido, la precisión es básicamente la dispersión de la medida alrededor de un valor central o medio, cuando el método se aplica repetidamente.

4.2.3.1. Precisión intermedia

Para calcular la precisión intermedia se obtuvo las áreas cromatográficas y las concentraciones en ppm (tabla 3.6) obtenidas en la lectura de un estándar con concentración teórica de 0.8 ppm analizadas en seis días diferentes.

Tabla 3.6: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en días diferentes.

<i>Días</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Area cromatográfica</i>	375012	369892	376504	375985	376021	369957
<i>Concentración (ppm)</i>	0,7947	0,7837	0,7979	0,7968	0,7969	0,7838

Con estos resultados se calculó el coeficiente de variación (ecuación 2.9) y se comparó con el coeficiente de Horwitz (ecuación 2.10) que estima el valor máximo del coeficiente de variación según la concentración teórica del analito usado

Tabla 3.7: Resultados de Precisión intermedia

<i>C.V. Horwitz (%)</i>		
	1-0.5*log C	1,0485
	RSDh / Desviación estándar relativa	2,0483
<i>C.V. (%)</i>		
	Promedio	0,7923
	Desviación estándar (s)	0,0066
	(s) / Promedio	0,6286

Como se puede observar en la tabla 3.7 el valor calculado para el coeficiente de Horwitz es de 2,05%. Respecto al coeficiente de variación el valor hallado fue de 0,85 %, el cual se encuentra por debajo del coeficiente de Horwitz. Estos datos nos permiten aseverar que no hay variación significativa entre los resultados realizados en diferentes días.

4.2.3.2. Repetibilidad

Para calcular la repetibilidad se obtuvo las áreas cromatográficas y las concentraciones en ppm (tabla 3.8) obtenidas de 6 lecturas repetidas en el mismo día de un estándar con concentración teórica de 0.8 ppm analizadas en seis días diferentes.

Tabla 3.8: Áreas cromatográficas y concentración en ppm de 6 muestras de estándar evaluadas en lecturas consecutivas.

<i>Nº Lectura</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>	<i>4</i>	<i>5</i>	<i>6</i>
<i>Area cromatográfica</i>	383334	381714	380760	379668	379345	381510
<i>Concentración (ppm)</i>	0,8371	0,8342	0,8310	0,8297	0,8289	0,8332

Con estos resultados se calculó el coeficiente de variación (ecuación 2.9) y se comparó con el coeficiente de Horwitz para repetibilidad (ecuación 2.11) que estima el valor máximo del coeficiente de variación según la concentración teórica del analito usado.

Como se puede observar en la tabla 3.9 el valor calculado para el coeficiente de Horwitz es de 1,03%. Respecto al coeficiente de variación el valor hallado fue de 0,63 %, el cual se encuentra por debajo del coeficiente de Horwitz. Estos datos nos permiten confirmar que no hay variación significativa entre los resultados realizados.

Tabla 3.9: Resultados de Repetibilidad

<i>C.V. Horwitz (%)</i>		
	1-0.5*log C	1,0485
	RSDh / Desviación estándar relativa	2,0483
	C.V Horwitz	1.0342
<i>C.V. (%)</i>		
	Promedio	0,7923
	Desviación estándar (s)	0,0066
	(s) / Promedio	0,6286

El ICH describe que en una recopilación de datos basada en la obtención de al menos 6 réplicas para la obtención del parámetro de precisión se debe incluir la desviación estándar la cual, no debe ser superior al 2,0%. Lo cual corrobora la aceptabilidad de nuestro método ya que la desviación estándar fue de 0.7% y esta está por debajo de 2.0%.

4.2.4. Exactitud

Para comprobar la exactitud del método se realizó el cálculo del porcentaje de recuperación, para ello se realizó el análisis cromatográfico de una muestra de papas fritas de comida rápida y otra de un estándar conocido como se muestra en la Figura3.5.

Finalmente se realizó el proceso de adición del estándar conocido en el proceso de extracción de la misma muestra; todos estos datos fueron llevados a ppm para calcular el porcentaje de recuperación (Tabla 3.9). (resultados completos reportados en el Anexo 3).

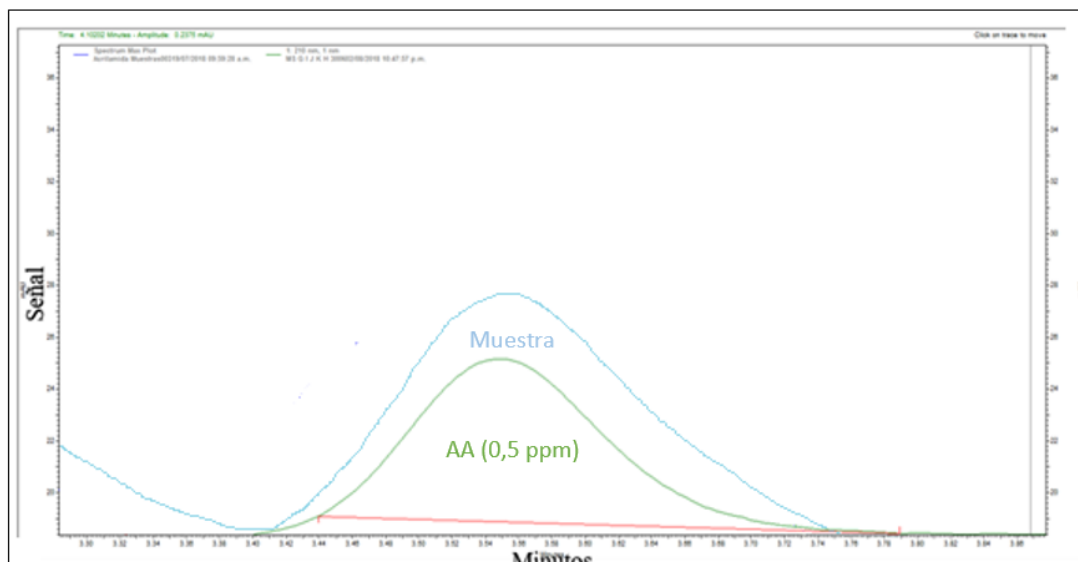


Figura 3.5: Cromatograma ampliado de los picos cromatográficos sobrepuestos de un estándar de acrilamida (0.5 ppm) y una muestra de papas fritas de comida rápida, utilizados para calcular el porcentaje de recuperación.

Tabla 3.10: Porcentaje de recuperación de acrilamida en la muestra a través de la técnica HPLC.

<i>Muestra</i> ^(a)	<i>M+Est.</i> ^(b)	<i>Estándar</i> ^(c)	Δ ^(d)	<i>R%</i> ^(e)
0,835	1,285	0,497	0,450	90,57
0,810	1,281	0,507	0,471	92,81
0,824	1,291	0,507	0,467	92,02
0,827	1,248	0,510	0,421	82,51
0,810	1,275	0,500	0,465	93,14
0,820	1,284	0,496	0,464	93,55
%R promedio				90,77

(a)Concentración en ppm de una muestra de papas fritas de comida rápida

(b)Concentración en ppm de la muestra con adición de Estándar (c)Concentración del Estándar adicionado en ppm

(d) Diferencia de (b)-(a)

(e)Porcentaje de recuperación: $100 \times [(d)/(c)]$

Entonces podemos decir que el método de análisis presenta un porcentaje de recuperación igual a 90,8 %, lo cual es aceptable según los criterios de precisión para un método de adiciones estándar, en el que se indica que la recuperación media 90 - 107 % para muestras menores a 1ppm.

4.3. Resultados de las muestras de acrilamida en las muestras estudiadas

Como se mencionó en la parte de la metodología se optó por realizar el estudio en dos partes, de tal manera que la primera cumplió la función de una prueba piloto que permitió reconocer las mejores condiciones de extracción de cada tipo de papa frita.

Fue así que con las características y mejores condiciones obtenidos en los resultados de la primera parte se procedió al análisis como tal de las muestras de los tres tipos de papas fritas, lo que se desarrolló en la segunda parte del estudio.

Teniendo en cuenta esta premisa, a continuación, se reportará y describirá los resultados de cada una de las partes del análisis de las muestras de acrilamida.

4.3.1. Primera parte:

En la primera parte o prueba piloto se analizó: cuatro muestras de papas fritas de comida rápida del Restaurante A, cuatro muestras de papas fritas caseras y cuatro muestras de papas fritas “Chips”, todas ellas en dos solventes agua y metanol (Met1 y Met2 respectivamente)

En la Tabla 3.11 se muestran las áreas de los picos cromatográficos de acrilamida en las muestras analizadas con agua. Los resultados completos de las áreas cromatográficas se muestran en el Anexo 4.

Tabla 3.11: Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en los tres tipos de papas fritas extraídas en agua

<i>Muestra</i>	<i>M Rest.A</i>	<i>C Caseras</i>	<i>CH “chips”</i>
	153287	-	26080
<i>Área del pico cromatográfico de Acrilamida</i>	141955	-	25105
	152016	-	26445
	152646	-	26450

En la Tabla 3.12 se muestra los resultados del área del pico cromatográfico correspondiente a la acrilamida en las muestras de papas fritas de comida rápida, casera y “chips” en metanol.

Al momento de la extracción de las muestras de papas “chips” con metanol, se observó que dicho solvente interfiere en la separación de fases al momento de centrifugarlas, lo que impidió obtener el sobrenadante de la mezcla para continuar con el proceso de extracción. Por otro lado, las muestras de papas fritas de comida rápida y las caseras no originaron ningún tipo de problema en el proceso de extracción.

Tabla 3.12: Resultados del área del pico cromatográfico de la acrilamida en papas fritas extraída en metanol

<i>Muestra</i>	<i>M Rest.A</i>	<i>C Caseras</i>	<i>CH “chips”</i>
<i>Área del pico cromatográfico de Acrilamida</i>	320584	-	-
	321258	-	-
	318997	-	-
	321620	-	-

Según las condiciones de extracción en metanol y agua, no se pudo comprobar la evidencia de acrilamida en papas caseras (cromatograma desarrollado en Anexo 5). Las muestras de papas fritas de comida rápida se lograron cuantificar con agua y metanol, siendo estas últimas las que obtuvieron mayores valores de área, como se observa en la Figura 3.6. En cuanto a las papas “chips” se encontró mínima y únicamente con agua.

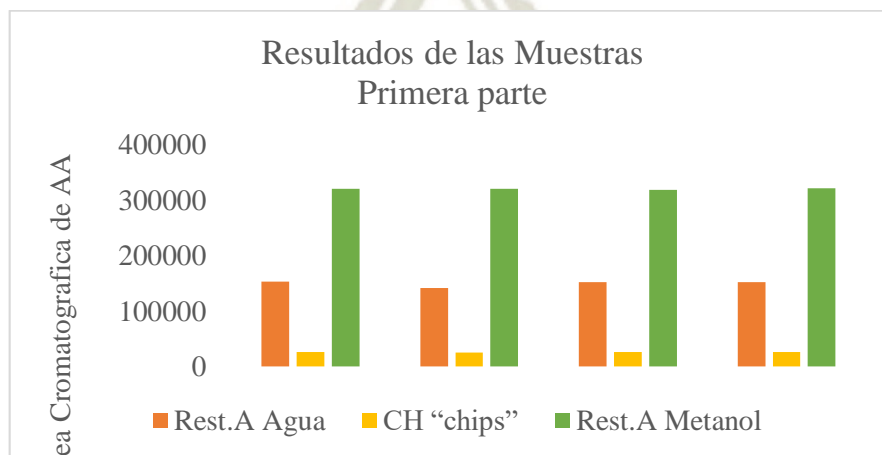


Figura 3.6: Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en los tipos de papas fritas que lograron ser cuantificadas bajo las condiciones de extracción utilizadas.

Las muestras de papas fritas obtenidas de un Restaurante de comida rápida lograron cuantificarse en los dos solventes, lo que nos permitió poder evaluar si existe diferencia significativa según el solvente de extracción, como se demuestra a continuación:

4.3.1.1. Influencia del solvente sobre el proceso de extracción

. Con la intención de discrepar la influencia del solvente sobre la etapa de extracción se realiza un análisis comparativo entre las varianzas en la señal de la acrilamida en papas fritas de comida rápida (Restaurante A) (Tabla 3.13).

Para ello es pertinente observar en la Figura 3.7, el cromatograma de la muestra de comida rápida con dos tipos de solventes de extracción.

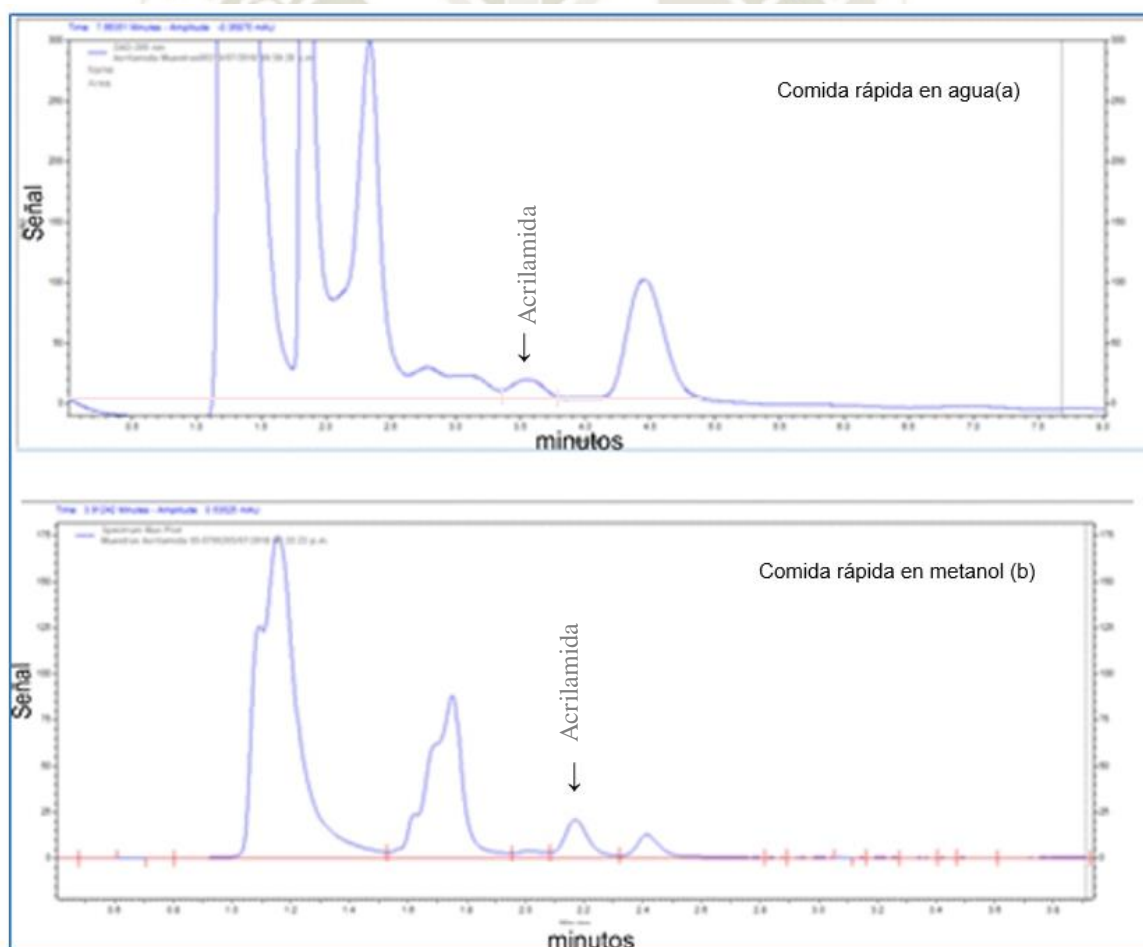


Figura 3.7: Cromatograma de muestras de comida rápida extraídas en (a) agua y (b) metanol.

Tabla 3.13: Concentración de acrilamida en la muestra M extraída por agua (Met1) o metanol (Met2)

<i>Método</i>	Concentración (ppm)			
<i>Extracción en agua, Met1</i>	0,317	0,293	0.315	0,316
<i>Extracción en metanol, Met2</i>	0,678	0,679	0,674	0,679

En este sentido, se aplicó el test de Fisher (Tabla 3.14), para evaluar la precisión y reproducibilidad de la extracción de acrilamida en muestras de papas fritas de comida rápida con metanol (Met2) o agua (Met1).

Tabla 3.14: Análisis estadístico de Fisher para la muestra de papas fritas de comida rápida (Restaurante A) sometida a los métodos de extracción, Met1(agua) y Met2 (metanol).

Prueba F para varianzas de dos muestras		
<i>Extracción</i>	Met1	Met2
<i>Media</i>	0,311	0,678
<i>Varianza</i>	0,001	6,238 E-06
<i>Observaciones</i>	4	4
<i>Grados de libertad</i>	3	3
<i>F</i>	21,419255	
<i>P(F<=f) una cola</i>	0,0157768	
<i>Valor crítico para F (una cola)</i>	9,277	

Cuantitativamente, se observa que Met2 reporta una varianza o error sistemático muy inferior al registrado por Met1. Así mismo, el parámetro estadístico “F”, igual a 21,419, se muestra muy superior al valor crítico ($F_{\text{crítico}} = 9,28$) por lo cual ambos métodos no muestran una precisión similar en la extracción de acrilamida para este tipo de muestras, y que la extracción de acrilamida en muestras de papas fritas de comida rápida con metanol (Met2) es más precisa y reproducible que el método de extracción con agua (Met1).

Con estos resultados se pudo confirmar las condiciones cromatográficas correctas y eficientes para cada tipo de muestra y así poder ampliar el estudio en la segunda parte

4.3.2. Segunda parte:

Según lo observado en la primera parte del estudio, los niveles de acrilamida existen en mayor cantidad en papas fritas de comida rápida extraídas con metanol, por lo tanto, se escogieron 5 diferentes restaurantes de comida rápida de la ciudad de Arequipa (Restaurante A, Restaurante B, Restaurante C, Restaurante D, Restaurante E), se tomaron muestras en seis días diferentes y se escogió el Met2 por demostrar ser más preciso en la extracción de acrilamida en papas fritas de comida rápida.

En el caso de las papas “chips” se cuantificaron 4 muestras, dos de ellas a granel (A granel1 y A granel2) y las otras de marcas conocidas en la ciudad (Marca 1 y Marca 2), utilizando el Met1 de extracción en todas ya que como se mencionó, las papas “chips” únicamente se pueden extraer con agua. Igualmente se tomaron muestras en seis días diferentes.

En cuanto a las papas caseras se analizaron 2 muestras bajo el Met2.

Al realizar el análisis por HPLC de estas muestras se obtuvo áreas de picos cromatográficos de acrilamida, que están descritas en el Anexo 6, estos datos se reemplazaron en la ecuación de la recta y se obtuvo las concentraciones en ppm.

En la Tabla 3.15 se muestra los resultados de la concentración correspondiente de acrilamida en las muestras de papas fritas proveniente de los 5 restaurantes de comida rápida, en la 3.16 las de papas “chips”, por otro lado, se confirmó que con este método no se logró demostrar que existe acrilamida en las muestras de papas fritas caseras.

Tabla 3.15: Concentración de acrilamida en ppm correspondiente a las muestras de papas fritas proveniente de 5 restaurantes de comida rápida

<i>Concentración (ppm)</i>				
<i>M1</i>	<i>M2</i>	<i>M3</i>	<i>M4</i>	<i>M5</i>
<i>Rest.A</i>	<i>Rest.B</i>	<i>Rest.C</i>	<i>Rest.D</i>	<i>Rest. E</i>
0,8353	0,1742	0,2718	0,2271	-
0,8096	0,1821	0,2997	0,2401	-
0,8455	0,1764	0,2727	0,2313	-
0,8275	0,1820	0,2648	0,2287	-
0,8095	0,1705	0,2758	0,2300	-
0,8303	0,1782	0,2721	0,2329	-

Tabla 3.15: Concentración de acrilamida en ppm correspondiente a las muestras de papas fritas “chips” a granel obtenidas de dos mercados y de dos marcas reconocidas.

<i>Concentración (ppm)</i>			
<i>M7</i>	<i>M8</i>	<i>M19</i>	<i>M10</i>
<i>A granel 1</i>	<i>A granel 2</i>	<i>Marca1</i>	<i>Marca2</i>
-	-	-	0,0698
-	-	-	0,0714
-	-	-	0,0679
-	-	-	0,0705
-	-	-	0,0701
-	-	-	0,0703

Con la tabla 3.16 y la Figura 3.8 se puede discernir que las mayores concentraciones de acrilamida fueron encontradas en las muestras de papas fritas de comida rápida, principalmente la del Restaurante A que tiene un promedio de 0,83 ppm y en menor cantidad Restaurante B con un promedio de 0,18 ppm, en cuanto a las papas fritas del Restaurante E con las condiciones cromatográficas de este estudio no se logró demostrar la presencia de acrilamida.

En cuanto a las papas “chips” únicamente se demostró la presencia de acrilamida en la muestra de Marca 2 con un promedio de 0,07 ppm, que notoriamente además de ser la única muestra de su tipo que presenta acrilamida, también tiene una menor concentración comparada con las papas fritas de restaurantes de comida rápida.

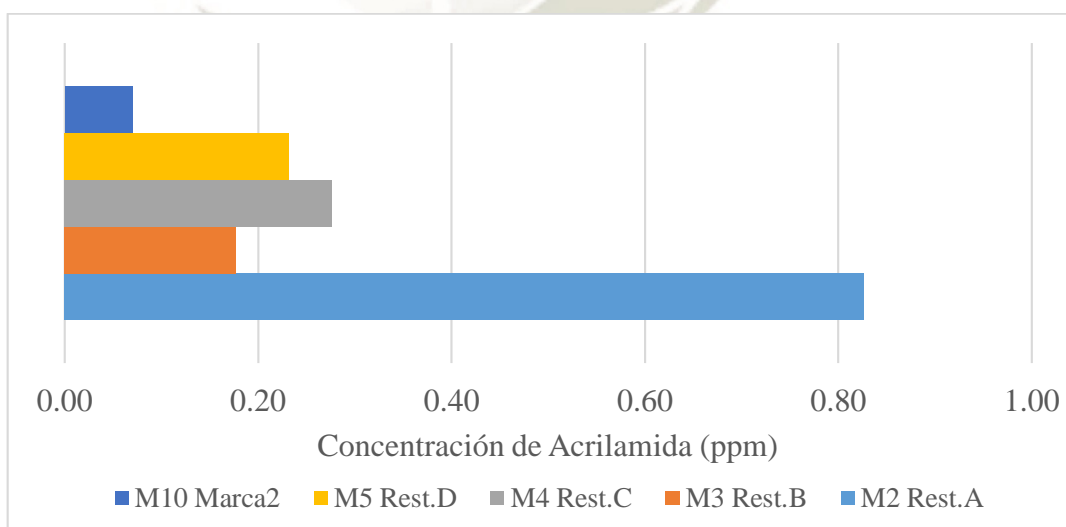


Figura 3.8: Resultados de la concentración de acrilamida en los tipos de papas fritas que lograron ser cuantificadas bajo las condiciones de extracción utilizadas en la segunda parte del estudio.

Tabla 3.16: Resumen de la concentración de acrilamida encontrada en papas fritas de la segunda parte del estudio.

<i>Concentración (ppm)</i>					
<i>Muestra</i>	<i>M2 Rest.A</i>	<i>M3 Rest.B</i>	<i>M4 Rest.C</i>	<i>M5 Rest.D</i>	<i>M10 Marca2</i>
Promedio	0,8263	0,1772	0,2762	0,2317	0,0700

4.1. Comparación con reglamentos internacionales

Según lo expuesto en la sección 1.7, el Reglamento 2158/2017 (Comisión Europea 2017) obliga a los procesadores de alimentos y operadores de negocios alimentarios en Europa a reducir la presencia de acrilamida en sus productos (56).

Se calculó la cantidad de muestras en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de las muestras de papas fritas de Restaurantes (A, B, C, D) y de papas Chips de la Marca2, utilizando la ecuación 3.2.

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (3.2)$$

Dónde:

X = Muestra ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)

A = Muestra (ppm)

B = Volumen de Dilución (10 mL)

C = Peso de la muestra en kg (5g)

Tabla 3.17: Resultados de concentración de acrilamida en las muestras analizadas

<i>Concentración ($\mu\text{g.kg}^{-1}$)</i>				
<i>M1 Rest.A</i>	<i>M2 Rest.B</i>	<i>M3 Rest.C</i>	<i>M4 Rest.D</i>	<i>M10 Marca2</i>
1670,6	387,1	604,0	504,7	155,1
1619,2	404,7	666,0	533,6	158,7
1691,0	392,0	606,0	514,0	150,9
1655,0	404,4	588,4	508,2	156,7
1619,0	378,9	612,9	511,1	155,8
1660,6	396,0	604,7	517,6	156,2

Con los resultados (Tabla 3.17) y los valores que fueron establecidos a un nivel de referencia de $500 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para las papas fritas de comida rápida y $750 \mu\text{g.kg}^{-1}$ para las papas chips (56), se pudo determinar que las muestras analizadas de procedencia de los Restaurantes A, C y D sobrepasan el valor referencial (Figura 3.9), por el contrario las muestras del Restaurante B y de las papas “chips” Marca2 están por debajo de la recomendación. Sin embargo, en las papas chips Marca1 no se pudo demostrar la presencia de acrilamida según el método.

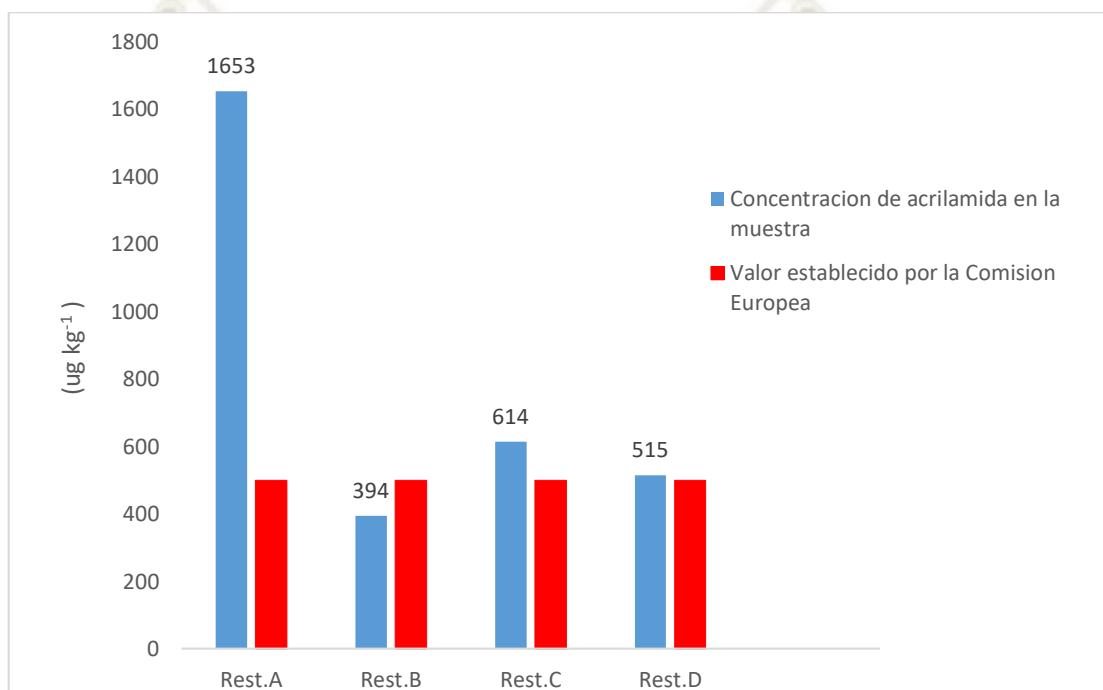


Figura 3.9: Grafica de comparación de los resultados obtenidos con el valor establecido por el Reglamento 2158/2017 (Comisión Europea 2017).

Finalmente es importante mencionar que según la Tabla 4, los resultados de las papas fritas de comida rápida del restaurante A están por encima de los resultados reportados en distintos países, el resto de restaurantes presentan una concentración muy similar a las indicadas en la tabla. Además, igualmente los resultados de los restaurantes, a excepción del restaurante A, están dentro del promedio encontrado en estudios realizados por la EFSA que determina un promedio de entre 308 y $971 \mu\text{g.kg}^{-1}$

En cuanto a las papas fritas chips todos los países (Tabla 1. 4) reportan un valor superior al hallado en este estudio a excepción de Países bajos e que reporta un valor promedio similar ($150 \mu\text{g.kg}^{-1}$)

CONCLUSIONES

Primero:

Se logró desarrollar el método analítico mediante un equipo de cromatografía líquida de alta resolución Merck Hitachi con las siguientes características: una columna R18 Merck Lichrocart, una longitud de onda 200 nm, y con una fase móvil de acetonitrilo y agua acidificada en una relación 2:98; detectando un tiempo de retención de 2,8 minutos para acrilamida.

Segundo:

Se determinó los parámetros para la validación del método de cuantificación de acrilamida en un rango de 0,05 a 2 ppm, obteniendo así una gráfica de calibración que presenta un factor de correlación r de 0,99996, un porcentaje de linealidad de 99,46% con un límite de detección (LD) de 0,013 ppm, un límite de cuantificación (LQ) de 0,045 ppm, para la precisión intermedia y repetibilidad se calculó un C.V% de 0,6%, y un porcentaje de recuperación de 90,8%

Tercero:

Se cuantifico acrilamida en las muestras analizadas encontrando que: las papas fritas de comida rápida tienen una mejor precisión en metanol, así mismo al analizar muestras procedentes de distintos restaurantes se observó la presencia de acrilamida desde $394 \mu\text{g.kg}^{-1}$ hasta $1653 \mu\text{g.kg}^{-1}$, lo que demuestra que existen valores muy por encima de los niveles recomendados en el Reglamento 2158/2017 de la Comisión Europea ($500 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Al analizar papas fritas caseras según las condiciones de extracción y medidas cromatográficas no hay evidencia de acrilamida en estas.

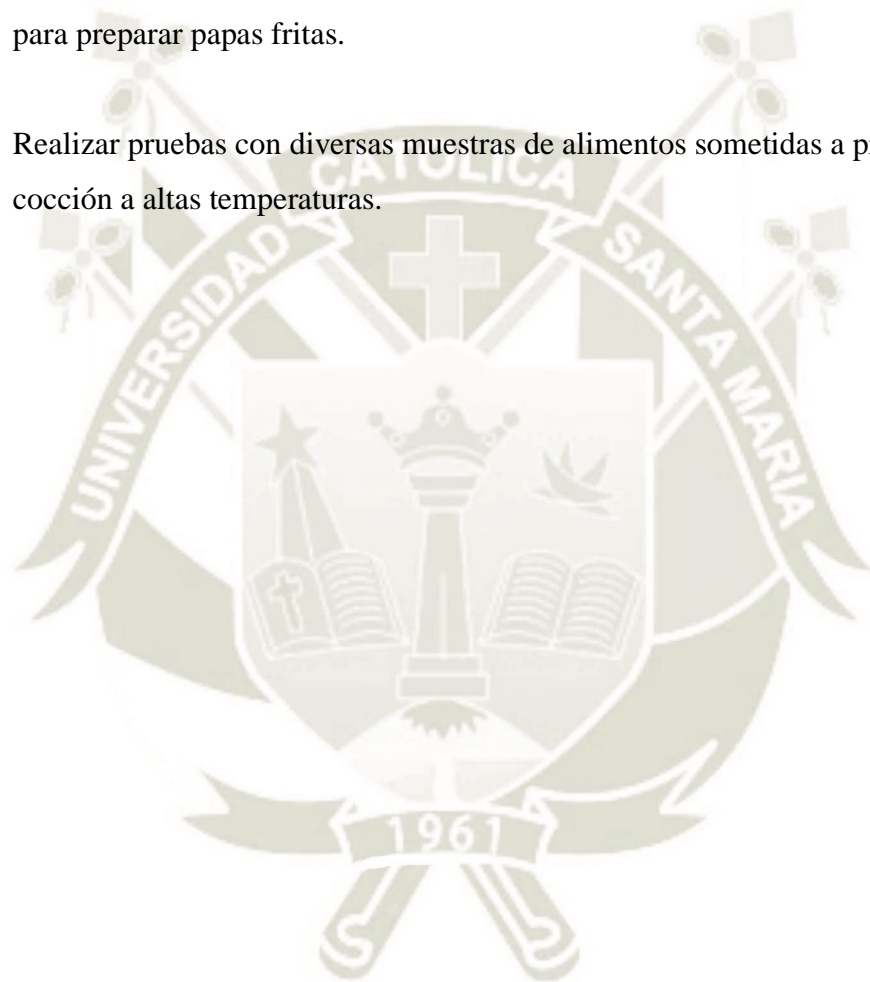
En el análisis de acrilamida a papas fritas “chips” utilizando agua como solvente, se cuantifico en una muestra de marca un valor de $156 \mu\text{g.kg}^{-1}$, el cual es aceptado por los niveles recomendados en el Reglamento de la Comisión Europea ($750 \mu\text{g.kg}^{-1}$).

Cuarto:

Con los resultados hallados se demuestra que estos productos alimenticios efectivamente presentan concentraciones considerables de acrilamida por lo cual podría llegar a ser perjudicial para la salud pública, de modo que es necesario cubrir la calidad de las papas fritas destinadas al consumo de la población.

SUGERENCIAS

1. Proponer la determinación de acrilamida como control de calidad a papas fritas comercializadas en nuestro país.
2. Proponer un estudio para la mitigación de formación de acrilamida, como por ejemplo la inclusión de aditivos capaces de inactivar a la acrilamida en la fórmula para preparar papas fritas.
3. Realizar pruebas con diversas muestras de alimentos sometidas a procedimientos de cocción a altas temperaturas.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. J.J.Vargas, Y.V.Talero, F.A.Trujillo & L.R.Camelo. Acrylamide Determination in the Sugar Cane Juice Process by the Liquid Chromatography Technique. *Rev. Cienc. en Desarro.* **5**, 99–105 (2014).
2. Jiménez, S., Morales, F., Gema, L. & Marti, E. Formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de alimentos. *An. la Real Acad. Ciencias Vet.* **XV**, 195–224 (2007).
3. Eslamizad, S., Kobarfard, F., Tsitsimpikou, C., Tsatsakis, A., Tabib, K. & Yazdanpanah, H. Health risk assessment of acrylamide in bread in Iran using LC-MS/MS. *Food Chem. Toxicol.* **126**, 162–168 (2019).
4. Galuch, M. B., Magon, T. F. S., Silveira, R., Nicácio, A. E., Pizzo, J. S., Bonafe, E. G., Maldaner, L., Santos, O. O. & Visentainer, J. V. Determination of acrylamide in brewed coffee by dispersive liquid–liquid microextraction (DLLME) and ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS). *Food Chem.* **282**, 120–126 (2019).
5. Hu, Q., Xu, X., Fu, Y. & Li, Y. Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review. *Food Control* **56**, 135-146 (2015).
6. Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.* **51(16)**, 4504-4526 (2003).
7. IARC International Agency for Research on Cancer. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. N° 60. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risks Hum.* (1994).
8. [US EPA] US Environmental Protection Agency. *Acrylamide (CASRN 79-06-1)*. Washington (DC): US EPA, Integrated Risk Information System (IRIS). (2001 citado mayo2019) Disponible en :<<https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/f?./temp/~41YJgk:6>>
9. [NICNAS] National Industrial Chemicals Notification and Assessment Scheme. *Acrylamide. Priority Existing Chemical Assessment Report N° 23*. (2002 ;citado mayo 2019) Disponible en:<<https://www.nicnas.gov.au/chemical-information/factsheets/chemical-name/acrylamide>>
10. *Screening Assessment for the Challenge. 2-Propenamide (Acrylamide)*. Chemical Abstracts Service Registry Number 79-06-1. Environment Canada. (2009 ;citado mayo

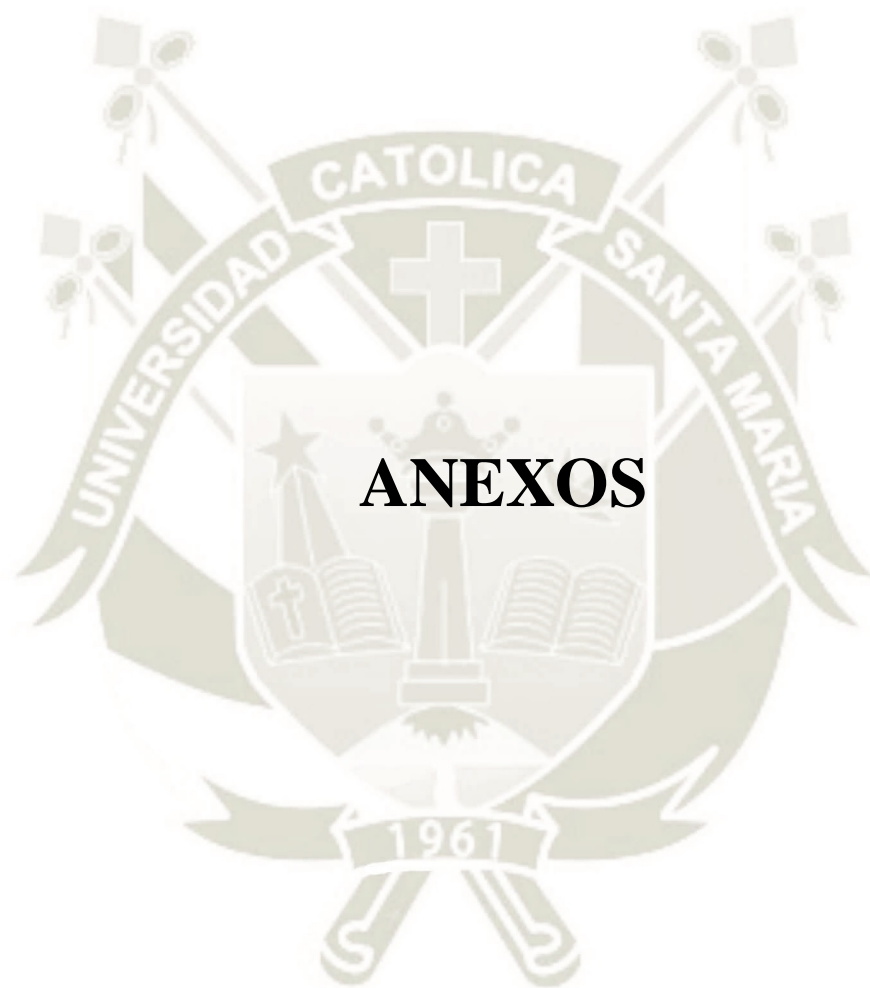
- 2019) Disponible en: <https://www.ec.gc.ca/ese-ees/AD68092D-857E-47FC-9FB9-91810449C249/batch5_79-06-1_en.pdf>
11. Rivadeneyra-Domínguez, E., Becerra-Contreras, Y., Vázquez-Luna, A., Díaz-Sobac, R. & Rodríguez-Landa, J. F. Alterations of blood chemistry, hepatic and renal function, and blood cytometry in acrylamide-treated rats. *Toxicol. Reports* **5**, 1124 -1128 (2018).
 12. Regulation-EC-N° 1272. *Regulation (EC) 1272/2008 - Classification, labelling and packaging of substances and mixtures. Off. J. Eur. Union* (2008).
 13. EFSA. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* **13**, (2015).
 14. Antunes-Rohling, A., Ciudad-Hidalgo, S., Mir-Bel, J., Raso, J., Cebrián, G. & Álvarez, I. Ultrasound as a pretreatment to reduce acrylamide formation in fried potatoes. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **49**, 158-169 (2018).
 15. JECFA. Evaluation of certain contaminants in food. *World Heal. Organ. Tech. Rep. Ser.* (2011).
 16. Elbashir, A. A., Omar, M. M. A., Ibrahim, W. A. W., Schmitz, O. J. & Aboul-Enein, H. Y. Acrylamide Analysis in Food by Liquid Chromatographic and Gas Chromatographic Methods. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **44**(2), 107-41 (2014).
 17. Weisshaar, R. Acrylamide in heated potato products - Analytics and formation routes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106**(11), 786-792 (2004).
 18. Virk-Baker, M. K., Nagy, T. R., Barnes, S. & Groopman, J. Dietary acrylamide and human cancer: A systematic review of literature. *Nutr. Cancer* **66** (5), 774-90 (2014).
 19. *Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex Committee on Food Additives and Contaminants, Discussion Paper on Acrylamide: Thirty-eight Session.* (2006 citado mayo 2019) Disponible en : <http://www.fao.org/tempref/codex/Meetings/CCFAC/CCFAC38/fa38_35s.pdf>
 20. World Health Organization. Health Implications of Acrylamide in Food. Report of a Joint FAO/WHO Consultation WHO Headquarters. Geneva, Switzerland. (2002).
 21. Studer, A., Blank, I. & H Stadler, R. Thermal processing contaminants in foodstuffs and potential strategies of control. *Czech J. Food Sci.* **22**, S1-S10 (2004).
 22. Concepto científico Acrilamida en panela. *Inst. Nac. Salud* (2012 citado mayo 2019) Disponible en: <<https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INS/Conce>>

- pto-acrilamida-panela.pdf>
23. Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A. & Grob, K. Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes. *Mitteilungen aus Leb. und Hyg.* **93**, (2002).
 24. Govaert, Y., Arisseto, A., Van Loco, J., Scheers, E., Fraselle, S., Weverbergh, E., Degroodt, J. M. & Goeyens, L. Optimisation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. *Anal. Chim. Acta* **556 (2)**, 275 -280 (2006).
 25. Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F. & Morales, F. J. Acrylamide content in French fries prepared in food service establishments. *LWT* **100**, 83-91 (2019).
 26. Matthäus, B., Haase, N. U. & Vosmann, K. Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **106 (11)**, 793-801 (2004).
 27. Lorenzo, J. A. Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos. Doctoral Thesis. (2013 citado mayo 2019) Disponible en :<<http://eprints.ucm.es/22281/1/T34594.pdf>>
 28. Wenzl, T., Karasek, L., Rosen, J., Hellenaes, K. E., Crews, C., Castle, L. & Anklam, E. Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and on gas chromatography-mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products. *J. Chromatogr. A.* **1132 (1-2)**, 211-218 (2006).
 29. *Ministry of Health, People's Republic of China. GB/T 5009.204-2005: GC-MS method for determination of acrylamide in food.* (2005).
 30. Albishri, H. M. & El-Hady, D. A. Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta* **118**, 129-136 (2014).
 31. Wang, H., Lee, A. W. M., Shuang, S. & Choi, M. M. F. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchem. J.* **89 (2)**, 90-97 (2008).
 32. Petersson, E. V., Rosén, J., Turner, C., Danielsson, R. & Hellenäs, K. E. Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: An optimisation study. in

- Anal. Chim. Acta* **557 (1-2)**, 287-295 (2006).
33. Eriksson, S. & Karlsson, P. Alternative extraction techniques for analysis of acrylamide in food: Influence of pH and digestive enzymes. *LWT - Food Sci. Technol.* **39 (4)**, 393-399 (2006).
 34. Palazoğlu, T. K. & Gökmen, V. Reduction of acrylamide level in French fries by employing a temperature program during frying. in *J. Agric. Food Chem.* **56 (15)**, 6162-6 (2008).
 35. Takatsuki, S., Nemoto, S., Sasaki, K. & Maitani, T. Determination of Acrylamide in Processed Foods by LC/MS Using Column Switching. *J. Food Hyg. Soc. Japan (Shokuhin Eiseigaku Zasshi)* **44(2)**, 89-95 (2009).
 36. Cheng, W. C., Kao, Y. M., Shih, D. Y. C., Chou, S. S. & Yeh, A. I. Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods. *J. Food Drug Anal.* **17 (3)**, 190-197(2009).
 37. Fernandes, J. O. & Soares, C. Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips. *J. Chromatogr. A* **1175 (1)**, 1-6 (2007).
 38. Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W. & Hartig, L. Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **520 (1-2)**, 207-215 (2004).
 39. Geng, Z., Jiang, R. & Chen, M. Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography. *J. Food Compos. Anal.* **21 (2)**, 178-182 (2008).
 40. Castle, L. & Eriksson, S. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *J. AOAC Int.* **88 (1)**, 274-84(2005).
 41. Paleologos, E. K. & Kontominas, M. G. Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *J. Chromatogr. A* **1077 (2)**, 128-135 (2005).
 42. Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y. & Zhang, Y. Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried foods by gas chromatography with electron capture detector. *J. Chromatogr. A* **1116 (1-2)**, 209-16 (2006).
 43. Dunovská, L., Čajka, T., Hajšlová, J. & Holadová, K. Direct determination of

- acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **578** (2), 234-40 (2006).
44. Marín, J. M., Pozo, Ó. J., Sancho, J. V., Pitarch, E., López, F. J. & Hernández, F. Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels. *J. Mass Spectrom.* . **41** (8), 1041-8 (2006).
 45. Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y. & Ren, Y. An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1142** (2), 194-198 (2007).
 46. Churchwell, M. I., Twaddle, N. C., Meeker, L. R. & Doerge, D. R. Improving LC-MS sensitivity through increases in chromatographic performance: Comparisons of UPLC-ES/MS/MS to HPLC-ES/MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **825** (2), 134-143 (2005).
 47. Bermudo, E., Núñez, O., Puignou, L. & Galceran, M. T. Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis. *J. Chromatogr. A* **1120** (1-2), 199-204 (2006).
 48. Casella, I. G., Pierri, M. & Contursi, M. Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection. *J. Chromatogr. A* **1107** (1-2), 198-203 (2006).
 49. Hu, Q., Xu, X., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., Fu, Y. & Li, Y. Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots. *Biosens. Bioelectron.* **54**, 64-71 (2014).
 50. Preston, A., Fodey, T. & Elliott, C. Development of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for the routine detection of the carcinogen acrylamide in food, via rapid derivatisation pre-analysis. *Anal. Chim. Acta* **608** (2), 178-185 (2008).
 51. Khoshnam, F., Zargar, B., Pourreza, N. & Parhamb, H. Acetone extraction and HPLC determination of acrylamide in potato chips. *J. Iran. Chem. Soc.* **7** (4), 853-858 (2010).
 52. Xu, L., Zhang, L., Qiao, X., Xu, Z. & Song, J. Determination of trace acrylamide in potato chip and bread crust based on SPE and HPLC. *Chromatographia* **75** (5-6), 269-274 (2012).
 53. Heudorf, U., Hartmann, E. & Angerer, J. Acrylamide in children - exposure assessment

- via urinary acrylamide metabolites as biomarkers. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **212** (2), 135-141 (2009).
54. Mesias, M., Delgado-Andrade, C., Holgado, F. & Morales, F. J. Acrylamide content in French fries prepared in households: A pilot study in Spanish homes. *Food Chem.* **260**, 44-52 (2018).
55. Garzón, M. A. G. Evaluación de niveles de acrilamida en alimentos colombianos. (2014 citado mayo 2019) Disponible en : <<https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16060/GarzonBelenoAngelaMaria2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>
56. European Commission (EU) Commission Regulation 2017/2158 of 20 November 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for the reduction of the presence of acrylamide in food. *Off. J. Eur. Union* **L304**, 24–34 (2017).
57. FSA (Food Standards Agency). Acrylamide in the home: Home-cooking practices and acrylamide formation. (2017 citado mayo 2019) Disponible en : <<https://www.food.gov.uk/sites/default/files/media/document/acrylamide-in-home-report.PDF>>
58. Rommens, C. M., Yan, H., Swords, K., Richael, C. & Ye, J. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnol. J.* **6** (8), 843-853 (2008).
59. Quattrocchi, O. A., Abelaira, S. I. & Laba, R. F. *Introducción a la HPLC. Aplicación y práctica. Introd. a la HPLC Apl. y Práctica* (1992).
60. Snyder, L. R., Kirkland, J. J. & Dolan, J. W. *Introduction to Modern Liquid Chromatography. Introd. to Mod. Liq. Chromatogr.* (2010). doi:10.1002/9780470508183
61. García, A. & Yusá, D. *HPLC instrumental*. (2016 citado mayo 2019) Disponible en : <https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/18923b6c-0080-4aab-b237-547a4678e10b/TOC_6234_01_01.pdf?guest=true>
62. Shabir, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis: Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conf. in *J. Chromatogr. A* **987** (1-2), 57-66 (2003).



ANEXO 1 Comisión de debate sobre la Acrilamida, Codex alimentarius

comisión del codex alimentarius S



ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES
UNIDAS PARA LA AGRICULTURA
Y LA ALIMENTACIÓN

ORGANIZACIÓN
MUNDIAL
DE LA SALUD



OFICINA CONJUNTA: Viale delle Terme di Caracalla 00100 ROMA Tel: 39 06 57051 www.codexalimentarius.net Email: codex@fao.org Facsimile: 39 06 5705 4593

Tema 14 (g) del programa

CX/FAC 06/38/35
Marzo de 2006

**PROGRAMA CONJUNTO FAO/OMS SOBRE NORMAS ALIMENTARIAS
COMITÉ DEL CODEX SOBRE ADITIVOS ALIMENTARIOS
Y CONTAMINANTES DE LOS ALIMENTOS**

**38° período de sesiones
La Haya, Países Bajos, 24 – 28 de abril de 2006**

DOCUMENTO DE DEBATE SOBRE LA ACRILAMIDA

(Preparado por el Reino Unido y los Estados Unidos, con la colaboración del Canadá, Noruega, Suecia, Suiza y la Confederación de Industrias Agroalimentarias)

Se ruega a todos los gobiernos y organizaciones internacionales participantes en calidad de observadores ante la Comisión del Codex Alimentarius que deseen hacer observaciones sobre el presente tema, remitirlas **a más tardar el 7 de abril de 2006** a: Contacto del Codex en los Países Bajos, Ministerio de Agricultura, la Naturaleza y la Calidad de los Alimentos, Apdo. Postal 20401, 2500 E.K., La Haya, Países Bajos (Fax: +31.70.378.6141; correo electrónico: info@codexalimentarius.nl, *de preferencia*), con copia para el Secretario de la Comisión del Codex Alimentarius, Programa Conjunto FAO/OMS sobre Normas Alimentarias, Viale delle Terme di Caracalla, 00100 Roma Italia (Fax: +39.06.5705.4593; correo electrónico: Codex@fao.org, *de preferencia*)

ANTECEDENTES

1. El Comité del Codex sobre Aditivos Alimentarios y Contaminantes de los Alimentos (CCFAC) decidió, en su 37° período de sesiones, que se revisara el documento de debate sobre la acrilamida,¹ teniendo en cuenta la evaluación de la 64ª reunión del Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) sobre la acrilamida, las estrategias nacionales de reducción, y la función de la industria alimentaria, los servicios de comidas y a los consumidores. El Comité también decidió que el documento de debate incluyera un proyecto de código de prácticas y un proyecto de documento para iniciar un nuevo trabajo de elaboración del código de prácticas, a fin de presentarlo próximamente a la Comisión.

2. El Comité acordó establecer un grupo de trabajo, dirigido por el Reino Unido y los Estados Unidos, para revisar el documento de debate, tomando en consideración el debate arriba mencionado, a fin de distribuirlo, recabar observaciones y someterlo a consideración en su siguiente reunión.

INTRODUCCIÓN

3. En abril de 2002, unos investigadores de la Administración Nacional de los Alimentos de Suecia (SNFA) y la Universidad de Estocolmo anunciaron que se forma acrilamida en diversos alimentos homeados y fritos, cocinados a elevadas temperaturas.² Desde la publicación del informe sueco se han documentado en muchos otros países resultados parecidos sobre la formación de acrilamida principalmente en alimentos con gran contenido de carbohidratos de origen vegetal, preparados o cocinados a temperaturas elevadas.³⁻⁶

CX/FAC 06/38/35

2

4. En 2002, la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) celebraron una consulta sobre las "Repercusiones para la salud de la presencia de acrilamida en los alimentos", y presentaron una serie de recomendaciones.⁷

5. El descubrimiento de la formación de acrilamida en algunos alimentos cocinados es motivo de preocupación porque la acrilamida probablemente es un carcinógeno humano.⁸ A partir de estudios en animales utilizando grandes dosis, se conoce que la acrilamida es carcinógena y mutágena de las células germinales en los roedores, y posible carcinógena y genotóxica en los seres humanos, además de ser una conocida sustancia neurotóxica en los seres humanos.^{7, 9, 10} En los animales incrementa la frecuencia de una serie de tumores benignos y malignos encontrados en diversos órganos (por ejemplo, en la glándula mamaria, en la *tunica vaginalis*, la tiroides y las adrenales).¹¹

6. En estudios de caso de control realizados en la población no se ha encontrado asociación positiva alguna entre la exposición alimentaria a la acrilamida o fuentes alimentarias y el riesgo de cáncer en diversos órganos, algunos sin relación con los que se han determinado en las ratas.¹² Además, no se ha observado aumento del cáncer en estudios de grupos humanos expuestos a la acrilamida por motivos laborales, con la posible excepción de un incremento de cáncer pancreático.^{3, 14} Sin embargo, los estudios de epidemiología tienen una capacidad limitada para detectar pequeños incrementos en la frecuencia de los tumores y, por lo tanto, la falta de una asociación positiva no es posible tomarlos como prueba de que esta sustancia no pueda producir cáncer en los seres humanos

7. Los estudios realizados hasta ahora indican que la formación de acrilamida es posible en particular en alimentos con alto contenido de carbohidratos cocinados (es decir, homeados o fritos) a temperaturas superiores a unos 120°C.¹⁵⁻¹⁷ No se ha encontrado acrilamida en alimentos hervidos.^{18, 19} Los mecanismos que conducen a la formación de acrilamida no se conocen cabalmente. La mayor parte de la acrilamida presente en los alimentos se forma a través de una reacción química denominada reacción de Maillard y, en particular, a través de la reacción entre el aminoácido asparagina y azúcares reductoras, naturales de los alimentos.²⁰⁻²⁴ Otros precursores que se han indicado como causa de una parte del contenido de acrilamida presente en los alimentos son la 3-aminopropionamida, el ácido acrílico y el amonio.^{25, 26}

TOXICOLOGÍA Y EPIDEMIOLOGÍA

Genotoxicidad y carcinogenicidad

8. El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la acrilamida como "probablemente carcinógena para los seres humanos",⁸ además, el Comité Científico de Alimentación (SCF) de la Unión Europea (UE) la ha calificado como carcinógeno genotóxico.²⁷ En dos estudios de largo plazo con ratas, la acrilamida incrementó la frecuencia de una serie de tumores benignos y malignos en diversos órganos.^{7, 8} La acrilamida también indujo la formación de tumores de pulmón y de la piel en una serie de ensayos biológicos no normalizados sobre carcinogenicidad con ratones.²⁸ Se piensa que la acrilamida es un carcinógeno genotóxico, aunque existen indicios de que otras modalidades de acción podrían contribuir al espectro observado de tumores en las ratas tratadas con acrilamidas, en especial los tumores de los tejidos sensibles a las hormonas.²⁹ No se ha observado incremento del cáncer en seres humanos en contacto con la acrilamida por razones de trabajo, con la posible excepción de un aumento de cáncer de páncreas.^{13, 14}

9. La acrilamida se metaboliza *in vivo* en glicidamida, un epóxido químicamente reactivo que podría explicar la mayor parte de los efectos genotóxicos y carcinógenos observados de la acrilamida. Algunos ejemplos de resultados genotóxicos de la acrilamida son la inducción de mutaciones genéticas y anomalías cromosómicas en células cultivadas *in vitro*,⁸ y mutagenicidad *in vivo* en el estudio Big Blue Mouse con glicidamida y acrilamida.¹²² Tanto la acrilamida como la glicidamida reaccionan con los compuestos nucleófilos a través de la adición de Michael para formar aductos en el ADN (glicidamida) y proteínas (acrilamida y glicidamida). Los aductos de la acrilamida y la glicidamida en la valina N-terminal de la hemoglobina no son tóxicos pero son útiles como marcadores de la exposición *in vivo* a la acrilamida.^{7, 27} Se ha demostrado que se producen tres aductos en el ADN a partir de la exposición *in vivo* a la glicidamida, y se han encontrado otras bases aductadas en reacciones *in vitro* con acrilamida.^{30, 31}

CX/FAC 06/38/35

3

Neurotoxicidad y toxicidad de la reproducción y del desarrollo

10. La neurotoxicidad (debida a la exposición laboral y a otros tipos de exposición no alimentaria y de alto nivel) es el único efecto negativo reconocido de la exposición humana a la acrilamida.⁷ Los estudios laborales que se han realizado no ofrecen información para definir una relación entre dosis y respuesta.⁷ No está claro si los efectos neurotóxicos de la acrilamida se pueden atribuir a la acrilamida misma o a la glicidamida, su metabolito. Tanto la OMS como el SCF concluyeron que no cabía esperar efectos neurotóxicos de los niveles de acrilamida encontrados en los alimentos.^{7,27}

11. Se ha demostrado en estudios con animales que la acrilamida es un tóxico de la reproducción y del desarrollo. Como en el caso de la neurotoxicidad, se cree que los efectos reproductivos y en el desarrollo ocurren con dosis mucho más elevadas de las que aparecen en los alimentos. La Consulta de Expertos de la OMS declaró que el nivel de efectos adversos no observados (NOAEL) correspondiente a las repercusiones en la fertilidad fue cuatro veces mayor que el de neurotoxicidad (neuropatía), y que controlando la neurotoxicidad se controlarían los efectos en la fertilidad.⁷

12. En 2004, un grupo de expertos del Programa nacional de toxicología de los Estados Unidos (NTP) examinó la toxicidad reproductiva y del desarrollo de la acrilamida, y determinó como niveles más bajos con efecto adverso observado (LOAEL) entre 4 y 45 mg/kg pc al día para la toxicidad del desarrollo y toxicidad reproductiva masculina en ratones y ratas. Considerando el bajo nivel de la exposición humana estimada a la acrilamida (comprendida la exposición alimentaria), el grupo de expertos manifestó que el motivo de preocupación por posibles efectos reproductivos y del desarrollo negativos sería insignificante, y mínimo respecto a los efectos hereditarios inducidos por la acrilamida en la población en general.³²

Estudios en curso

13. Están en curso diversos estudios sobre la toxicología de la acrilamida, cuyos detalles figuran en el portal Acrylamide Infonet, de la FAO y la OMS.³³ Como figura en su Plan de acción para la acrilamida en los alimentos,³⁴ la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los Estados Unidos y las organizaciones asociadas están llevando a cabo un conjunto de estudios sobre la acrilamida y la glicidamida. Se han terminado algunos estudios de corto plazo sobre toxicocinética, biodisponibilidad, formación de aductos en el ADN, y presencia de acrilamida en alimento para roedores,³⁵⁻³⁸ pero los resultados de los ensayos sobre carcinogenicidad a largo plazo y una evaluación de la neurotoxicidad del desarrollo no estarán disponibles sino hasta 2008. La evaluación del JECFA solicitada por el CCFAC, por lo tanto, no se finalizará sino hasta que se hayan concluido estos estudios de la carcinogenicidad y neurotoxicidad, y se evalúen sus resultados.

Evaluación del JECFA

14. En la 64ª reunión del JECFA se evaluó la acrilamida y se resumió la información sobre la biodisponibilidad, el metabolismo, la toxicología, la exposición y la formación de la acrilamida.³⁹ El JECFA caracterizó el riesgo carcinogénico de la acrilamida mediante el cálculo de los márgenes de exposición (MOE) entre un límite inferior de la dosis de referencia para los tumores en las glándulas mamarias de las ratas y la ingesta estimada de acrilamida de los consumidores con un consumo promedio (1 µg/kg pc/día) y un consumo elevado (4 µg/kg pc/día) (véase también la sección: Exposición, en este documento). Los márgenes de exposición fueron de 300 para el consumo promedio y 75 para el consumo elevado. El Comité consideró que estos márgenes de exposición son bajos para un compuesto genotóxico y cancerígeno, y concluyó que pueden indicar un peligro para la salud humana.

15. El JECFA también calculó los márgenes de exposición en los resultados neurológicos. Con base en estos márgenes de exposición el Comité afirmó que es poco probable que se produzcan efectos neurológicos negativos con las ingestas estimadas, pero dijo asimismo que no se podía excluir la formación de cambios morfológicos en algunos individuos con ingestas muy elevadas. El JECFA explicó que los estudios en curso sobre neurotoxicidad y efectos en el desarrollo neurológico en las ratas definirán con mayor claridad si pueden producirse efectos a partir de la ingesta a largo plazo de dosis bajas de acrilamida.

CX/FAC 06/38/35

4

16. El JECFA hizo las siguientes recomendaciones: 1) la acrilamida debería evaluarse de nuevo cuando se tengan los resultados de los estudios en curso sobre carcinogenicidad y sobre neurotoxicidad a largo plazo; 2) debería proseguir la elaboración de modelos farmacocinéticos con base farmacológica (PBPK) para asociar mejor los datos de biomarcadores humanos con evaluaciones de la exposición y los efectos toxicológicos en animales de experimentación; 3) se debería seguir tratando de reducir las concentraciones de acrilamida en los alimentos; y 4) sería útil tener datos sobre la presencia de acrilamida en los alimentos que se consumen en los países en desarrollo.

Estudios epidemiológicos

17. El Grupo de Trabajo sobre exposición y biomarcadores del Taller sobre acrilamida en los alimentos de 2004, del Instituto Mixto de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada (JIFSAN), examinó los estudios epidemiológicos disponibles sobre la acrilamida (exposición a través de los alimentos y por motivos laborales). El taller declaró que si bien los estudios disponibles a la fecha no proporcionan datos conclusivos de que exista alguna relación entre la exposición alimentaria a la acrilamida y el riesgo de cáncer, esto no significa necesariamente que dicha relación no exista.¹²

18. El JIFSAN concluyó que los estudios epidemiológicos disponibles no tienen la fuerza estadística necesaria para detectar un riesgo de cáncer por exposición alimentaria a la acrilamida a los niveles indicados por los estudios toxicológicos.¹² Asimismo, el JECFA concluyó que los resultados de los estudios epidemiológicos disponibles que estiman la exposición oral a la acrilamida no son adecuados en la evaluación de riesgos de la acrilamida.³⁹

MÉTODOS ANALÍTICOS

19. Se han utilizado diversos métodos analíticos para cuantificar la acrilamida presente en los alimentos. Los métodos más utilizados se basan en detección mediante cromatografía de gases y espectrometría de masas (análito derivatizado o no derivatizado), cromatografía de gases y espectrometría de masas y cromatografía de líquidos de elevado desempeño combinada con espectrometría de masas, utilizando una norma interna marcada con un isótopo estable.^{40, 41, 82}

20. Acrylamide Infonet, portal de la FAO y la OMS coordinado por el Instituto Mixto de Inocuidad de los Alimentos y Nutrición Aplicada, funciona como recurso mundial e inventario de la investigación en curso sobre la acrilamida en los alimentos.³³ Infonet contiene información (o enlaces de información) sobre diversas metodologías analíticas.

21. Recientemente se examinaron los métodos y la preparación de muestras destinados a medir la acrilamida presente en los alimentos.¹⁴ Este examen contiene información sobre métodos, tomada de artículos revisados por homólogos y de otras fuentes (por ejemplo, un estudio realizado entre laboratorios oficiales y privados de los Estados Miembros de la Unión Europea). Los autores concluyeron que la influencia de las distintas técnicas de extracción o solventes de extracción no se ha investigado plenamente todavía y que los criterios de desempeño de estos métodos deberían verse con ojo crítico.⁴²

22. El Taller sobre la acrilamida en los alimentos, del JIFSAN, examinó el estado de la metodología de la acrilamida hasta abril de 2004.⁴³ Entre las conclusiones a las que llegó el grupo de trabajo sobre metodología analítica están las siguientes: 1) se han tratado prácticamente todas las matrices de interés, pero hay poca información sobre el desempeño de los métodos en una serie de productos; 2) la identificación de los compuestos detectados, como la acrilamida, es fidedigna; 3) los resultados numéricos en general son satisfactorios, de acuerdo a la concentración y la matriz; y 4) se están haciendo con regularidad pruebas de competencia, pero se necesitan materiales certificados de referencia y validación entre laboratorios de los métodos. El grupo de trabajo también determinó los elementos necesarios para garantizar que la metodología se aplique correctamente.⁴⁵

CX/FAC 06/38/35

5

23. El grupo de trabajo sobre la acrilamida, del Centro Común de Investigación (CCI) de la Comisión Europea (CE), sigue estudiando los requisitos de los métodos analíticos. El CCI ha realizado una serie de pruebas de competencia sobre la determinación de la acrilamida en una serie de matrices.⁴² Una prueba reciente con muestras de pan crujiente reveló un desempeño insatisfactorio ($z > 2$) de un 30% de los laboratorios que participaron, en por lo menos una de las cinco muestras analizadas. En el proyecto Heatox de la CE,⁴⁴ el CCI tiene previsto validar dos métodos para determinar el contenido de acrilamida en una selección de matrices de alimentos. El CCI, con el Instituto Alemán de Investigación y Ensayo de Materiales está preparando materiales certificados de referencia para la acrilamida (pan tostado y pan crujiente).⁴²

24. En los Estados Unidos, la Asociación Nacional de Procesadores de Alimentos (NFPA) ha realizado tres pruebas del anillo para evaluar el desempeño analítico de los laboratorios del gobierno y comerciales que llevan a cabo el análisis de la acrilamida. Tanto los laboratorios norteamericanos como los europeos participaron en estas pruebas, en las que estuvieron representados diversos métodos. Los resultados de la última ronda de pruebas, que comprendieron muestras de cereales, manteca de cacahuete, chocolate y café, pueden consultarse en el portal del JIFSAN.⁴³

EXPOSICIÓN ALIMENTARIA

25. Se detectó la presencia de acrilamida en alimentos de elaboración comercial y cocinados en casa. La amplia variedad de alimentos susceptibles a la formación de acrilamida incluyen productos básicos y otros productos importantes para la alimentación.

26. El cuadro 1 resume algunos resultados del análisis de la presencia de acrilamida en los alimentos. Se ha realizado un número limitado de análisis de algunos de estos grupos de alimentos. Se observó una considerable variación en los niveles de acrilamida entre alimentos de algunas categorías determinadas y en lotes de productos elaborados en las mismas condiciones. El cuadro resume los datos producidos desde abril de 2002 de la presencia de la acrilamida, por lo tanto, no necesariamente refleja los niveles actuales de acrilamida en estos productos.

Cuadro 1: Resumen de los niveles documentados de acrilamida en los alimentos

Grupo de alimentos	Grupo de productos alimentarios	Niveles de acrilamida (µg/kg)	
		mínimo	máximo
papas	papas crujientes ^a	117 ⁶	3770 ⁴⁵
	papas fritas o a la francesa ^{b, c}	59 ⁴⁶	5200 ⁴⁷
	papas (crudas)	<10 ⁴⁸	<50 ⁴⁷
	buñuelos de papa y papas desmenuzadas (fritos)	42 ⁴⁵	2779 ⁴⁵
productos de cereales	hojuelas de maíz	120 ⁷	220 ⁶
	productos de panadería y galletas	18 ⁴⁹	3324 ⁴⁵
	pan de jengibre	<20 ⁴⁵	7834 ⁴⁵
	pan	<10 ⁶	130 ⁶
	pan (tostadas)	25 ⁴⁷	1430 ³⁰
	cereales para el desayuno (no para niños pequeños)	11 ⁶	1057 ⁶
	pan crujiente	<30 ²	2838 ⁴⁵
	pasteles y galletas para diabéticos	20 ⁴⁵	3044 ⁴⁵
	palomitas de maíz (dulces y saladas)	57 ⁴⁵	300 ⁴³
	golosinas de ajonjolí	55 ⁴⁵	160 ⁴³
arroz y fideos	fideos fritos	3 ³¹	581 ⁴⁹
	arroz frito	<3 ³¹	67 ³¹
	sopa de fideos instantánea	<3 ³¹	152 ⁶
	galletas de arroz, asadas o fritas	17 ⁴⁹	500 ³²
fruta y hortalizas	aceitunas negras de lata	123 ³³	1925 ⁶
	jugo de ciruela pasa embotellado	53 ³³	267 ⁶
	hortalizas fritas (incluidas las hortalizas para tempura)	34 ⁴⁹	34 ⁴⁹
frutos secos	frutos secos, así como la crema de cacahuete	28 ⁶	339 ⁶

CX/FAC 06/38/35

6

Grupo de alimentos	Grupo de productos alimentarios	Niveles de acrilamida (µg/kg)	
		mínimo	máximo
alimentos compuestos fritos	especialidades asiáticas fritas en aceite abundante: bolas de masa, bollos, buñuelos	<3 ³¹	190 ⁵¹
	aperitivos asiáticos apetitosos y fritos en aceite abundante (lentejas, "mezcla Bombay")	33 ⁴⁵	120 ⁴⁵
pescado y carne	productos de pescado y mariscos, empanados o rebozados	<2 ³⁹	39 ⁷
	productos de carne o avícolas, empanados o rebozados (fritos)	<10 ⁶	64 ⁷
	carne en canal, pollo y pescado (frito)	<5 ¹⁸	52 ¹⁸
productos de cacao	productos de chocolate	<2 ⁴⁶	826 ⁴⁵
	cacao en polvo ^d	<10 ⁶	909 ⁹
bebidas	café (tostado) ^e	45 ⁶	975 ⁴⁵
	sucedáneo del café ^f	116 ⁴⁵	5399 ⁶
	extracto de café, café en polvo ^e	195 ⁴⁵	4948 ⁴⁵
	té tostado (hoji-cha) y té Oolong ^g	<9 ⁵²	567 ⁵²
	granos de cebada tostados (para té)	140 ⁷	578 ⁴⁹
	cerveza	<6 ⁴⁶	<30 ⁵⁰
alimentos para niños pequeños y lactantes	galletas y bizcochos para niños pequeños	<20 ⁴⁵	910 ⁴⁵
	alimentos envasados o enlatados para lactantes	<10 ⁶	121 ⁶

^a Refrigerio de papatas (papas) fritas en cortes finos (en algunas regiones, comprendida América del Norte, se llaman "papas fritas").

^b Productos de papa en cortes más gruesos (llamados papas a la francesa en algunas regiones, comprendida América del Norte, o papas fritas en el Reino Unido).

^c Se han registrado niveles más altos en productos preparados en casa cocidos en exceso, como en la muestra registrada de papas fritas demasiado cocidas que presentó un nivel de acrilamida de 12800.⁴⁷

^d Cacao en polvo para pastelería.

^e Analizado como se vende (como café tostado, instantáneo, extracto de café en polvo) y no preparado para el consumo.

^f No está claro si la muestra que presentó el valor mínimo se analizó como se vendió o preparada para el consumo. La muestra del valor máximo se analizó como se vendía y no preparada para el consumo.

^g El té tostado (té hoji) contuvo entre 519 y 567 µg/g, y el té Oolong tuvo entre <9 y 142 µg/g, respectivamente. Las muestras de té verde, té (negro), y té Pu'er no presentaron niveles de acrilamida detectables e ([<9 µg/g] ni residuos [9 a 30 µg/g]).⁵²

27. Como se resumen en el cuadro 2 (véanse las notas del cuadro), se han realizado algunos estudios para estimar la exposición alimentaria a la acrilamida. Las estimaciones de la ingesta a corto plazo oscilaron entre 0,2 µg/kg pc/día para el consumo promedio a 3,4 µg/kg pc/día para el consumo elevado. Estos niveles se resumen en el cuadro 1. Cabe señalar que se utilizaron diversos métodos para proporcionar los datos sobre la presencia de la acrilamida y los datos sobre el consumo de alimentos, así como para estimar la exposición alimentaria.

Cuadro 2: Resumen del consumo alimentario de acrilamida

País/organización	Ingesta alimentaria estimada de acrilamida (µg/kg pc/día)*
FAO/OMS ⁷	0,3-0,8
UE SCF ²⁷	0,2-0,4
BfR, Alemania ³⁴	1,1-3,4
BAG, Suiza ⁵⁵	0,28
SNT, Noruega ⁵⁶	0,32-1,35
AFSSA, Francia ⁵⁷	0,5-2,9
SNFA, Suecia ^{58,114}	0,45-1,03
NFCS, Países Bajos ⁵⁰	0,48-1,1
Estados Unidos ⁵⁹	0,43-2,31
Reino Unido ⁶⁰	0,3-1,8
JECFA ³⁹	1-4

* Los intervalos incluyen los niveles de exposición de consumo medio y alto, donde se han estimado estos niveles.

ANEXO 2 Reglamento 2158/2017, Comisión Europea 2017

L 304/24

ES

Diario Oficial de la Unión Europea

21.11.2017

REGLAMENTO (UE) 2017/2158 DE LA COMISIÓN

de 20 de noviembre de 2017

por el que se establecen medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos

(Texto pertinente a efectos del EEE)

LA COMISIÓN EUROPEA,

Visto el Tratado de Funcionamiento de la Unión Europea,

Visto el Reglamento (CE) n.º 852/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, relativo a la higiene de los productos alimenticios ⁽¹⁾, y en particular su artículo 4, apartado 4,

Considerando lo siguiente:

- (1) El Reglamento (CE) n.º 852/2004 tiene como objetivo lograr un nivel elevado de protección de los consumidores en relación con la seguridad alimentaria. Define «higiene alimentaria» como un conjunto de medidas y condiciones necesarias para controlar los peligros y garantizar la aptitud para el consumo humano de un producto alimenticio teniendo en cuenta la utilización prevista para dicho producto. Los peligros desde el punto de vista de la seguridad alimentaria tienen lugar cuando los alimentos están expuestos a agentes peligrosos que dan lugar a la contaminación de dichos alimentos. Los peligros alimentarios pueden ser biológicos, químicos o físicos.
- (2) La acrilamida es un contaminante con arreglo a la definición del Reglamento (CEE) n.º 315/93 del Consejo ⁽²⁾ y, como tal, constituye un peligro químico en la cadena alimentaria.
- (3) La acrilamida es un compuesto orgánico de bajo peso molecular y muy soluble en agua, que se forma a partir de asparagina y azúcares, componentes que aparecen de forma natural en determinados alimentos cuando se elaboran a temperaturas generalmente superiores a 120 °C y con bajo nivel de humedad. Se forma principalmente en alimentos ricos en hidratos de carbono, horneados o fritos, con materias primas que contienen sus precursores, como cereales, patatas y granos de café.
- (4) Dado que los niveles de acrilamida en algunos productos alimenticios son considerablemente superiores a los niveles en productos comparables de la misma categoría de productos, en la Recomendación 2013/647/UE de la Comisión ⁽³⁾ se invitó a las autoridades competentes de los Estados miembros a investigar sobre los métodos de producción y transformación utilizados por los explotadores de empresa alimentaria en los casos en que el nivel de acrilamida constatado en un producto alimenticio específico supere los valores indicativos establecidos en el anexo de dicha Recomendación.
- (5) En 2015, la Comisión Técnica Científica de Contaminantes de la Cadena Alimentaria (Contam) de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria («Autoridad») adoptó un dictamen sobre la presencia de acrilamida en los alimentos ⁽⁴⁾. Basándose en estudios con animales, la Autoridad confirma evaluaciones anteriores que constataban que la acrilamida presente en los alimentos puede aumentar el riesgo de padecer cáncer para consumidores de todos los grupos de edad. Dado que la acrilamida está presente en una gran variedad de alimentos cotidianos, esta preocupación es extensible a todos los consumidores, pero los niños son el grupo de edad más expuesto, en función del peso corporal. Sobre la base de los niveles actuales de exposición a través de la alimentación, los posibles efectos nocivos de la acrilamida sobre el sistema nervioso, el desarrollo prenatal y postnatal y la reproducción masculina no se consideraron preocupantes. En cambio, los niveles actuales de exposición a la acrilamida a través de la alimentación en todos los grupos de edad son motivo de preocupación con respecto a sus efectos cancerígenos.
- (6) Habida cuenta de las conclusiones de la Autoridad con respecto a los efectos cancerígenos de la acrilamida y a falta de medidas coherentes y obligatorias que deban aplicar las empresas alimentarias para reducir los niveles de acrilamida, es necesario, mediante el establecimiento de medidas de mitigación apropiadas, garantizar la seguridad alimentaria y reducir la presencia de acrilamida en los productos alimenticios con materias primas que contengan sus precursores. Los niveles de acrilamida pueden reducirse mediante un enfoque de mitigación, como la aplicación de prácticas de higiene correctas y de procedimientos basados en los principios del análisis de peligros y puntos de control crítico (APPCC).

⁽¹⁾ DO L 139 de 30.4.2004, p. 1.

⁽²⁾ Reglamento (CEE) n.º 315/93 del Consejo, de 8 de febrero de 1993, por el que se establecen procedimientos comunitarios en relación con los contaminantes presentes en los productos alimenticios (DO L 37 de 13.2.1993, p. 1).

⁽³⁾ Recomendación de la Comisión 2013/647/UE, de 8 de noviembre de 2013, relativa a la investigación de los niveles de acrilamida en los alimentos (DO L 301 de 12.11.2013, p. 15).

⁽⁴⁾ EFSA Journal 2015; 13(6):4104.

- (7) De conformidad con el artículo 4 del Reglamento (CE) n.º 852/2004, los explotadores de empresa alimentaria deberán seguir los procedimientos necesarios para alcanzar los objetivos fijados de cara a lograr las metas de dicho Reglamento, así como recurrir al muestreo y análisis, según proceda, a fin de mantener sus propios resultados. A ese respecto, la fijación de objetivos, como niveles de referencia, puede servir de orientación para la aplicación de las normas en materia de higiene, al mismo tiempo que garantiza la reducción del nivel de exposición a determinados peligros. Las medidas de mitigación reducirían la presencia de acrilamida en los alimentos. Para comprobar el cumplimiento de los niveles de referencia, debe verificarse la eficacia de las medidas de mitigación mediante muestreo y análisis.
- (8) Por tanto, conviene establecer medidas de mitigación que identifiquen las etapas de transformación de alimentos en las que pueda formarse acrilamida en ellos, así como establecer actuaciones para reducir los niveles de acrilamida en dichos productos alimenticios.
- (9) Las medidas de mitigación expuestas en el presente Reglamento se basan en los actuales conocimientos científicos y técnicos, y se ha demostrado que reducen los niveles de acrilamida sin afectar negativamente a la calidad y la seguridad microbiana del producto. Dichas medidas de mitigación se han establecido a raíz de una amplia consulta a organizaciones que representan a explotadores de empresa alimentaria afectados, consumidores y expertos de las autoridades competentes de los Estados miembros. Si las medidas de mitigación incluyen la utilización de aditivos alimentarios y otras sustancias, los aditivos alimentarios y otras sustancias deben utilizarse de conformidad con su autorización de uso.
- (10) Los niveles de referencia son indicadores de resultados que deben utilizarse para verificar la eficacia de las medidas de mitigación y se basan en la experiencia y la incidencia con respecto a amplias categorías de alimentos. Deben establecerse en el nivel más bajo razonablemente posible con la aplicación de todas las medidas de mitigación pertinentes. Los niveles de referencia deben determinarse teniendo en cuenta los últimos datos de incidencia procedentes de la base de datos de la Autoridad, según los cuales se supone que, en una amplia categoría de alimentos, el nivel de acrilamida entre un 10 y un 15 % de la producción que presenta unos niveles más altos normalmente puede reducirse mediante la aplicación de buenas prácticas. Se reconoce que, en algunos casos, las categorías de alimentos especificadas son amplias y que para determinados alimentos dentro de esas amplias categorías de alimentos, puede haber condiciones de producción, geográficas o estacionales específicas, o características de los productos, para las que no se pueden alcanzar los niveles de referencia aunque se apliquen todas las medidas de mitigación. En tales situaciones, el explotador de la empresa alimentaria debe poder demostrar que aplicó las medidas de mitigación pertinentes.
- (11) La Comisión debe revisar con regularidad los niveles de referencia a fin de establecer niveles más bajos, que reflejen la reducción continua de la presencia de acrilamida en los alimentos.
- (12) Los explotadores de empresa alimentaria que producen productos alimenticios en el ámbito de aplicación del presente Reglamento y que realizan actividades de venta al por menor o suministran directamente solo a establecimientos locales de venta al por menor suelen ser pequeños explotadores. Por tanto, las medidas de mitigación están adaptadas a su forma de funcionar. Sin embargo, los explotadores de empresa alimentaria que formen parte, o sean franquicias, de un funcionamiento interconectado más amplio y a los que se suministre de forma centralizada deben aplicar medidas de mitigación adicionales que sean viables para empresas más grandes, dado que esas medidas reducen aún más la presencia de acrilamida en los alimentos y su aplicación por tales empresas es factible.
- (13) La eficacia de las medidas de mitigación para reducir el contenido de acrilamida debe verificarse mediante muestreo y análisis. Conviene establecer requisitos para el muestreo y análisis que han de llevar a cabo los explotadores de empresa alimentaria. Por lo que se refiere al muestreo, deben fijarse los requisitos analíticos y la frecuencia de muestreo para garantizar que los resultados analíticos obtenidos sean representativos con respecto a su producción. Los explotadores de empresa alimentaria que producen productos alimenticios en el ámbito de aplicación del presente Reglamento y llevan a cabo actividades de venta al por menor o suministran directamente solo a establecimientos al por menor están exentos de la obligación de someter su producción a muestreo y análisis para detectar la presencia de acrilamida, ya que tal requisito supondría una carga desproporcionada para su empresa.
- (14) Además del muestreo y el análisis efectuados por los explotadores de empresas, el Reglamento (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾ exige que los Estados miembros realicen controles oficiales con regularidad a fin de garantizar el cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos. El muestreo y el análisis efectuados por los Estados miembros en el contexto de los controles oficiales deben cumplir los procedimientos de muestreo y los criterios de análisis establecidos de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 882/2004.
- (15) El establecimiento de niveles máximos de acrilamida en determinados alimentos, que es una medida complementaria a las establecidas en el presente Reglamento, debe considerarse conforme con el Reglamento (CEE) n.º 315/93 a partir de la entrada en vigor del presente Reglamento.

(¹) Reglamento (CE) n.º 882/2004 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 29 de abril de 2004, sobre los controles oficiales efectuados para garantizar la verificación del cumplimiento de la legislación en materia de piensos y alimentos y la normativa sobre salud animal y bienestar de los animales (DO L 165 de 30.4.2004, p. 1).

- (16) La aplicación de las medidas de mitigación por los explotadores de empresa alimentaria podría comportar cambios en su actual proceso de producción, por lo que conviene establecer un período transitorio antes de que las medidas previstas en el presente Reglamento sean aplicables.
- (17) Las medidas previstas en el presente Reglamento se ajustan al dictamen del Comité Permanente de Vegetales, Animales, Alimentos y Piensos.

HA ADOPTADO EL PRESENTE REGLAMENTO:

Artículo 1

Ámbito de aplicación

1. Sin perjuicio de las disposiciones aplicables del Derecho de la Unión en el ámbito alimentario, los explotadores de empresa alimentaria que produzcan y comercialicen productos alimenticios enumerados en el apartado 2 aplicarán, de conformidad con el artículo 2, las medidas de mitigación que se exponen en los anexos I y II, a fin de lograr niveles de acrilamida que sean los más bajos razonablemente posibles e inferiores a los niveles de referencia que figuran en el anexo IV.
2. Los productos alimenticios a los que se hace referencia en el apartado 1 son:
- patatas fritas, otros productos cortados fritos y patatas fritas a la inglesa (*chips*) fabricadas con patatas frescas;
 - patatas fritas a la inglesa (*chips*), productos de aperitivo, galletas saladas y otros productos a base de masa de patatas;
 - pan;
 - cereales para el desayuno (a excepción del *porridge*);
 - productos de bollería, pastelería, repostería y galletería; galletas, biscotes, barritas de cereales, *scones*, cucuruchos, barquillos, panecillos de levadura y pan de especias, así como galletas saladas, panes crujientes y sucedáneos de pan; en esta categoría, una galleta salada es una galleta seca (un producto horneado a base de harina de cereales);
 - café:
 - café tostado,
 - café instantáneo (soluble);
 - sucedáneos del café;
 - alimentos infantiles y alimentos elaborados a base de cereales destinados a lactantes y niños de corta edad, tal como se definen en el Reglamento (UE) n.º 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾.

Artículo 2

Medidas de mitigación

1. Los explotadores de empresa alimentaria que produzcan y comercialicen productos alimenticios enumerados en el artículo 1, apartado 2, aplicarán las medidas de mitigación establecidas en el anexo I.
2. No obstante lo dispuesto en el apartado 1, los explotadores de empresa alimentaria que produzcan productos alimenticios enumerados en el artículo 1, apartado 2, y realicen actividades al por menor o suministren directamente solo a establecimientos locales de venta al por menor aplicarán las medidas de mitigación establecidas en la parte A del anexo II.
3. Los explotadores de empresa alimentaria mencionados en el apartado 2 que operen en instalaciones bajo control directo y en el marco de una marca o licencia comercial, como parte o franquicia de un funcionamiento interconectado más amplio, siguiendo las instrucciones del explotador de empresa alimentaria que suministra de forma centralizada los productos alimenticios mencionados en el artículo 1, apartado 2, aplicarán las medidas de mitigación adicionales que figuran en la parte B del anexo II.
4. Cuando se superen los niveles de referencia, los explotadores de empresa alimentaria revisarán las medidas de mitigación aplicadas y adaptarán los procedimientos y los controles, a fin de alcanzar niveles de acrilamida que sean los más bajos razonablemente posibles e inferiores a los niveles de referencia que figuran en el anexo IV. Los explotadores de empresa alimentaria deberán tener en cuenta la seguridad de los productos alimenticios, las condiciones geográficas y de producción específicas o las características del producto.

⁽¹⁾ Reglamento (UE) n.º 609/2013 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 12 de junio de 2013, relativo a los alimentos destinados a los lactantes y niños de corta edad, los alimentos para usos médicos especiales y los sustitutivos de la dieta completa para el control de peso y por el que se derogan la Directiva 92/52/CEE del Consejo, las Directivas 96/8/CE, 1999/21/CE, 2006/125/CE y 2006/141/CE de la Comisión, la Directiva 2009/39/CE del Parlamento Europeo y del Consejo y los Reglamentos (CE) n.º 41/2009 y (CE) n.º 953/2009 de la Comisión (DO L 181 de 29.6.2013, p. 35).

*Artículo 3***Definiciones**

A efectos del presente Reglamento, serán de aplicación las definiciones siguientes:

- 1) las definiciones de «alimento», «explotador de empresa alimentaria», «comercio al por menor», «comercialización» y «consumidor final» establecidas en los artículos 2 y 3 del Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾;
- 2) se entiende por «niveles de referencia» los indicadores de resultados utilizados para verificar la eficacia de las medidas de mitigación; se basan en la experiencia y la incidencia con respecto a amplias categorías de alimentos.

*Artículo 4***Muestreo y análisis**

1. Los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartado 1, elaborarán un programa para su propio muestreo y análisis de los niveles de acrilamida en los productos alimenticios enumerados en el artículo 1, apartado 2.
2. Los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartado 1, llevarán un registro de las medidas de mitigación expuestas en el anexo I que hayan aplicado.
3. Los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartado 3, llevarán un registro de las medidas de mitigación expuestas en las partes A y B del anexo II que hayan aplicado.
4. Los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartados 1 y 3, realizarán un muestreo y análisis para determinar el nivel de acrilamida en los productos alimenticios de conformidad con los requisitos que figuran en el anexo III y registrarán los resultados del muestreo y análisis.
5. Si los resultados del muestreo y el análisis indican que los niveles no están por debajo de los niveles de referencia de acrilamida que figuran en el anexo IV, los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartados 1 y 3, revisarán sin demora las medidas de mitigación de conformidad con el artículo 2, apartado 4.
6. No obstante lo dispuesto anteriormente, el presente artículo no es aplicable a los explotadores de empresa alimentaria a los que se refiere el artículo 2, apartado 2. Dichos explotadores de empresa alimentaria deberán estar en condiciones de aportar pruebas de la aplicación de las medidas de mitigación expuestas en la parte A del anexo II.

*Artículo 5***Revisión de los niveles de acrilamida**

Cada tres años y por primera vez en un plazo de tres años a partir de la fecha de comienzo de la aplicación del presente Reglamento, la Comisión revisará los niveles de referencia relativos a la presencia de acrilamida en los productos alimenticios que figuran en el anexo IV.

La revisión de los niveles de referencia deberá basarse en los datos sobre incidencia de acrilamida que correspondan al período de revisión, procedan de la base de datos de la Autoridad y hayan sido facilitados a dicha base de datos por autoridades competentes y explotadores de empresas alimentarias.

*Artículo 6***Entrada en vigor y aplicación**

El presente Reglamento entrará en vigor a los veinte días de su publicación en el *Diario Oficial de la Unión Europea*.

Será aplicable a partir del 11 de abril de 2018.

⁽¹⁾ Reglamento (CE) n.º 178/2002 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 28 de enero de 2002, por el que se establecen los principios y requisitos generales de la legislación alimentaria, se crea la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria y se fijan procedimientos relativos a la seguridad alimentaria (DO L 31 de 1.2.2002, p. 1).

ANEXO I

MEDIDAS DE MITIGACIÓN A LAS SE REFIERE EL ARTÍCULO 2, APARTADO 1

En caso de que las medidas de mitigación del presente anexo incluyan la utilización de aditivos alimentarios y otras sustancias, los aditivos alimentarios y otras sustancias se utilizarán conforme a lo dispuesto en los Reglamentos (CE) n.º 1332/2008 ⁽¹⁾, (CE) n.º 1333/2008 ⁽²⁾ del Parlamento Europeo y del Consejo y en el Reglamento (UE) n.º 231/2012 de la Comisión ⁽³⁾.

I. PRODUCTOS A BASE DE PATATA CRUDA

Selección de variedades de patata adecuadas

1. Los explotadores de empresa alimentaria (en lo sucesivo, «EEA») deberán identificar y utilizar variedades de patata que sean adecuadas para el tipo de producto y en las que el contenido de precursores de acrilamida, como azúcares reductores (fructosa y glucosa) y asparagina, sea el más bajo con respecto a las condiciones regionales.
2. Los EEA utilizarán variedades de patata que hayan sido almacenadas en las condiciones que sean aplicables a la variedad de patata específica y durante el período de almacenamiento determinado para la variedad específica. Las patatas almacenadas se utilizarán en condiciones de conservación óptimas.
3. Los EEA identificarán las variedades de patata con menor potencial de formación de acrilamida durante el cultivo, el almacenamiento y la transformación de los alimentos. Los resultados deberán documentarse.

Criterios de aceptación

1. Los EEA deberán especificar, en sus acuerdos sobre suministro de patatas, el contenido máximo de azúcares reductores en las patatas, así como la cantidad máxima de patatas dañadas o manchadas.
2. Si se superan el contenido especificado de azúcares reductores en las patatas, así como la cantidad de patatas dañadas o manchadas, los EEA podrán aceptar el suministro de patatas especificando las medidas de mitigación adicionales de que disponen para garantizar que la presencia de acrilamida en el producto final sea lo más baja razonablemente posible e inferior al nivel de referencia que figura en el anexo IV.

Almacenamiento y transporte de patatas

1. En caso de que los EEA exploten sus propias instalaciones de almacenamiento:
 - la temperatura deberá ser apropiada para la variedad de patata almacenada y superior a 6 °C,
 - el nivel de humedad deberá ser tal que se reduzca al mínimo el endulzamiento senescente,
 - la brotación en las patatas almacenadas a largo plazo se suprimirá cuando ello esté permitido, utilizando agentes adecuados,
 - durante el almacenamiento se someterá a ensayo el nivel de azúcares reductores en las patatas.
2. Se hará un seguimiento de los lotes de patatas para comprobar los azúcares reductores en el momento de su recolección.
3. Los EEA deberán especificar las condiciones de transporte de las patatas en cuanto a temperatura y duración, especialmente si las temperaturas exteriores son notablemente inferiores al régimen de temperaturas aplicado durante el almacenamiento, a fin de garantizar que la temperatura durante su transporte no sea inferior al régimen de temperaturas aplicado durante el almacenamiento. Estas especificaciones deberán documentarse.

⁽¹⁾ Reglamento (CE) n.º 1332/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre enzimas alimentarias y por el que se modifican la Directiva 83/417/CEE del Consejo, el Reglamento (CE) n.º 1493/1999 del Consejo, la Directiva 2000/13/CE, la Directiva 2001/112/CE del Consejo y el Reglamento (CE) n.º 258/97 (DO L 354 de 31.12.2008, p. 7).

⁽²⁾ Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 16 de diciembre de 2008, sobre aditivos alimentarios (DO L 354 de 31.12.2008, p. 16).

⁽³⁾ Reglamento (UE) n.º 231/2012 de la Comisión, de 9 de marzo de 2012, por el que se establecen especificaciones para los aditivos alimentarios que figuran en los anexos II y III del Reglamento (CE) n.º 1333/2008 del Parlamento Europeo y del Consejo (DO L 83 de 22.3.2012, p. 1).

a) **PATATAS FRITAS A LA INGLESA (CHIPS)**

Diseño de recetas y procesos

1. En cada diseño del producto, los EEA especificarán las temperaturas del aceite para freír al salir de la freidora. Tales temperaturas deberán ser tan bajas como sea factible en una línea específica y para el producto específico, de conformidad con las normas de calidad y seguridad alimentaria y teniendo en cuenta factores pertinentes, como el fabricante de la freidora, el tipo de freidora, la variedad de patata, los sólidos totales, el tamaño de las patatas, las condiciones de cultivo, el contenido de azúcar, la estacionalidad y el contenido de humedad marcado como objetivo para el producto.
2. En caso de que las temperaturas del aceite para freír al salir de la freidora sean superiores a 168 °C como consecuencia de un producto, diseño o tecnología específicos, los EEA proporcionarán datos que demuestren que el nivel de acrilamida en el producto acabado es el más bajo razonablemente posible y que se alcanza el nivel de referencia que figura en el anexo IV.
3. En cada diseño del producto, los EEA deberán especificar el contenido de humedad después de la fritura, que deberá fijarse al nivel más alto que sea factible para cada línea de producción específica y cada producto específico, de conformidad con las normas de calidad y seguridad alimentaria previstas y teniendo en cuenta factores pertinentes, como la variedad de patata, la estacionalidad, el tamaño del tubérculo y la temperatura a la salida de la freidora. El contenido mínimo de humedad no deberá ser inferior al 1,0 %.
4. Después de la fritura, los EEA someterán las patatas fritas a la inglesa (*chips*) a una selección por color en línea (manual u óptica por medios electrónicos).

b) **PATATAS FRITAS Y OTROS PRODUCTOS CORTADOS, FRITOS U HORNEADOS, A BASE DE PATATAS**

Diseño de recetas y procesos

1. Antes de ser utilizadas, las patatas serán sometidas a ensayo para comprobar los azúcares reductores. Esto puede hacerse con un ensayo al freír, utilizando colores como indicador del potencial para reducir en gran medida el contenido de azúcares reductores: ensayo al freír indicativo de 20-25 tiras cortadas del centro de la patata, que se fríen para comparar los colores de fritura de las tiras con respecto a la especificación del color de la patata utilizando un gráfico de colores USDA Munsell, o gráficos calibrados específicos para empresas y destinados a pequeños explotadores. Otra posibilidad es medir el color de fritura final global mediante equipos específicos (por ejemplo, Agtron).
2. Los EEA eliminarán los tubérculos inmaduros que tengan poco peso bajo agua y elevados niveles de azúcares reductores. La eliminación puede hacerse pasando los tubérculos por salmuera o por sistemas similares que hagan flotar los tubérculos inmaduros, o sometiendo las patatas a un prelavado para detectar los tubérculos en mal estado.
3. Los EEA eliminarán los trozos finos inmediatamente después del corte para evitar que haya trocitos quemados en el producto final cocinado.
4. Los EEA escaldarán las tiras de patata para eliminar algunos de los azúcares reductores de la parte exterior de las tiras.
5. Los EEA adaptarán los regímenes de escaldado a los atributos de calidad específicos de las materias primas entrantes y se mantendrán dentro de los límites especificados para el color del producto acabado.
6. Los EEA evitarán que se produzca una decoloración (enzimática) y el oscurecimiento de los productos a base de patatas después de haber sido cocinados. Esto puede hacerse aplicando difosfato disódico (E 450), que también reduce el pH del agua de lavado e inhibe la reacción por la que se produce una coloración tostada.
7. Deberá evitarse el uso de azúcares reductores como agente para obtener una coloración tostada. Solo podrán usarse en caso necesario, a fin de mantenerse sistemáticamente dentro de los límites especificados. Los EEA controlarán el color del producto final mediante la realización de comprobaciones del color en el producto final cocinado. En caso necesario después del escaldado, la adición controlada de dextrosa permite cumplir la especificación del color del producto acabado. La adición controlada de dextrosa después del escaldado da lugar a unos niveles de acrilamida más bajos en el producto final cocinado, con el mismo color que se observa en los productos no escaldados que solo tienen azúcares reductores acumulados de forma natural.

Información para los usuarios finales

1. Los EEA deberán indicar a los usuarios finales los métodos recomendados para cocinar, especificando el tiempo, la temperatura y la cantidad para el horno, la freidora o la sartén, ya sea en el envase o embalaje, o a través de otros canales de comunicación. Las instrucciones de cocción recomendadas a los consumidores deberán exponerse claramente en todos los envases o embalajes de los productos, de conformidad con el Reglamento (CE) n.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo ⁽¹⁾, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor.

Los métodos de cocción recomendados deberán ser conformes con las especificaciones para los clientes y los requisitos para los usuarios finales profesionales, y deberán estar validados por tipo de producto, a fin de garantizar que los productos tengan una calidad sensorial óptima con el color aceptable más claro, por método de cocción especificado (por ejemplo, en freidora o en horno) y presenten niveles de acrilamida inferiores al nivel de referencia fijado en el anexo IV.

Los EEA recomendarán a los usuarios finales distintos de los consumidores que tengan herramientas a disposición de los operadores (por ejemplo, cocineros) para garantizar buenos métodos de cocción, así como que dispongan de un equipo calibrado (por ejemplo, temporizadores, curvas de fritura, gráficos de clasificación por colores (por ejemplo, USDA o Munsell) y, como mínimo, imágenes claras con los colores que se pretenden obtener en los productos elaborados finales.

2. En particular, los EEA recomendarán a los usuarios finales:
 - mantener la temperatura entre 160 y 175 °C al freír, y entre 180 y 220 °C cuando se utilice el horno; puede utilizarse una temperatura más baja si está encendido el ventilador,
 - precalentar el aparato para cocinar (por ejemplo, un horno o una freidora sin aceite) a una temperatura adecuada de entre 180 y 220 °C, siguiendo las instrucciones de cocción del envase o embalaje, en función de las especificaciones de los productos y de las necesidades locales,
 - cocinar las patatas hasta que estén doradas,
 - no cocinarlas demasiado,
 - dar la vuelta a los productos en el horno una vez que hayan transcurrido diez minutos, o a la mitad del tiempo total de cocción,
 - seguir las instrucciones de cocción recomendadas que facilite el fabricante,
 - al preparar cantidades de patatas inferiores a las indicadas en el envase o embalaje, reducir el tiempo de cocción a fin de evitar que el producto se tueste demasiado,
 - no llenar en exceso la cesta para freír, sino solo hasta la marca de la mitad a fin de evitar que se absorba demasiado aceite cuando el tiempo de fritura sea prolongado.

II. PATATAS FRITAS A LA INGLESA (CHIPS), PRODUCTOS DE APERITIVO, GALLETAS SALADAS Y OTROS PRODUCTOS A BASE DE MASA DE PATATAS

Materias primas

1. Los EEA especificarán, para cada producto, valores objetivo con respecto a los azúcares reductores en sus ingredientes a base de patatas deshidratadas.
2. El valor objetivo de azúcares reductores en los productos en cuestión deberá ser el más bajo que sea factible, teniendo en cuenta todos los factores pertinentes en el diseño y la producción del producto acabado, como la cantidad de ingredientes a base de patatas en la receta del producto, las posibles medidas de mitigación adicionales, el tratamiento posterior de la masa, la estacionalidad y el contenido de humedad en el producto acabado.
3. En caso de que el contenido de azúcares reductores sea superior al 1,5 %, los EEA proporcionarán datos que demuestren que el nivel de acrilamida en el producto acabado es el más bajo razonablemente posible e inferior al nivel de referencia que figura en el anexo IV.

Diseño de recetas y procesos

1. Los ingredientes a base de patatas deshidratadas serán analizados antes de su utilización, ya sea por el proveedor o por el usuario, a fin de confirmar que el contenido de azúcar no supere el nivel especificado.

⁽¹⁾ Reglamento (UE) n.º 1169/2011 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 25 de octubre de 2011, sobre la información alimentaria facilitada al consumidor y por el que se modifican los Reglamentos (CE) n.º 1924/2006 y (CE) n.º 1925/2006 del Parlamento Europeo y del Consejo, y por el que se derogan la Directiva 87/250/CEE de la Comisión, la Directiva 90/496/CEE del Consejo, la Directiva 1999/10/CE de la Comisión, la Directiva 2000/13/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, las Directivas 2002/67/CE y 2008/5/CE de la Comisión, y el Reglamento (CE) n.º 608/2004 de la Comisión (DOL 304 de 22.11.2011, p. 18).

2. En caso de que los ingredientes a base de patatas deshidratadas superen el nivel de azúcar especificado, los EEA especificarán las medidas de mitigación adicionales que deben adoptarse para garantizar que el nivel de acrilamida en el producto final sea el más bajo razonablemente posible e inferior al nivel de referencia que figura en el anexo IV.
3. Los EEA revisarán, para cada producto, si es posible sustituir parcialmente ingredientes a base de patatas por ingredientes con menor potencial para formar acrilamida.
4. En los sistemas a base de masa de patatas húmeda, en la medida de lo posible los EEA tendrán en cuenta el uso de las siguientes sustancias, teniendo en cuenta que pueden no ser sinérgicas en su efecto de mitigación, lo cual es aplicable específicamente al uso de asparaginasa y a la reducción de los niveles de pH:
 - asparaginasa,
 - ácidos o sus sales (para reducir el nivel de pH de la masa),
 - sales de calcio.
5. En caso de que se fríen las patatas fritas a la inglesa (*chips*), los productos de aperitivo o las galletas saladas a base de masa de patatas, los EEA especificarán, para cada producto, la temperatura del aceite de freír al salir de la freidora, controlarán dichas temperaturas y llevarán registros para demostrar los controles.
6. La temperatura del aceite al salir de la freidora deberá ser tan baja como sea factible en una línea específica y para el producto específico, de conformidad con las normas prescritas de calidad y seguridad alimentaria y teniendo en cuenta factores pertinentes como el fabricante de la freidora, el tipo de freidora, el contenido de azúcar y el contenido de humedad marcado como objetivo para el producto.

En caso de que la temperatura sea superior a 175 °C al salir de la freidora, los EEA facilitarán datos que demuestren que el nivel de acrilamida en el producto acabado es inferior al nivel de referencia especificado en el anexo IV.

(Nota: La mayoría de los *pellets* se fríen a temperaturas superiores a 175 °C, debido a que su fritura es muy breve y a las temperaturas que se precisan para conseguir la expansión y la textura necesarias para estos productos).

7. En caso de que se horneen las patatas fritas a la inglesa (*chips*), los productos de aperitivo o las galletas saladas a base de masa de patatas, los EEA especificarán, para cada producto, la temperatura de cocción al salir del horno y llevarán registros para demostrar los controles.
8. La temperatura al salir del horno de cocción o del proceso de desecación deberá ser tan baja como sea factible en una línea específica y para el producto específico, de conformidad con las normas previstas de calidad y seguridad alimentaria y teniendo en cuenta factores pertinentes como el tipo de máquina, el contenido de azúcares reductores de la materia prima y el contenido de humedad del producto.
9. En caso de que la temperatura del producto sea superior a 175 °C al final del proceso de cocción/desecado, los EEA facilitarán datos que demuestren que el nivel de acrilamida en el producto acabado es inferior al nivel de referencia especificado en el anexo IV.
10. En cada producto, los EEA deberán especificar el contenido de humedad después de la fritura o la cocción, que deberá fijarse al nivel más alto factible para cada línea de producción específica y para cada producto específico, de conformidad con los requisitos de calidad y seguridad alimentaria y teniendo en cuenta la temperatura al salir de la freidora, así como la de cocción y la de desecado. El contenido de humedad en el producto final no será inferior al 1,0 %.

III. PRODUCTOS DE BOLLERÍA, PASTELERÍA, REPOSTERÍA Y GALLETERÍA

Las medidas de mitigación que figuran en el presente capítulo son aplicables a los productos de bollería, pastelería, repostería y galletería, como galletas, biscotes, barritas de cereales, *scones*, cucuruchos, barquillos, panecillos de levadura y pan de especias, así como productos sin edulcorantes, como galletas saladas, panes crujientes y sucedáneos de pan. En esta categoría, una galleta salada es una galleta seca (un producto horneado a base de harina de cereales), como, por ejemplo, galletas de soda, pan crujiente de centeno y pan ázimo.

Agronomía

En el caso de la agricultura contractual, en la que los productores suministran sus productos agrícolas directamente a los EEA, estos velarán por que se apliquen los requisitos siguientes para evitar un elevado nivel de asparagina en los cereales:

- seguir las buenas prácticas agrícolas en materia de fertilización, especialmente por lo que se refiere a mantener unos niveles equilibrados de azufre en el suelo y garantizar una aplicación de nitrógeno correcta,

PARTE B

MEDIDAS DE MITIGACIÓN QUE DEBEN APLICAR LOS EXPLOTADORES DE EMPRESA ALIMENTARIA, A LAS QUE SE REHIERE EL ARTÍCULO 2, APARTADO 3, ADEMÁS DE LAS MEDIDAS DE MITIGACIÓN MENCIONADAS EN LA PARTE A**1. Requisito general**

Los EEA aceptarán los productos a los que se hace referencia en el artículo 1, apartado 2, que procedan únicamente de EEA que hayan aplicado todas las medidas de mitigación expuestas en el anexo I.

2. Patatas fritas y otros productos cortados fritos a base de patatas

Los EEA:

- seguirán las instrucciones sobre almacenamiento proporcionadas por los EEA o los proveedores, o establecidas en las medidas de mitigación pertinentes del anexo I,
- trabajarán con procedimientos operativos normalizados y con freidoras calibradas equipadas con temporizadores informatizados y programados con configuraciones estándar (tiempo y temperatura),
- harán un seguimiento del nivel de acrilamida en los productos acabados, a fin de comprobar que las medidas de mitigación son eficaces para mantener los niveles de acrilamida por debajo del nivel de referencia.

3. Productos de panadería

Los EEA harán un seguimiento del nivel de acrilamida en los productos acabados, a fin de comprobar que las medidas de mitigación son eficaces para mantener los niveles de acrilamida por debajo del nivel de referencia.

4. Café

Los EEA garantizarán que el nivel de acrilamida en el café suministrado sea inferior al nivel de referencia especificado en el anexo IV, teniendo en cuenta, no obstante, que esto puede no ser posible para todos los tipos de café, dependiendo de la mezcla y las características. En tales casos, el proveedor deberá proporcionar una justificación.

ANEXO III

REQUISITOS DE MUESTREO Y ANÁLISIS PARA LA EL SEGUIMIENTO CONTEMPLADO EN EL
ARTÍCULO 4

I. Muestreo

1. La muestra deberá ser representativa por lo que se refiere al lote objeto de la muestra.
2. Los EEA deberán garantizar que llevan a cabo un muestreo y análisis representativo de sus productos para detectar la presencia de acrilamida, a fin de verificar la eficacia de las medidas de mitigación, es decir, que los niveles de acrilamida están sistemáticamente por debajo de los niveles de referencia.
3. Los EEA velarán por que se tome una muestra representativa de cada tipo de producto para el análisis de la concentración de acrilamida. Un «tipo de producto» incluye los grupos de productos con idénticos o similares ingredientes, diseño de recetas, y diseño y controles de los procesos, en caso de que estos puedan influir en los niveles de acrilamida en el producto acabado. Los programas de seguimiento deberán dar prioridad a los tipos de productos que hayan demostrado tener potencial para superar el nivel de referencia, y estarán basados en el riesgo en caso de que sea factible adoptar medidas de mitigación adicionales.

II. Análisis

1. Los EEA deberán proporcionar datos suficientes para permitir una evaluación del nivel de acrilamida y de la probabilidad de que el tipo de producto pueda superar el nivel de referencia.
2. La muestra deberá ser analizada en un laboratorio que participe en planes apropiados de ensayos de aptitud [que se ajusten al «International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories» (Protocolo armonizado internacional para los ensayos de aptitud de los laboratorios de química analítica) ⁽¹⁾, elaborado bajo los auspicios de IUPAC/ISO/AOAC] y utilice métodos analíticos homologados para la detección y la cuantificación. Los laboratorios deberán poder demostrar que disponen de procedimientos internos de control de la calidad. Un ejemplo de estos procedimientos son las «ISO/AOAC/IUPAC Guidelines on Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories» (Directrices sobre el control de calidad interno en los laboratorios de química analítica) ⁽²⁾.

Siempre que sea posible, se estimará la veracidad de los análisis incluyendo en el análisis materiales de referencia certificados que sean adecuados.

3. El método utilizado para el análisis de la acrilamida deberá cumplir los siguientes criterios de realización:

Parámetro	Criterio
Aplicabilidad	Alimentos especificados en el presente Reglamento
Especificidad	Libre de interferencias matriciales o espectrales
Blancos de campo	Inferior al límite de detección (LOD)
Repetibilidad (RSD _r)	0,66 veces la RSD _r derivada de la ecuación de Horwitz (modificada)
Reproductibilidad (RSD _R)	derivada de la ecuación de Horwitz (modificada)
Recuperación	75-110 %
Límite de detección (LOD)	= tres décimos del LOQ
Límite de cuantificación (LOQ)	Para el nivel de referencia < 125 µg/kg: ≤ dos quintos del nivel de referencia (sin embargo, no se exigirá que sea inferior a 20 µg/kg) Para el nivel de referencia ≥ 125 µg/kg: ≤ 50 µg/kg

4. El análisis de la acrilamida puede sustituirse por la medición de cualidades del producto (por ejemplo, el color) o parámetros del proceso, siempre que pueda demostrarse una correlación estadística entre las cualidades del producto o los parámetros del proceso y el nivel de acrilamida.

⁽¹⁾ M. Thompson *et al.*, *Pure and Applied Chemistry*, 2006, p. 78 y pp. 145-196.

⁽²⁾ Editadas por M. Thompson y R. Wood, *Pure and Applied Chemistry*, 1995, p. 67 y pp. 649-666.

III. Frecuencia de muestreo

1. Los EEA realizarán un muestreo y análisis al menos una vez al año en el caso de los productos cuyo nivel de acrilamida es conocido y está bien controlado. Los EEA realizarán con mayor frecuencia muestreos y análisis de los productos que pueden superar el nivel de referencia, los cuales estarán basados en el riesgo en caso de que sea factible adoptar medidas de mitigación adicionales.
2. Basándose en esta evaluación, a la que se hace referencia en el punto II.1, los EEA especificarán las frecuencias adecuadas para el análisis de cada tipo de producto. La evaluación se repetirá si se modifica un producto o un proceso de tal forma que pueda dar lugar a un cambio en el nivel de acrilamida en el producto final.

IV. Mitigación

Si el resultado analítico, corregido con respecto a la recuperación pero sin tener en cuenta la incertidumbre de la medición, indica que un producto ha superado el nivel de referencia o contiene un nivel de acrilamida superior al previsto (teniendo en cuenta los análisis anteriores, pero inferior al nivel de referencia), los EEA llevarán a cabo una revisión de las medidas de mitigación aplicadas y adoptarán las medidas de mitigación adicionales de que dispongan, a fin de garantizar que el nivel de acrilamida en el producto acabado está por debajo del nivel de referencia. Esto debe llevarse a cabo mediante la realización de un nuevo muestreo y análisis representativo una vez que se hayan introducido las medidas de mitigación adicionales.

V. Información a las autoridades competentes

Previa solicitud de la autoridad competente, los EEA pondrán cada año a disposición los resultados obtenidos gracias al análisis, junto con las descripciones de los productos analizados. En el caso de los productos que superen el nivel de referencia, se detallarán las medidas de mitigación adoptadas para reducir los niveles de acrilamida por debajo del nivel de referencia.

ANEXO IV

NIVELES DE REFERENCIA A LOS QUE SE REFIERE EL ARTÍCULO 1, APARTADO 1

A continuación se indican los niveles de referencia para detectar la presencia de acrilamida en los productos alimenticios, a los que se refiere el artículo 1, apartado 1:

Alimento	Nivel de referencia [µg/kg]
Patatas fritas listas para consumir	500
Patatas fritas a la inglesa (<i>dhips</i>) fabricadas con patatas frescas y con masa de patatas	750
Galletas saladas a base de patatas	
Otros productos con masa de patatas	
Pan de molde	
a) pan de molde a base de trigo	50
b) otro pan de molde	100
Cereales para el desayuno (a excepción del <i>porridge</i>)	
— productos de salvado y cereales integrales, grano inflado	300
— productos a base de trigo y centeno ⁽¹⁾	300
— productos a base de maíz, avena, espelta, cebada y arroz ⁽¹⁾	150
Galletas y barquillos	350
Galletas saladas, excepto las de patata	400
Pan crujiente	350
Pan de especias	800
Productos similares a los demás productos de esta categoría	300
Café tostado	400
Café instantáneo (soluble)	850
Sucedáneos del café	
a) sucedáneos del café compuestos exclusivamente por cereales	500
b) sucedáneos del café compuestos por una mezcla de cereales y achicoria ⁽²⁾	
c) sucedáneos del café compuestos exclusivamente por achicoria	4 000
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad, excluidos las galletas y los biscotes ⁽³⁾	40
Galletas y biscotes para lactantes y niños de corta edad ⁽³⁾	150

⁽¹⁾ Cereales no integrales ni de salvado. La categoría se determina en función del cereal presente en mayor cantidad.
⁽²⁾ El nivel de referencia que debe aplicarse a los sucedáneos compuestos por una mezcla de cereales y achicoria debe tener en cuenta la proporción relativa de estos ingredientes en el producto final.
⁽³⁾ Tal como se definen en el Reglamento (UE) n.º 609/2013.

ANEXO 3

Cromatograma de la M2(papas fritas de comida rápida, restaurante A) adicionada de un estándar de 0.5 ppm, sobre puesto al cromatograma del estándar mencionado.

	Áreas		Concentraciones/ppm				
	MUESTRA	M +STND.	MUESTRA 1	Cnative	Diferencia	estandar	R%
5	383334	591941	0.837	1.286	0.449	0.5101	87.995
	381714	591239	0.834	1.284	0.451	0.4833	93.283
6	370551	589927	0.810	1.282	0.472	0.5101	92.537
	370671	589005	0.810	1.280	0.470	0.5047	93.083
7	378644	589631	0.827	1.281	0.454	0.5039	90.094
	375884	598611	0.821	1.300	0.479	0.5102	93.932
8	378453	578140	0.827	1.256	0.430	0.5103	84.199
	379345	570942	0.828	1.241	0.412	0.5101	80.820
9	370072	587245	0.808	1.276	0.467	0.4894	95.483
	371057	586543	0.811	1.274	0.464	0.5101	90.896
10	370760	586411	0.810	1.274	0.464	0.5011	92.600
	379668	595559	0.829	1.294	0.465	0.4915	94.514
						Rpromedio	90.786

ANEXO 4

Áreas cromatográficas la primera parte de estudio (Met1 y Met 2)

METODO	PROCEDENCIA : COMIDA RAPIDA	
	Extracción en AGUA	Extracción en metanol METANOL
LECTURA 1	152136	321059
	154438	320109
LECTURA 2	141656	321659
	142255	320857
LECTURA 3	1533007	318646
	151025	319348
LECTURA 4	152449	321831
	152844	321409

MUESTRA	Extracción con agua CHIPS
LECTURA-1	26903
	26608
LECTURA-2	27105
	27900
LECTURA-3	26446
	25357
LECTURA-4	26560
	27665

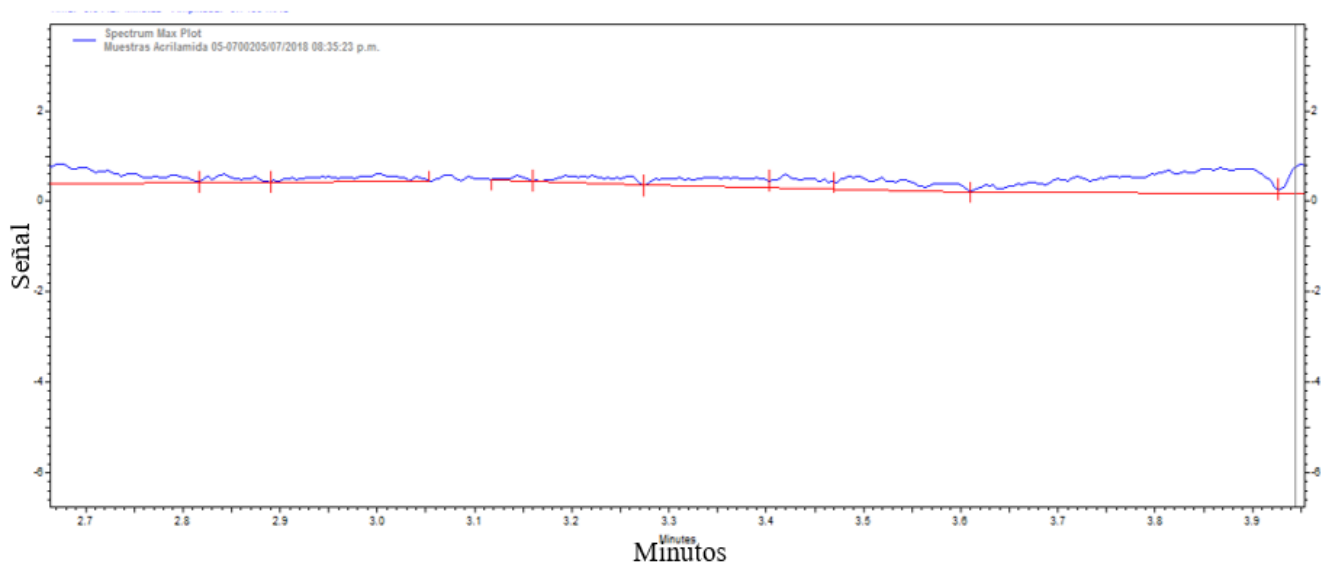
Medias de las áreas cromatográficas de las primeras cuatro lecturas y su concentración en ppm

<i>Metodo</i>	<i>Medias Comida Rápida</i>		<i>Concentraciòn (ppm)</i>	
	Extracciòn en AGUA	Extracciòn en metanol METANOL	Extracciòn en AGUA	Extracciòn en metanol METANOL
<i>lectura 1</i>	153287	320584	0.31762769	0.677601771
<i>lectura 2</i>	141955.5	321258	0.29324563	0.679052021
<i>lectura 3</i>	842016	318997	1.7995705	0.674187012
<i>lectura 4</i>	152646.5	321620	0.31624953	0.679830939

	MEDIAS	CONCENTRACIONES/PPM
	CH en agua	CH en agua
LECTURA 1	26755.5	0.045369017
LECTURA 2	27502.5	0.046976342
LECTURA 3	25901.5	0.04353146
LECTURA 4	27112.5	0.046137177

ANEXO 5

Cromatograma de la muestra de papas caseras, no se observa ningún pico en el tiempo de retención.



ANEXO 6

Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en papas fritas de comida rápida, extraída en metanol.

Día	Área				
	M2 Rest.A	M3 Rest.B	M4 Rest.C	M5 Rest.D	M6 Rest.E
Día 5	382524	75566	120652	99855	-
Día 6	370611	78940	132899	105894	-
Día 7	387264	76584	121484	101842	-
Día 8	378899	78926	119984	100615	-
Día 9	370564	75256	120584	101215	-
Día 10	380214	77165	120784	102587	-

Resultados del área del pico cromatográfico de acrilamida en papas fritas “chips” extraída en agua.

Día	Área			
	M8 A granel1	M9 A granel 2	M10 Marca 1	M11 Marca 2
Día 5	-	-	-	26755
Día 6	-	-	-	27502
Día 7	-	-	-	25901
Día 8	-	-	-	27112
Día 9	-	-	-	26903
Día 10	-	-	-	27007