

ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL

Facultad de Ciencias Naturales y Matemáticas

Validación de un método analítico para la cuantificación de acrilamida en harinas de cereales y derivados, mediante cromatografía líquida y espectrometría de masas.

PROYECTO INTEGRADOR

Previo la obtención del Título de:

Ingeniero Químico

Presentado por:

Basantes Iguasnia María Belén

Estrada Ordóñez Denisse Melissa

GUAYAQUIL - ECUADOR

Año: 2022

DEDICATORIA

Le dedicamos este proyecto a nuestros padres, hermanos e hijos, por ser los pilares fundamentales en nuestra vida estudiantil, quienes nos han apoyado con sus palabras de aliento y han sacrificado tanto por brindarnos la oportunidad de crecer y seguir adelante.

También queremos dedicar este proyecto a nuestros profesores, quienes nos han enseñado a enfrentar nuestros miedos y a arriesgarnos en la búsqueda de soluciones a los problemas.

Finalmente, a nuestra alma mater ESPOL, en donde hemos vivido y compartido momentos inolvidables.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a Dios, por guiar nuestros pasos y permitirnos terminar esta nueva etapa con mucho éxito.

A nuestro tutor Msc. Michael Rendón, por permitirnos desarrollar este proyecto, por darnos todo el apoyo, conocimientos y consejos para obtener un excelente trabajo. Muchas gracias por confiar en nosotras.

A Belén Baque y Alejandro Celi, por su amistad y apoyo incondicional en la carrera y en la vida.

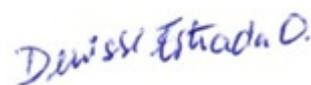
Finalmente, queremos agradecer a todos nuestros familiares y amigos que de una u otra forma, estuvieron presentes durante todo el desarrollo de nuestra carrera.

DECLARACIÓN EXPRESA

“Los derechos de titularidad y explotación, nos corresponde conforme al reglamento de propiedad intelectual de la institución; *Basantes Iguasnia María Belén* y *Estrada Ordóñez Denisse Melissa* damos nuestro consentimiento para que la ESPOL realice la comunicación pública de la obra por cualquier medio con el fin de promover la consulta, difusión y uso público de la producción intelectual”



Basantes Iguasnia
María Belén



Estrada Ordóñez
Denisse Melissa

EVALUADORES

Ing. Nadia Flores, MsC.

PROFESOR DE LA MATERIA

Ing. Michael Rendón, MsC.

PROFESOR TUTOR

RESUMEN

La acrilamida es una neurotoxina que se forma en los alimentos durante el proceso de cocción a altas temperaturas. Puede ser encontrada en productos ricos en almidón y azúcares por lo que su control debe ser monitoreado con regularidad por las industrias alimentarias. Por este motivo se propone la validación de un método sencillo y preciso para la cuantificación de acrilamida, en harinas de cereales y derivados, teniendo como referencia los requisitos de la Metodología AOAC para productos alimenticios y suplementos. Se realizó una extracción de un solo paso con metanol, la cuantificación se realizó en un cromatógrafo de líquidos acoplado a un espectrómetro de masas tándem, con fuente de ionización por Electro-Spray. El método analítico fue validado mediante la construcción de curvas de calibrado y fortificando a tres niveles de concentración una muestra de arroz pilado como blanco matriz. Las curvas de calibrado realizadas dieron un coeficiente de correlación mayor a 0.997; la exactitud, en términos de porcentaje de recuperación, fue de 97.31%, 107.74% y 114.60%, para el nivel bajo, medio y alto, respectivamente; la precisión, expresada como desviación estándar relativa fue menor a 4.88%, en condiciones de repetibilidad y menor a 11.7% en, en condiciones de repetibilidad, para los tres niveles estudiados; mientras que el límite de detección fue de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Esta propuesta fue puesta a prueba en diferentes tipos de harinas y productos procesados, obteniéndose niveles de acrilamida entre 2.33 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 14.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Con esto, se demuestra la validez, funcionalidad, calidad y coherencia de los datos obtenidos, que cumplen con los criterios de validación establecidos bajo las condiciones estipuladas.

Palabras Clave: LC-MS/MS, acrilamida, harinas de cereales, curva de calibración

ABSTRACT

Acrylamide is a neurotoxin that is formed in foods during the cooking process at high temperatures. It can be found in products rich in starch and sugars, so its control should be monitored regularly by food industries. For this reason, the validation of a simple and accurate method for the quantification of acrylamide in cereal flours and derivatives is proposed, taking as a reference the requirements of the AOAC Methodology for food products and supplements. A one-step extraction with methanol was performed, the quantification was carried out in a liquid chromatograph coupled to a tandem mass spectrometer, with Electro-Spray ionization source. The analytical method was validated by constructing calibration curves and fortifying a rice sample as matrix blank at three concentration levels. The calibration curves performed gave a correlation coefficient greater than 0.997; the accuracy, in terms of percentage recovery, was 97.31%, 107.74% and 114.60%, for the low, medium, and high levels, respectively; the precision, expressed as relative standard deviation, was less than 4.88%, under repeatability conditions and less than 11.7% in repeatability conditions, for the three levels studied, while the detection limit was 1 µg/kg. This proposal was tested on different types of flours and processed products, obtaining acrylamide levels between 2.33 µg/kg and 14.80 µg/kg. This demonstrates the validity, functionality, quality, and consistency of the data obtained, which meet the validation criteria established under the stipulated conditions.

Keywords: LC-MS/MS, acrylamide, cereal flours, calibration curve

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	I
ABSTRACT.....	II
ÍNDICE GENERAL.....	III
ABREVIATURAS	V
SIMBOLOGÍA	VI
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VII
ÍNDICE DE TABLAS	VIII
CAPÍTULO 1	1
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Descripción del problema	1
1.2. Justificación del problema.....	2
1.3. Objetivos.....	3
1.3.1. Objetivo General	3
1.3.2. Objetivos Específicos	3
1.4. Marco teórico	3
1.4.1. Acrilamida	3
1.4.2. Formación de acrilamida.....	4
1.4.2.1. Condiciones de formación y reacción de Maillard.....	4
1.4.2.2. Problemas para la salud y normativas aplicadas.....	5
1.4.3. Alimentos con acrilamida	6
1.4.4. Técnicas de análisis	6
1.4.4.1. Cromatografía líquida y espectrometría de masas	6
1.4.5. Validación de métodos analíticos	8
1.4.5.1. Especificidad/Selectividad	8
1.4.5.2. Linealidad de la curva de calibrado	8
1.4.5.3. Límite de cuantificación	8
1.4.5.4. Límite de detección.....	8
1.4.5.5. Exactitud.....	8
1.4.5.6. Precisión.....	9
2. METODOLOGIA	10
2.1 Diseño experimental	10
2.2 Selección de muestras.....	10

2.3 Materiales y Equipos.....	11
2.3.1. Reactivos.....	11
2.3.2. Equipos.....	11
2.4 Metodología.....	12
2.4.1 Establecimiento de las condiciones cromatográficas.....	12
2.4.2 Establecimiento de condiciones espectrométricas.....	13
2.4.3 Preparación de soluciones estándar.....	13
2.4.4 Extracción de acrilamida.....	14
2.4.5 Curva de Calibrado.....	15
2.4.6 Validación.....	16
2.4.6.1 Límite de detección y cuantificación.....	16
2.4.6.2 Parámetros de validación.....	16
2.4.6.3 Rango de trabajo.....	18
2.4.6.4 Objetivo de validación.....	18
2.4.7 Cuantificación de acrilamida en muestras alimentarias.....	18
CAPITULO 3.....	20
3. Resultados y Discusión.....	20
3.1 Validación del Método.....	20
3.1.1 Selectividad.....	20
3.1.2 Límite de detección y cuantificación.....	20
3.1.3 Curva de Calibrado.....	22
3.1.4 Exactitud.....	25
3.1.5 Precisión.....	26
3.2 Cuantificación de acrilamida en muestras.....	27
3.3. Análisis Económico.....	29
CAPITULO 4.....	31
4. Conclusiones y Recomendaciones.....	31
4.1 Conclusiones.....	31
4.2 Recomendaciones.....	32
BIBLIOGRAFÍA.....	33
APÉNDICE.....	36

ABREVIATURAS

ESPOL	Escuela Superior Politécnica del Litoral
EFSA	Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria
IARC	Agencia Internacional de Investigación del Cáncer
BEUC	Oficina Europea de Uniones de Consumidores
UE	Unión Europea
AOAC	Association of Official Agricultural Chemists
CL	Cromatografía Líquida
MS	Espectrometría de Masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida por espectrometría de masas tándem
ESI	Ionización por Electro-Spray
LOD	Límite de Detección
LOQ	Límite de Cuantificación
PVDF	Fluoruro de Polivinilideno
m/z	Relación masa/carga
RPM	Revoluciones por minuto
r^2	Coefficiente de determinación
r	Coefficiente de correlación
%RSD _r	Desviación estándar relativa por repetibilidad
%RSD _R	Desviación estándar relativa por reproducibilidad intermedia
σ	Desviación estándar
IVA	Impuesto al valor agregado

SIMBOLOGÍA

µg	Microgramos
kg	Kilogramo
L	Litro
mL	Mililitro
N	Número de muestras
W	Potencia (watts)
kWh	Kilowatt-hora

ÍNDICE DE FIGURAS

Gráfico 1.1 Mecanismo de reacción de la acrilamida (Rifai & Saleh, 2020).....	4
Gráfico 1.2. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, 2018).....	8
Gráfico 2.1 Diagrama de la metodología aplicada en el estudio	10
Gráfico 2.2 Equipo de cromatografía líquida acoplado con espectrometría de masas	12
Gráfico 2.3 Pasos del proceso de extracción de acrilamida	15
Gráfico 3.1 Picos cromatográficos correspondientes al estándar de acrilamida y al estándar interno $^{13}\text{C}_3$ acrilamida	20
Gráfico 3.2 Límite detectado de acrilamida por el método.....	21
Gráfico 3.3 Límite detectado de acrilamida para la cuantificación	22
Gráfico 3.4 Curvas de calibración del estándar acrilamida para validación del método	23
Gráfico 3.5 Curva de calibración directa del estándar acrilamida	23
Gráfico 3.6 Curvas de calibración proporcionados por el equipo.....	24
Gráfico 3.7 Emulsión de una muestra de café	28
Gráfico 3.8 Lectura de acrilamida en diferentes matrices	29
Gráfico A.1 Picos cromatográficos a los niveles de validación	37
Gráfico A.2 Valores críticos para el test de varianza de Cochran	40
Gráfico A.3. Curva de calibración directa del patrón interno	45
Gráfico A.4. Lecturas de patrón interno en muestras de alimentos	45
Gráfico A.5. Lecturas de acrilamida en muestras de alimentos	46
Gráfico A.6. Picos cromatográficos de las muestras de café	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Categorías de sustancias establecidas por la IARC. (International Programme on Chemical Safety, 1999)	6
Tabla 1.2: Niveles de referencia de acrilamida. (González et al., 2021) (EFSA, 2017)	6
Tabla 2.1 Muestras analizadas en el método de estudio	11
Tabla 2.2 Gradiente de elución del método cromatográfico (Jozinović et al., 2019)..	12
Tabla 2.3 Condiciones para el equipo espectrométrico	13
Tabla 2.4 Concentraciones para la curva de calibración	15
Tabla 2.5 Cantidades fortificadas de los estándares por nivel de medición.....	16
Tabla 2.6 Objetivos de validación establecidos por la AOAC. (AOAC International, 2002).....	18
Tabla 2.7 Muestras adicionales analizadas en el método de estudio	19
Tabla 3.1 Precisión y Recuperación al nivel LOQ.....	21
Tabla 3.2 Datos de regresión lineal por día de validación	24
Tabla 3.3 Comparación de los coeficientes de relación con otras fuentes bibliográficas	24
Tabla 3.4 Porcentajes de recuperación por cada nivel	25
Tabla 3.5 Comparación del porcentaje de recuperación con otras fuentes bibliográficas	25
Tabla 3.6 Precisión en términos %RSD _r y %RSD _R por nivel de validación.....	26
Tabla 3.7 Comparación del porcentaje de recuperación con otras fuentes bibliográficas	27
Tabla 3.8 Concentraciones de Acrilamida en muestras analizadas en la validación .	27
Tabla 3.9 Concentraciones de Acrilamida en muestras de café y snacks	28
Tabla 3.10 Precio final del método por cantidad de muestras	30
Tabla A.1 Datos de curvas de calibración en matriz para acrilamida.....	36
Tabla A.2 Datos de la validación por día y por nivel	36
Tabla A.3 Cálculos de la concentración de acrilamida en los niveles analizados	38
Tabla A.4 Cálculos intermedios para el parámetro de recuperación.....	39
Tabla A.5 Prueba de hipótesis por la prueba de Cochran	41
Tabla A.6 Análisis de varianza de un factor para nivel de 25 µg/kg.....	42
Tabla A.7 Análisis de varianza de un factor para nivel de 100 µg/kg.....	42
Tabla A.8 Análisis de varianza de un factor para nivel de 400 µg/kg.....	43

Tabla A.9. Cálculos intermedios para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad	44
Tabla A.10 Datos de curvas de calibración directa para acrilamida.....	44
Tabla A.11 Costos de reactivos consumidos por número de muestras	47
Tabla A.12 Costos de materiales utilizados por número de muestras	47
Tabla A.13 Costos energéticos utilizados por número de muestras	47

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Descripción del problema

La acrilamida se forma a partir de la reacción entre un aminoácido, especialmente la asparagina, en presencia de azúcares reductores a temperaturas superiores a 120°C. (European Food Safety Authority, 2015) Puede estar presente en una gran variedad de productos procesados que se encuentran fácilmente en supermercados a nivel nacional, siendo más comunes en alimentos con alto contenido de carbohidratos, almidones y azúcares, como las papas fritas, galletas, cereales y café. Según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), este compuesto se clasifica como potencialmente cancerígeno. Además, posee efectos neurotóxicos que afectan la salud humana si se ingiere en grandes cantidades. (Mencin et al., 2020)

Estudios in vivo han investigado la toxicología y carcinogénesis de la acrilamida en el organismo de ratones, con una administración de 185 mg/kg de peso corporal durante 14 semanas. Los sujetos de estudio presentaron parálisis en los miembros posteriores como consecuencia de una lesión degenerativa acelerada que afectaba al nervio ciático y la médula espinal lumbar. Los ratones macho sufrieron un deterioro en las células germinales de los testículos a las mismas dosis de administración; mientras que una dosificación de 370 mg/kg resultó letal al finalizar el estudio. (F.A. Beland et al., 2012)

Basado en este y otros estudios, en Ecuador, a pesar de que el Servicio Ecuatoriano de Normalización (INEN) establece niveles máximos de otros compuestos en alimentos (Dirección Ejecutiva de la Agencia de Regulación, 2016), este organismo no incluye a la acrilamida en su regulación. El Código de Prácticas Ecuatorianas (CPE) únicamente propone recomendaciones en el sector productivo para reducir su formación, por lo que la Agencia de Regulación, Control y Vigilancia Sanitaria (ARCSA) no la considera en los controles de calidad obligatorios del producto final. (Servicio Ecuatoriano de Normalización, 2013)

Teniendo esto en consideración, es importante conocer con mayor detalle los niveles cuantitativos de acrilamida para brindar un servicio de alta calidad al consumidor, a través de un análisis de inocuidad más riguroso.

1.2. Justificación del problema

En el 2015 la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) publicó la primera evaluación de riesgo asociado a la acrilamida en alimentos, lo cual ha promovido la adopción de medidas regulatorias para su control. En el 2017 se implementó el “Reglamento (UE) 2017/2158 DE LA COMISIÓN”, en donde se menciona los niveles máximos de referencia, siendo 150 µg/kg para galletas y 40 µg/kg en alimentos a base de cereales. (European Food Safety Acrylamide, 2017) Cuando los productos sobrepasan los límites, se debe realizar evaluaciones para ajustar el proceso y reducir el contenido de acrilamida a niveles inferiores al valor estipulado. (González et al., 2021)

En Ecuador, de acuerdo con el Instituto Nacional de Estadística y Censo (INEC) el 71.2% de personas entre 15 y 19 años consumen un alto contenido de snack dulces y salados (INEC, 2013). Esto, junto a la falta de un método validado para el análisis de acrilamida, convierte a este grupo poblacional en el más vulnerable a padecer sus efectos secundarios, debido a que no existe un control por parte de una entidad gubernamental. (Servicio de Acreditación Ecuatoriano, 2022)

Por esta razón, se plantea la validación de un método analítico por cromatografía líquida/espectrometría de masas tándem (LC-MS/MS) para la cuantificación de los niveles de acrilamida en alimentos procesados de marcas ecuatorianas. De esta forma, la industria alimentaria tendría la posibilidad de extender el alcance de sus productos a mercados internacionales, donde las regulaciones son más rigurosas. Por ende, tanto los laboratorios de análisis como las empresas productoras se verían mutuamente beneficiadas, al tener un mayor acceso a metodologías de alta precisión y sensibilidad que garanticen la calidad del análisis realizado.

1.3. Objetivos

1.3.1. Objetivo General

Evaluar los requisitos de validación de un método analítico para la determinación cuantitativa de acrilamida en muestras de cereales y sus derivados mediante LC-ESI-MS/MS.

1.3.2. Objetivos Específicos

- Analizar las condiciones óptimas del espectrómetro de masas para la detección de los iones moleculares pertenecientes a la acrilamida.
- Comparar los datos obtenidos en el proceso de validación mediante el uso de herramientas estadísticas, con los criterios de la guía metodológica AOAC.
- Calcular los niveles de acrilamida en las matrices de alimentos seleccionados a través del método validado de Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas LC-ESI-MS/MS.

1.4. Marco teórico

1.4.1. Acrilamida

La acrilamida, también conocida como etil-carboxamida o prop-2-enamida, es un compuesto carbonilo α,β -insaturado, cuya fórmula química es representada por C_3H_5NO . (Hamzalıođlu et al., 2018)

Comúnmente es utilizada como intermediario en la síntesis de poliacrilamidas y como floculante en los procesos de clarificación de aguas, estabilizante de suelos y aditivo cosmético. Fue detectada por primera vez en el 2002, por la Universidad de Estocolmo, después de estudiar los efectos de acrilamida en aguas contaminadas, como consecuencia de una fuga de este compuesto en el sistema de aguas de la ciudad. Esto provocó la muerte de peces y la parálisis de vacas que consumían agua en el río contaminado. (Hamzalıođlu et al., 2018)

Los estudios se extendieron al notar que la presencia de la acrilamida no solo se limitaba a los animales y personas expuestos a la contaminación, sino que existía cierta concentración en alimentos fritos y horneados que se encontraban fuera del área afectada, con el fin de identificar sus precursores moleculares y esclarecer el

mecanismo de reacción y los factores que contribuyen a su formación. (Stadler & Studer, 2016)

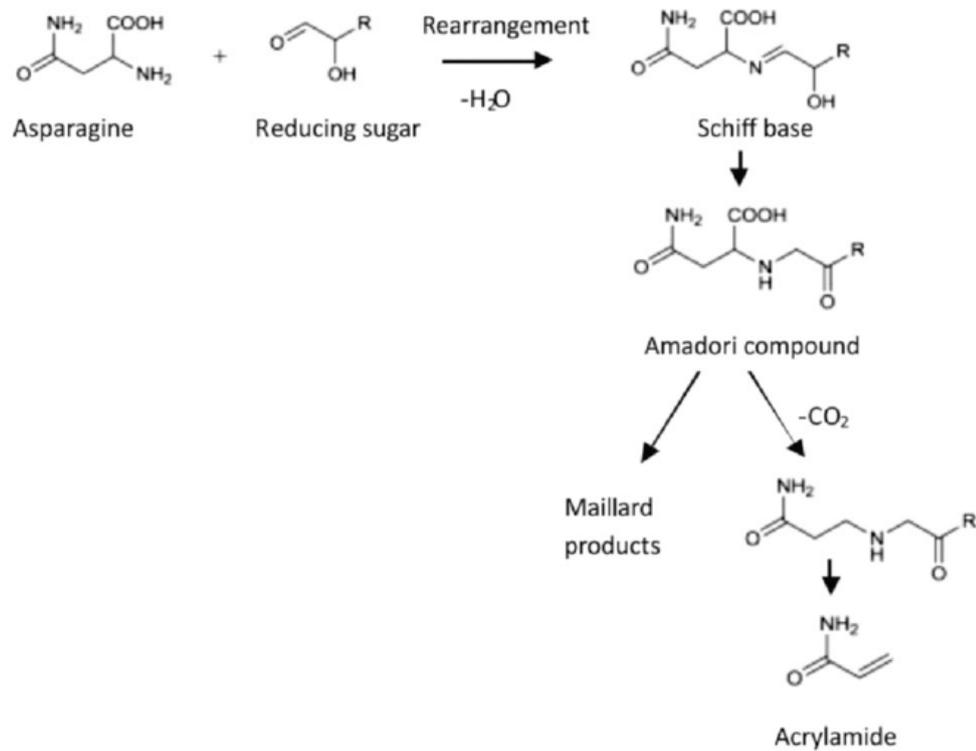


Gráfico 1.1 Mecanismo de reacción de la acrilamida (Rifai & Saleh, 2020)

1.4.2. Formación de acrilamida

1.4.2.1. Condiciones de formación y reacción de Maillard

La formación de la acrilamida ocurre principalmente en alimentos de fuentes vegetales, como los cereales y tubérculos, que han sido procesados para el consumo humano, tales como las galletas, cereales de desayuno, pan tostado, papas fritas y café. Su producción se ve favorecida al exponer a los alimentos a temperaturas superiores a $120^{\circ}C$ y a condiciones de bajo contenido de humedad, lo que usualmente sucede al freír, tostar u hornear. (Robin & Abt, 2018)

A esto se lo conoce como reacción de Maillard, la cual es una reacción química entre aminoácidos y azúcares reductores, la cual es la responsable de dar el olor

apetecible y la coloración dorada de los alimentos al ser cocinados. Sin embargo, al ser expuestos a estas condiciones por largos intervalos de tiempo, se da la formación de la acrilamida como un producto secundario, siendo la asparagina el principal aminoácido responsable de su producción. (Stadler & Studer, 2016)

En la actualidad, diversos estudios han permitido conocer más sobre el mecanismo de reacción de la acrilamida, lo que ha revelado que la composición de los alimentos influye significativamente en la generación de este compuesto. La presencia de curcumina, ácido ascórbico, silimarina y vainillina actúan como catalizadores al poseer grupos carbonilos que desencadenan su formación. (Hamzalioglu et al., 2018)

1.4.2.2. Problemas para la salud y normativas aplicadas

Se han realizado diversos estudios in vivo, donde se aprecian los efectos adversos, causando un alto impacto en la salud del paciente. El consumo constante y prolongado de alimentos con acrilamida demostraron daños en el material genético de las células, induciendo a tumores en animales (Valenzuela B & Ronco M, 2007). Además de presentar alteraciones en el sistema nervioso, disminución de parámetros reproductivos, teratogenicidad y producción de células carcinógenas.

La Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) ha categorizado a la acrilamida como un compuesto “probablemente carcinogénico para los humanos” de clase 2A, tomando el segundo lugar en la categoría de sustancias peligrosas para la salud humana. (International Agency for Research on Cancer, 2018) Mientras que por la Autoridad Europea para la Seguridad Alimentaria (EFSA) ha sido considerado como un mutagénico de Categoría 2 y sustancia tóxica de Categoría 3. Razón por la cual se han establecido reglamentos para evitar la intoxicación de la población, mediante indicativos y reglamentos que reduzcan su producción durante la cocción. (Uday, 2019)

Tabla 1.1: Categorías de sustancias establecidas por la IARC. (International Programme on Chemical Safety, 1999)

Categorías	Descripción
Grupo 1	Cancerígeno para humanos
Grupo 2A	Probablemente cancerígeno para humanos
Grupo 2B	Posiblemente cancerígeno para humanos
Grupo 3	No clasificable como cancerígeno para humanos
Grupo 4	Probablemente no cancerígeno

1.4.3. Alimentos con acrilamida

Los alimentos con mayor presencia de acrilamida son aquellos compuestos principalmente por carbohidratos, almidones y azúcares simples, donde la reacción de Maillard se ve favorecida por las altas temperaturas del proceso de producción.

La EFSA, la OMS y la Asociación Europea de Consumidores (BEUC) han establecido límites de acrilamida que puede estar presente en un alimento de acuerdo con su categoría, en unidades de $\mu\text{g}/\text{kg}$.

Tabla 1.2: Niveles de referencia de acrilamida. (González et al., 2021) (European Food Safety Acrylamide, 2017)

Alimentos	Niveles límites de acrilamida en $\mu\text{g}/\text{kg}$		
	OMS 2002	EFSA 2012	BEUC 2019
<i>Papas fritas</i>	1312	338	266
<i>Papas chips</i>	537	675	457
<i>Café en polvo</i>	200	256	264
<i>Galletas</i>	423	150	-
<i>Tostadas</i>	-	110	101
<i>Cereales</i>	298	138	107

1.4.4. Técnicas de análisis

1.4.4.1. Cromatografía líquida y espectrometría de masas

También conocida como LC-MS/MS, es una técnica analítica utilizada para la detección, caracterización y cuantificación de un amplio rango de analitos, sin

considerar restricciones moleculares. Su aplicación se extiende en la detección de micotoxinas, fármacos, pesticidas y adulterantes en alimentos, debido a su alta sensibilidad y precisión. (Alpözen et al., 2015)

La cuantificación resultante se basa en la relación masa-carga (m/z) de las matrices líquidas o sólidas que se desean analizar, donde cada compuesto tiene una relación característica que permite su identificación después de su respectiva ionización. (Arroyave et al., 2018)

La cromatografía es utilizada para la separación física de los componentes de interés mediante dos fases: La fase móvil y la fase estacionaria. La fase móvil se encarga de arrastrar los componentes de la muestra estudiada a lo largo de la columna, hacia la fase estacionaria. A medida que esto ocurre, existe una interacción de las moléculas presentes con el solvente utilizado, que permite la separación por partición, intercambio iónico o afinidad. (Arroyave et al., 2018)

Los componentes se separan a medida que la muestra, junto al solvente, atraviesa la columna a diferentes periodos de tiempo, lo cual se conoce como el tiempo de retención característico. Una vez separado el componente de interés, la solución es dirigida a un tubo capilar con un alto potencial eléctrico, donde se generan iones con el objetivo de dispersar la solución al momento en que esta sale del tubo capilar en forma de spray. Esta acción forma gotas con cargas positivas o negativas, que se evaporan con facilidad, ya sea por desorción del campo eléctrico o evaporación del solvente, permitiendo la liberación de la molécula para su respectiva lectura en el espectrómetro de masas. (Iturra, 2012)

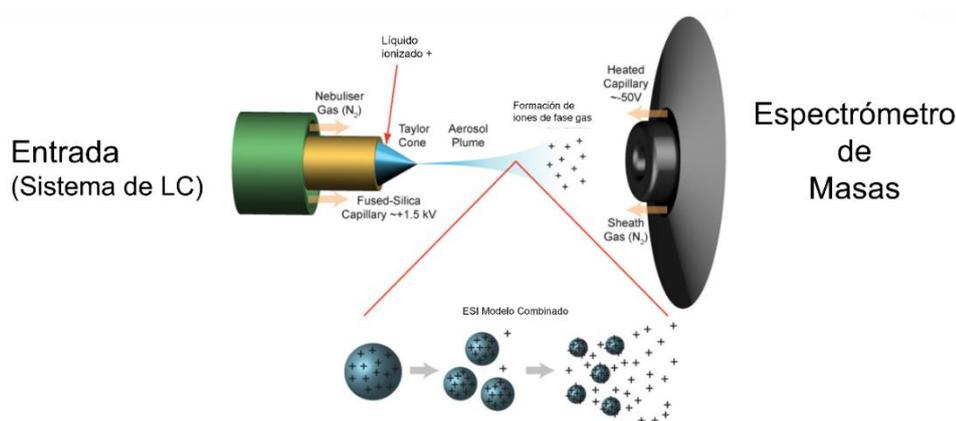


Gráfico 1.2. Diagrama de un cromatógrafo de líquidos (Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, 2018)

1.4.5. Validación de métodos analíticos

La validación de métodos analíticos sirve para confirmar que el procedimiento empleado para cierta prueba es adecuado. Con este proceso se puede juzgar la confiabilidad, calidad y coherencia de los resultados obtenidos. (Mayorga Bustinza & del Castillo Herrera, 2010) Los criterios que se aplican para definir la validez de un procedimiento son linealidad de la curva de calibrado, límite de cuantificación LOQ, límite de detección LOD, exactitud y precisión.

1.4.5.1. Especificidad/Selectividad

Es la capacidad que tiene el método para detectar y cuantificar un analito con alta precisión en presencia de las interferencias que puedan existir en la muestra a ser analizada.

1.4.5.2. Linealidad de la curva de calibrado

Es la capacidad de obtener una correlación proporcional entre la concentración o cantidad de analito en un rango establecido. Para el desarrollo de la curva de calibrado se sugiere considerar como mínimo 5 niveles, incluyendo todos los aspectos relevantes para su análisis estadístico. (Moosavi & Ghassabian, 2018)

1.4.5.3. Límite de cuantificación

Es la mínima concentración del analito a la cual se puede obtener niveles de recuperación y precisión aceptables.

1.4.5.4. Límite de detección

Es la cantidad más baja de analito presente en la muestra que emite una señal (pico) con una altura dos o tres veces mayor que el nivel de referencia del ruido.

1.4.5.5. Exactitud

Es el grado de correlación que existe entre el valor medio, el cual es obtenido entre un gran número de resultados, y un valor de referencia aceptado. El valor de referencia debe determinarse en términos de recuperación. (Moosavi & Ghassabian, 2018)

1.4.5.6. Precisión

Se define como el grado de correlación o coincidencia existente entre los datos resultantes del estudio de dos o más muestras homogéneas, para analizar su semejanza entre sí. Es obtenida mediante el cálculo de las desviaciones estándar relativas a las muestras y es expresada en términos de repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad: Analiza la concordancia de los datos al mantener las condiciones metodológicas lo más semejantes posibles, manteniendo los mismos tipos de reactivos, materiales, equipos, instrumentos y analista. Se expresa con la desviación estándar de los resultados dentro de grupos. (AOAC International, 2002)

Reproducibilidad: Analiza la similitud de los datos al cambiar una de las variables y manteniendo las demás constantes, al considerar otro analista en días diferentes de experimentación. Se expresa con la desviación estándar de resultados entre grupos. (AOAC International, 2002)

CAPITULO 2

2. METODOLOGIA

2.1 Diseño experimental

La metodología de investigación llevada a cabo sigue las principales etapas de estudio mostradas en el gráfico 2.1.

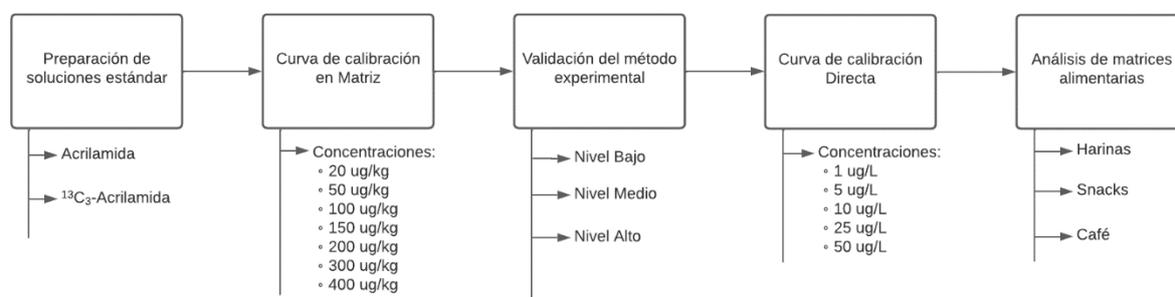


Gráfico 2.1 Diagrama de la metodología aplicada en el estudio

Para su desarrollo, la cuantificación analítica fue realizada en matrices alimentarias de harinas de cereales y derivados, obtenidos en supermercados seleccionados de Guayaquil, mediante el método LC-ESI-MS/MS. La parte analítica e instrumental fue ejecutada en una empresa de análisis fisicoquímico y microbiológico en el norte de Guayaquil, quienes proporcionaron los equipos y materiales descritos en el apartado 2.3 del presente documento.

2.2 Selección de muestras

Se empleó una serie de parámetros para la selección de las matrices alimentarias más adecuadas para el análisis, entre los cuales se encuentra el porcentaje de carbohidratos, origen de materia prima ecuatoriana y que el proceso de elaboración del producto terminado sea dado en territorio ecuatoriano.

Tabla 2.1 Muestras analizadas en el método de estudio

Nombre del producto	Carbohidratos (g)	Elaborado en:
Harina de cebada (Máchica)	76	Samborondón
Avena Molida	24	Guayaquil
Harina de Arveja	20	Quito
Harina de Trigo	22	Cayambe
Mini Rosquitas de trigo	34	Guayaquil
Galletas dulces	24	Guayaquil
Tostadas de trigo	17	Guayaquil

2.3 Materiales y Equipos

2.3.1. Reactivos

Los estándares empleados en la metodología, Acrilamida en polvo y $^{13}\text{C}_3$ -Acrilamida en solución de 500 ppm, fueron suministrados por Sigma-Aldrich. Para el análisis experimental se utilizó Metanol grado HPLC (CH_3OH) al 99,8% suministrado por LOBAL Chemie (Laboratory Reagents & Fine Chemicals), India; Acetonitrilo grado HPLC ($\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$) al 99.9% suministrado por Merck, Alemania y Hexano (C_6H_{14}) para análisis al 96% suministrado por Merck, Alemania.

2.3.2. Equipos

La detección cuantitativa fue realizada en el espectrómetro de masas marca WATERS, modelo XEVO TQ MS, con fuente de ionización por ElectroSpray para un análisis rápido y eficiente de muestras complejas. La separación cromatográfica de los analitos Acrilamida y $^{13}\text{C}_3$ -Acrilamida fue efectuada utilizando el cromatógrafo líquido UPLC Acquity BSM y una columna BEH C18 de dimensiones 1.7 μm , 2.1 x 50 mm.

Para la extracción de acrilamida en las matrices alimentarias se utilizó una balanza analítica Sortarius de 4 decimales de precisión, un Vórtex Mixer marca Fisher Scientific de 10 velocidades, una centrifuga refrigerada marca BIOBASE de 4000 RPM, una sorbona extractora de gases marca BOECO, 100 tubos de centrifuga esterilizados de 15 mL, una micropipeta marca Thermo Scientific con un rango de 100 a 1000 μL , 100 viales ambar de 2 mL, 100 filtros marca Titan con tamaño de poro de 0.22 μm y 13 mm, 100

jeringuillas desechables de 3 mL, 2 pipetas graduadas de 10 mL, 4 matraces volumétricos color ámbar de 50 mL, pipetas pasteur de vidrio y un vidrio reloj.



Gráfico 2.2 Equipo de cromatografía líquida acoplado con espectrometría de masas

2.4 Metodología

2.4.1 Establecimiento de las condiciones cromatográficas

En la etapa cromatográfica, para la separación analítica se utilizó una columna BEH C18 (1.7 μm , 2.1 x 50 mm) con dos fases móviles: fase móvil A, acetonitrilo y fase móvil B agua, ambas de grado HPLC. El gradiente de elución está detallado en la Tabla 2.2, los cuales son solventes utilizados por (Jozinović et al., 2019) para la cuantificación de acrilamida en matrices alimentarias. La elución fue realizada a una temperatura de columna de 25°C y temperatura de muestra de 10°C.

Tabla 2.2 Gradiente de elución del método cromatográfico (Jozinović et al., 2019)

Tiempo (min)	Flujo [mL/min]	Gradientes de elución [% v/v]	
		Fase A	Fase B
1	0.2	90%	10%
2	0.2	10%	90%
3	0.2	90%	10%
4	0.2	90%	10%

En el minuto 1, las concentraciones iniciales fueron del 90% y 10% para las fases móviles A y B, respectivamente. Durante el minuto 2, estas varían hasta alcanzar el 10% de la

fase A y el 90% de la fase B para favorecer la elución de la molécula de interés a través de la columna y alcanzar las condiciones favorables de retención. En el minuto 3 ambas fases se re-equilibran para volver a sus condiciones iniciales y empezar el análisis nuevamente con la siguiente muestra.

2.4.2 Establecimiento de condiciones espectrométricas

La técnica utilizada para el análisis de espectrometría de masas fue la ionización molecular por electro-spray en modo positivo, también conocida como ESI por sus siglas en inglés (ElectroSpray Ionization). Los parámetros para el desarrollo espectrométrico se encuentran descritos en la Tabla 2.3. (De-Alwis et al., 2019).

Tabla 2.3 Condiciones para el equipo espectrométrico

Ionización por electrospray+	
Temperatura de desolvatación:	350°C
Voltaje de capilaridad:	0.5 V
Voltaje de cono:	20 V
Flujos de gas	
Desolvatación:	500 L/h
Cono:	25 L/h
Colisión:	0.15 mL/min

La cuantificación de acrilamida fue monitoreada considerando los iones precursores de relación masa/carga: Acrilamida (m/z 72.01 > m/z 54.93) y $^{13}\text{C}_3$ -Acrilamida (m/z 75.01 > m/z 57.89). Los análisis realizados para la validación del método fueron repetidos por 5 ocasiones, para estudiar la repetibilidad y reproducibilidad del método cuantitativo.

2.4.3 Preparación de soluciones estándar

- **Solución Madre de Acrilamida**

Se pesó 0.005 gramos del estándar de acrilamida y se disolvió con acetonitrilo HPLC en un balón volumétrico de 50 mL hasta aforación, teniendo una concentración de 100 ppm.

- **Solución de trabajo de Acrilamida**

Se tomó 1 mL de solución Madre de Acrilamida con una micropipeta y se diluyó con acetonitrilo hasta aforación en un balón volumétrico de 100 mL, para alcanzar una

concentración de trabajo de 1 ppm. Se transfirió a una botella color ámbar la cantidad de solución a ser utilizada por día de validación.

- **Solución de trabajo de $^{13}\text{C}_3$ – acrilamida**

Para la preparación de la solución de trabajo del estándar interno, se transfirió 100 μL de una solución de $^{13}\text{C}_3$ – acrilamida a un matraz volumétrico de 50 mL. Se aforó con acetonitrilo, obteniendo una concentración de 1 ppm. Se colocó en un frasco de color ámbar la cantidad a ser utilizada por día de validación y análisis de muestras.

2.4.4 Extracción de acrilamida

Se tomó como referencia las investigaciones realizadas por (De-Alwis et al., 2019) y (Santos, 2017) para determinar la metodología llevada a cabo durante la extracción de acrilamida en matrices alimenticias.

Se pesó 1.0000 ± 0.0006 g de muestra en un tubo de 15 mL con tapa rosca. En el desarrollo de la etapa de validación, la muestra base fue fortificada con los estándares de acrilamida y $^{13}\text{C}_3$ – acrilamida de acuerdo con la Tabla 2.4; mientras que, para el análisis de las matrices alimentarias, únicamente se fortificó con 200 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de $^{13}\text{C}_3$ – acrilamida.

En el siguiente paso, se añadió 6 mL de metanol y 2 mL de hexano, cuyo objetivo es extraer la acrilamida contenida en la muestra y eliminar la mayor cantidad de grasas, respectivamente. Cada tubo fue agitado en un vórtex por 3 minutos y se procedió a centrifugar a las siguientes condiciones: 4000 RPM, durante 10 minutos a una temperatura 0°C .

Una vez terminada la etapa de centrifugación, con una pipeta pasteur, se eliminó el sobrenadante correspondiente a la fase de hexano y grasas. Con una micropipeta se tomó 1 mL de la fase de metanol, se trasvasó a un tubo limpio de 15 mL con tapa rosca y se añadió 1 mL de acetonitrilo, con la finalidad de eliminar proteínas.

Se agitó nuevamente cada tubo por 2 minutos en un vórtex y se repitió la etapa de centrifugado a las mismas condiciones. Finalmente, las muestras fueron filtradas, utilizando un filtro PVDF de $0.22 \mu\text{m}$, descartando las primeras cinco gotas y recolectando el resto en viales de 2 mL de capacidad, las cuales fueron refrigeradas hasta su lectura en el equipo LC-MS/MS.

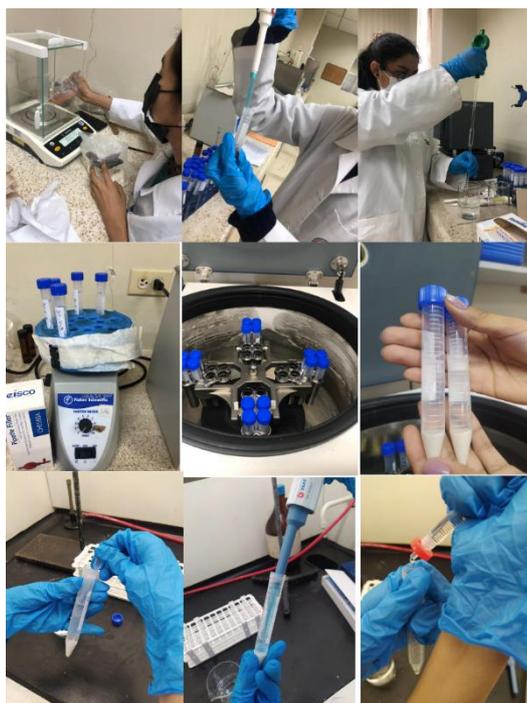


Gráfico 2.3 Pasos del proceso de extracción de acrilamida

2.4.5 Curva de Calibrado

Fue construida de acuerdo con la Tabla 2.4 a partir de la solución de trabajo de acrilamida de 1 ppm.

Tabla 2.4 Concentraciones para la curva de calibración

Tiempo (días)	Concentraciones ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
1, 2 y 3	20
	50
	100
	150
	200
	300
	400

Se realizó una curva de calibrado en matriz por cada día de trabajo. Los siete puntos correspondientes a la gráfica fueron obtenidos mediante la fortificación de una muestra blanco de arroz para cada concentración. Para la lectura en el equipo, las muestras fueron sometidas al proceso de extracción del apartado 2.4.4.

2.4.6 Validación

Se analizaron 5 muestras por nivel bajo, medio y alto. La muestra matriz (arroz pilado) fue seleccionada considerando su alto contenido en carbohidratos, su similitud con las demás muestras problema y su baja contenido de acrilamida de acuerdo con la literatura revisada. (Tateo et al., 2007)

El tratamiento se realizó en tres días diferentes, fortificadas en función a las concentraciones detalladas en la Tabla 2.5. Previo a la aplicación de la metodología explicada en el apartado 2.4.4, el arroz fue triturado y tamizado.

Tabla 2.5 Cantidades fortificadas de los estándares por nivel de medición

Nivel	Estándar acrilamida (ug/kg)	Estándar interno 13C3 acrilamida (ug/kg)
Bajo	25	200
Medio	100	200
Alto	400	200

2.4.6.1 Límite de detección y cuantificación

El Límite de Detección (LOD) es obtenido al inyectar una solución de mínima concentración del estándar de Acrilamida. Para determinar el LOD, la relación señal/ruido resultante debe ser mayor a 3.

El límite de cuantificación LOQ es establecido demostrando exactitud y precisión en el del nivel más bajo de muestras fortificadas. Estas lecturas deben mantener una relación señal/ruido mayor a 10.

2.4.6.2 Parámetros de validación

Los parámetros de validación se determinaron en función de: linealidad, exactitud y precisión.

Para el análisis de linealidad se consideraron las curvas de calibrado, mediante el cálculo de sus respectivas ecuaciones lineales, obteniendo un valor de pendiente e intercepto, coeficientes de determinación (r^2) y el coeficiente de correlación de Pearson (r).

La exactitud fue calculada utilizando el porcentaje de recuperación de los tres niveles de muestras fortificadas en los tres días de ensayo, aplicando las ecuaciones 2.1 y 2.2.

$$\%Recuperación = \frac{Concentración\ Calculada}{Concentración\ Fortificada} * 100\% \quad (2.1)$$

$$Concentración\ Calculada = \frac{Área - Intercepto}{Pendiente} \quad (2.2)$$

Previo a la determinación de precisión, se realizó la prueba de homogeneidad de varianza, también denominada test de Cochran, estableciéndose:

La hipótesis nula (H₀): No existe diferencias significativas entre varianzas.

Hipótesis alternativa (H₁): Al menos una varianza es diferente significativamente frente a las demás.

Para aceptar la hipótesis nula se debe cumplir que el valor de C_{calculado} debe ser menor al valor de C_{crítico}, obtenido en función del número de grupos o niveles “k” y el número de réplicas “γ_x”.

Aceptada la hipótesis nula (H₀), se realizó un Análisis de Varianza (ANOVA) de un factor, donde los datos de interés son los promedios de los cuadrados dentro de grupo y entre grupos, que corresponden a las varianzas de repetibilidad y reproducibilidad, respectivamente. Para el cálculo de repetibilidad y reproducibilidad se utilizaron las ecuaciones 2.3, 2.4 y 2.5, los cuales fueron expresados como desviación estándar relativa.

$$\%RDS_r = \frac{\sqrt{\sigma_{repetibilidad}}}{Concentración\ del\ nivel} * 100\% \quad (2.3)$$

$$\sigma_{reproducibilidad\ total} = \frac{\sigma_{reproducibilidad} - \sigma_{repetibilidad}}{n_{nivel}} + \sigma_{repetibilidad} \quad (2.4)$$

$$\%RDS_R = \frac{\sqrt{\sigma_{reproducibilidad\ total}}}{Concentración\ del\ nivel} * 100\% \quad (2.5)$$

Los cálculos pertinentes fueron realizados utilizando hojas de cálculo en el programa Microsoft Excel y la construcción de las gráficas con el software Python.

2.4.6.3 Rango de trabajo

Se utilizó un intervalo de trabajo entre 25 µg/kg y 400 µg/kg, debido a que la literatura consultada, una gran cantidad de productos procesados contenían acrilamida en este rango. (Mencin et al., 2020)

2.4.6.4 Objetivo de validación

Los resultados esperados para cada parámetro son establecidos considerando la Guía de Validación para Métodos de Laboratorios orientados a alimentos de consumo humano de la AOAC, representados en la Tabla 2.6

Tabla 2.6 Objetivos de validación establecidos por la AOAC. (AOAC International, 2002)

Rango de Trabajo		
25 - 400 ug/kg		
Objetivos de Validación		
Parámetro	Nivel	Criterio de aceptación
Exactitud	25	70 - 125 %
	100	70 - 125 %
	400	70 - 125 %
Precisión Repetibilidad	25	<14%
	100	<11%
	400	<9%
Precisión Reproducibilidad	25	<28%
	100	<22%
	400	<18%
Especificidad/Selectividad		Blanco de Arroz
Linealidad		r >0.990
LOQ		Nivel bajo (precisión y exactitud) Relación S/N > 10
LOD		Relación S/N > 3

2.4.7 Cuantificación de acrilamida en muestras alimentarias

Para la cuantificación de acrilamida, se analizaron 7 muestras de productos, que se encuentran indicadas en la Tabla 2.1, las cuales tienen una presentación similar a la muestra blanco utilizada para la validación del método.

Asimismo, se analizaron 5 muestras adicionales con matrices alimentarias más complejas, para estudiar el alcance del método en una mayor diversidad de productos.

Tabla 2.7 Muestras adicionales analizadas en el método de estudio

Nombre del producto	Carbohidratos (g)	Elaborado en:
Café descafeinado	1.0	Guayaquil
Café instantáneo	1.0	Quito
Chifles de sal	1.25	Quito
Chifles de dulce	40.0	Guayaquil
Chips de yuca	25.1	Cuenca

CAPITULO 3

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Validación del Método

3.1.1 Selectividad

Se realizó el proceso de extracción de una muestra de harina de arroz, para ser analizada en el equipo, obteniendo el pico de acrilamida y $^{13}\text{C}_3$ acrilamida con fragmentos: m/z 72.1 > m/z 55.1 y m/z 75 > m/z 58.1, respectivamente.



Gráfico 3.1 Picos cromatográficos correspondientes al estándar de acrilamida y al estándar interno $^{13}\text{C}_3$ acrilamida

El Gráfico 3.1 muestra los picos de las transiciones de masas de acrilamida y $^{13}\text{C}_3$ -Acrilamida fueron obtenidos en el equipo de cromatografía líquida y espectrometría de masas. Las transiciones son cercanas a las mencionados en el apartado 2.4.2.

3.1.2 Límite de detección y cuantificación

En el Gráfico 3.2, se cumplió que la relación Señal/Ruido sea mayor a 3, donde el valor fue de 9.16, por lo tanto, el pico cromatográfico permitió obtener el límite de detección a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamida.

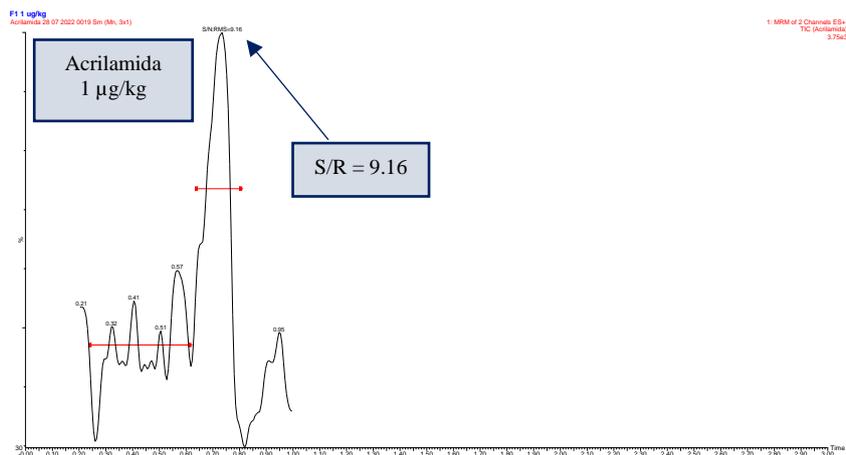


Gráfico 3.2 Límite detectado de acrilamida por el método.

Para el límite de cuantificación, el valor establecido fue de 25 µg/kg. El valor de precisión analizado para esta concentración se encontró por debajo del 11%; mientras que el valor de recuperación resultó en un rango entre 87.29% - 111.45%. Dichos resultados se encontraron dentro los objetivos de validación, por lo tanto, el límite de cuantificación fue correctamente establecido. En la Tabla 3.1 se muestran los valores de recuperación y precisión para el nivel de 25 µg/kg de los 3 días de validación.

Tabla 3.1 Precisión y Recuperación al nivel LOQ

	25 ug/kg		
	% Recuperación	%RSD _r *	%RSD _R **
Día 1	111.45	3.50	10.8
Día 2	87.29		
Día 3	93.20		

* Desviación estándar relativa por repetibilidad

**Desviación estándar relativa por reproducibilidad intermedia

De igual manera, también se estableció un límite de cuantificación de 10 µg/L, como se observa en la Gráfica 3.3, para el análisis de las matrices alimentarias, en donde se cumple la relación señal/ruido mayor a 10.

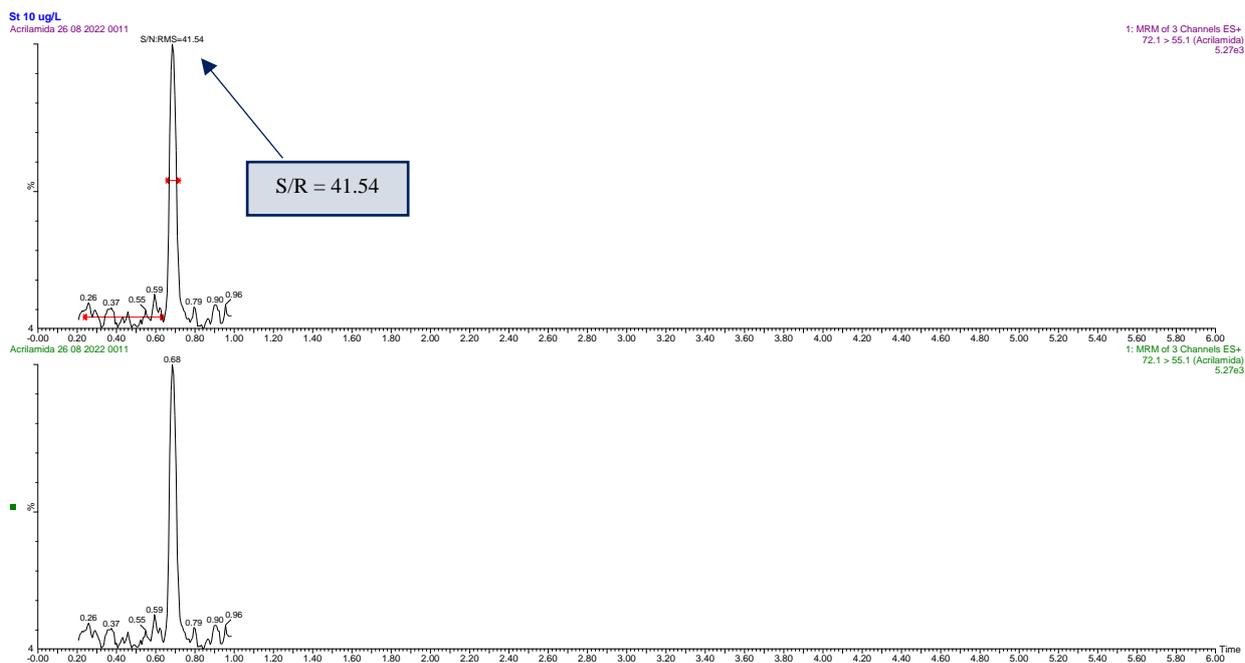


Gráfico 3.3 Límite detectado de acrilamida para la cuantificación

3.1.3 Curva de Calibrado

La curva de trabajo construida a partir de la fortificación de los estándares en las matrices mostró linealidad de acuerdo con lo observado en el Gráfico 3.4, para los tres días y niveles de validación. De la misma forma, el Gráfico 3.5 muestra una curva de calibrado con estándar directo, demostrando una buena linealidad y correlación entre los datos obtenidos.

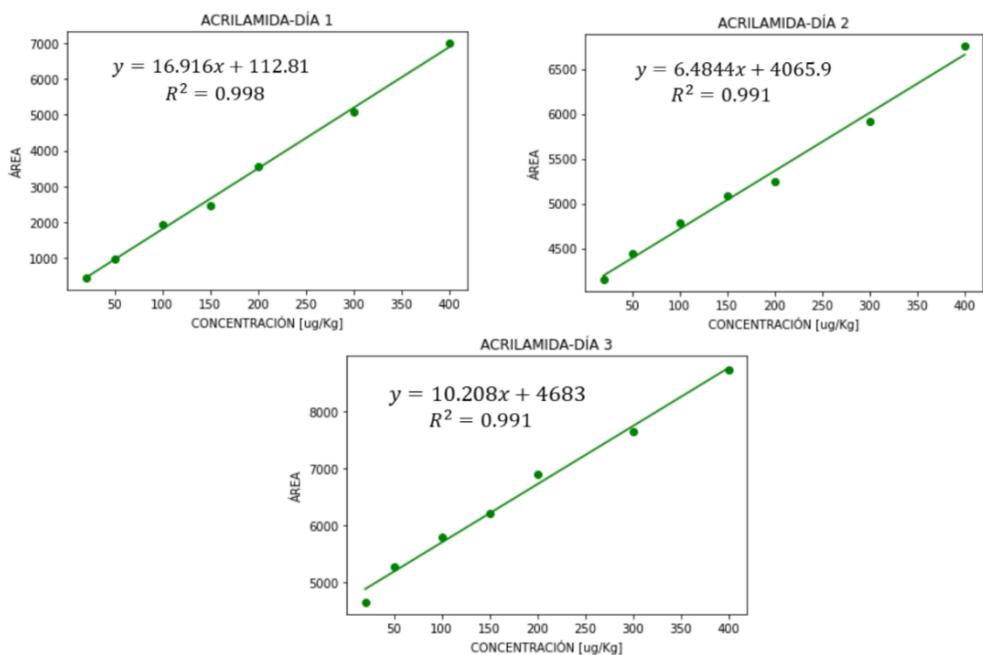


Gráfico 3.4 Curvas de calibración del estándar acrilamida para validación del método

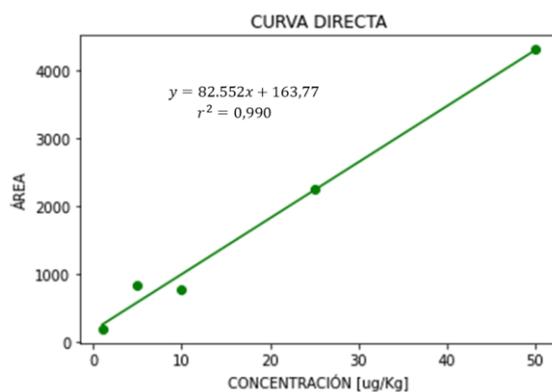
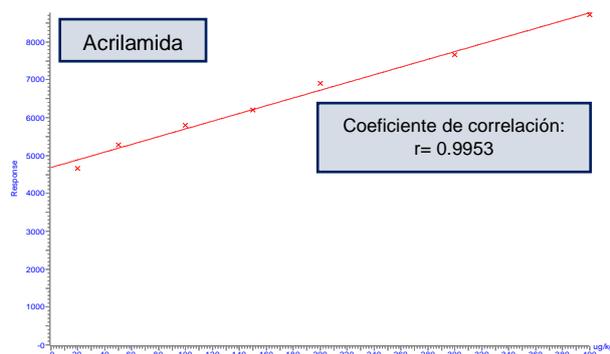


Gráfico 3.5 Curva de calibración directa del estándar acrilamida

Compound name: Acrilamida
 Correlation coefficient: $r = 0.995280$, $r^2 = 0.990582$
 Calibration curve: $10.2077 \cdot x + 4683$
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None



Compound name: $^{13}\text{C}_3$ - Acrilamida
 Correlation coefficient: $r = 0.999542$, $r^2 = 0.999085$
 Calibration curve: $38.4293 \cdot x + -10.8018$
 Response type: External Std. Area
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: Null, Axis trans: None

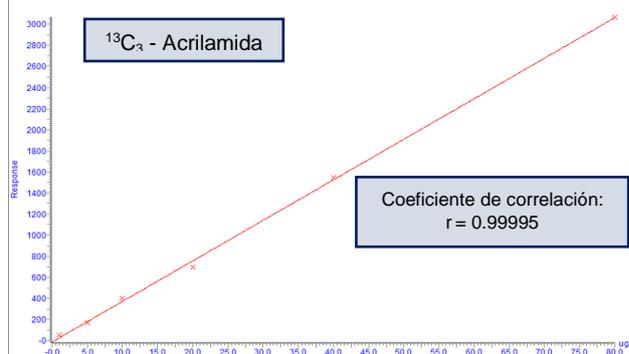


Gráfico 3.6 Curvas de calibración proporcionados por el equipo

La Tabla 3.2 resume los coeficientes de correlación y determinación, pendiente e intercepto de las tres curvas de calibración utilizadas para el proceso. El coeficiente de correlación promedio fue de 0.997, el cual es un valor cercano a los proporcionados por la literatura, como se muestra en la Tabla 3.3, cumpliendo con el criterio de aceptación establecido en la Tabla 2.6.

Tabla 3.2 Datos de regresión lineal por día de validación

	Día 1	Día 2	Día 3
Ecuación de la recta	$y = 16.916 x + 112.81$	$y = 6.4844 x + 4065.9$	$y = 10.208 x + 4683$
r^2	0.998	0.991	0.991
r	0.999	0.996	0.996

Tabla 3.3 Comparación de los coeficientes de relación con otras fuentes bibliográficas

Coefficientes	Experimentación	(Zhang et al., 2007)	(Khan et al., 2019)	(Tateo et al., 2007)
r^2	0.993	0.998	0.997	0.993
r	0.997	0.999	0.998	0.997

En la tabla A.1 en la sesión de Apéndice se encuentran los valores de lectura proporcionados por concentración fortificada.

3.1.4 Exactitud

El parámetro de exactitud fue calculado en términos de porcentaje de recuperación, el cual hace referencia a la concentración recuperada al finalizar el procedimiento.

Los resultados mostrados en la Tabla 3.4 se encontraron dentro los objetivos de validación propuestos, confirmando la funcionalidad y eficiencia del proceso de extracción de acrilamida en las muestras alimentarias. En la Tabla A.2 de la sección apéndice, se describen los valores de la variable de salida (Área) por muestra y día de validación en el rango de trabajo.

Tabla 3.4 Porcentajes de recuperación por cada nivel

Concentración (ug/kg)	Día 1 (%)	Día 2 (%)	Día 3 (%)	Promedio (%)
25	111.45	87.29	93.2	97.31
100	98.61	108.66	115.95	107.74
400	120.98	120.86	101.97	114.60

Además, en la Tabla 3.5 se especifica el porcentaje promedio de validación, el cual se encuentra por encima de los porcentajes de recuperación reportados por la literatura, indicando mayor exactitud en el método propuesto en el rango de 70-125%. De igual forma las variaciones entre los datos reportados por bibliografía se deben a los diferentes límites de detección y cuantificación propuestos, intervalos de trabajo y metodologías empleadas para la extracción de acrilamida.

Tabla 3.5 Comparación del porcentaje de recuperación con otras fuentes bibliográficas

Ensayo	Rango de trabajo	%Recuperación
Experimentación	[25 - 400] ug/kg	106.55
(Zhang et al., 2007)	[50 - 1000] ug/kg	90.22
(Khan et al., 2019)	[250 - 500] ug/kg	100.01
(Tateo et al., 2007)	[150 - 1000] ug/kg	82.00

3.1.5 Precisión

Cuando el método es realizado bajo condiciones similares se analiza repetibilidad; mientras que cuando se desarrolla con diferentes analistas, reactivos, laboratorios o intervalos de tiempos largos, se obtienen datos de reproducibilidad.

En los cálculos realizados, el término de reproducibilidad fue denominado reproducibilidad intermedia, debido a que el ensayo no fue desarrollado en distintos laboratorios, pero sí se consideró diferentes analistas y tiempo de análisis en días.

En la Tabla 3.6 se detallan los resultados de repetibilidad y reproducibilidad, los cuales cumplieron con los objetivos de validación establecidos en la AOAC, mencionado en la Tabla 2.6

Tabla 3.6 Precisión en términos %RSD_r y %RSD_R por nivel de validación

Niveles	Repetibilidad (RSD _r %)	Reproducibilidad (RSD _R %)
25	4.04	13.1
100	6.68	10.6
400	3.67	11.4

Los resultados mostraron cercanía entre los datos, al utilizar el test de homogeneidad de Cochran, donde se aceptó la hipótesis nula con un nivel de significancia <0.05.

Además, el método fue estable, debido a que el valor de desviación estándar relativa %RSD_r fue inferior a 11.33%, el cual es el promedio máximo permitido por la metodología AOAC. El método también mostró robustez, ya que factores como cambio de analista, diferentes intervalos de tiempo y uso del mismo laboratorio no influyeron significativamente para determinar la reproducibilidad del método, manteniendo valores inferiores a 22.67%.

Al compararlo con fuentes bibliográficas (Tabla 3.7), los parámetros obtenidos fueron muy cercanos a los datos proporcionados por fuentes externas, con lo cual se pudo asumir que el método tiene buena reproducibilidad, y que al ser empleado en otras circunstancias se obtendrían resultados precisos y coherentes.

Tabla 3.7 Comparación del porcentaje de recuperación con otras fuentes bibliográficas

Ensayo	Precisión	
	Repetibilidad (RSD _r %)	Reproducibilidad (RSD _R %)
Experimentación	4.80	11.7
(Zhang et al., 2007)	1.80	2.55
(Khan et al., 2019)	1.68	2.01
(Tateo et al., 2007)	4.50	NC*

*No Calculado

3.2 Cuantificación de acrilamida en muestras

La Tabla 3.8 describe el porcentaje de recuperación del patrón interno y las concentraciones de acrilamida correspondientes a cada producto detallado en la Tabla 2.1.

Tabla 3.8 Concentraciones de Acrilamida en muestras analizadas en la validación

Producto	Concentración 200 µg/kg de ¹³ C ₃ -Acrilamida	Concentración de Acrilamida observada µg/kg	%Recuperación del patrón interno	Concentración Corregida de Acrilamida µg/kg
Harina de cebada (Máchica)	148.69	11	74%	14.80
Harina de avena	139.71	6	70%	8.59
Harina de arveja	156.44	5.08	78%	6.49
Harina de trigo	148.62	1.73	74%	2.33
Mini Rosquitas de trigo	181.43	4.19	91%	4.62
Galleta Dulce	211	4.6	106%	4.36
Tostadas de trigo	164.91	2.58	82%	3.13

Todas las muestras presentaron un porcentaje de recuperación aceptable, lo cual permitió corroborar la funcionalidad del método a las condiciones establecidas. Por otro lado, en la Tabla 3.9 se detallan los resultados obtenidos para las muestras de café y snacks. Para el caso del café descafeinado e instantáneo, se observó dificultades durante la extracción del contenido lipídico debido a la formación de emulsiones durante la aplicación del método (Gráfico 3.7). Por este motivo, se planteó realizar una curva de calibración directa para su respectiva lectura, bajo las mismas condiciones cromatográficas y espectométricas. Las muestras de snacks no presentaron ningún

problema, resultando en buenos porcentajes de recuperación, comprendidas en el rango establecido.

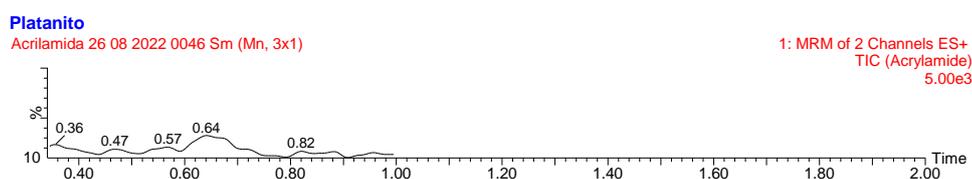
Tabla 3.9 Concentraciones de Acrilamida en muestras de café y snacks

Producto	Concentración 200 µg/kg de ¹³ C ₃ -Acrilamida	Concentración de Acrilamida observada µg/kg	%Recuperación del patrón interno	Concentración Corregida de Acrilamida µg/kg
Café Descafeinado	74.79	69.75	37%	186.52
Café Instantáneo	83.64	20.3	42%	48.54
Chifle de sal	166.43	8.5	83%	10.21
Chifle de dulce	206.17	5.8	103%	5.63
Chips de yuca	164.91	4.46	82%	5.41



Gráfico 3.7 Emulsión de una muestra de café

En el Gráfico 3.8 se observan las lecturas realizadas a las muestras adicionales, donde los tiempos de detección de acrilamida fueron de 0.64 minutos para el caso del chifle de sal y dulce, 0.65 para el café instantáneo y 0.62 para las galletas. El ruido y la forma de los picos cromatográficos se deben a las diferentes estructuras moleculares de cada alimento, ya que la composición de estos puede ocasionar variaciones en las gráficas.



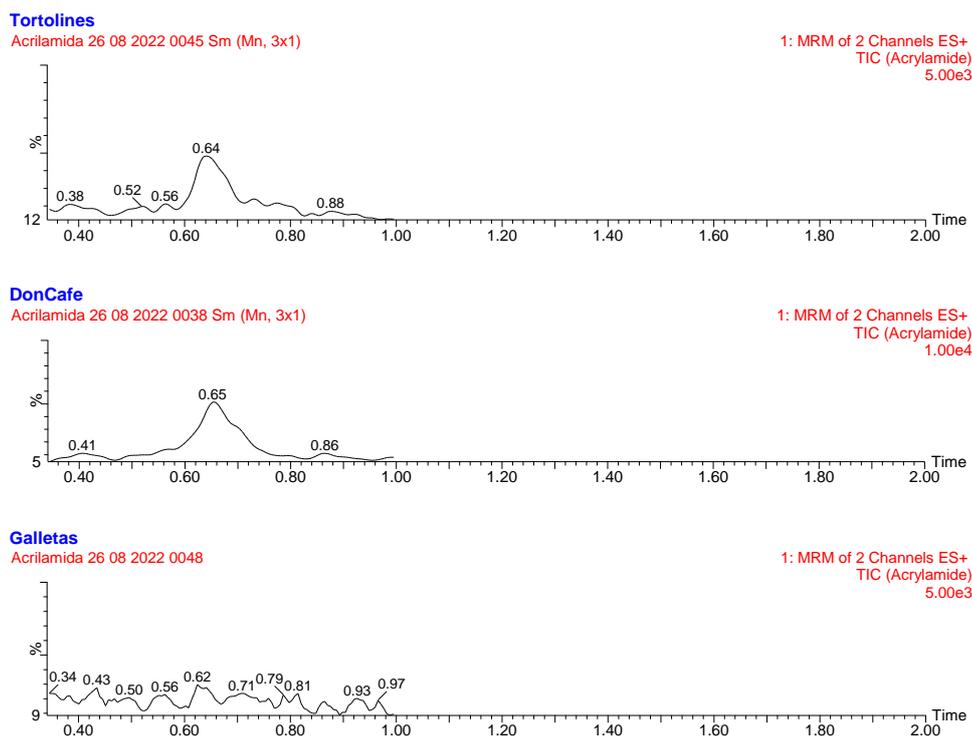


Gráfico 3.8 Lectura de acrilamida en diferentes matrices

3.3. Análisis Económico

El análisis económico fue orientado al precio final del análisis de muestras. Para esto se consideró los reactivos y materiales utilizados, así como los servicios básicos y tiempo invertido por equipo para llevar a cabo cada experimentación. El cálculo fue realizado tomando en cuenta tres escenarios diferentes, regidos por la capacidad de los equipos, por lo que el análisis económico considera el costo de uno, ocho y dieciséis muestras.

La Tabla A.11, en la sección Apéndice, detalla el volumen de reactivos consumidos por unidad de muestra, junto al precio y presentación comercial, cotizados en territorio ecuatoriano. De la misma forma, se presentan los materiales utilizados para el volumen tratado.

El costo de la energía eléctrica fue tomado del Ministerio de Energía y Minas del Ecuador, donde determinan que la tarifa nacional del servicio es de \$0.092/kWh (Ministerio de Energía y Minas, 2022), de manera que la Tabla A.12 (Apéndices) considera la potencia eléctrica del vortex mixer y la centrífuga, equipos clave para el desarrollo del análisis.

Para el costo del analista se tomó como base \$425, el cual es el Salario Básico Unificado del año 2022. Mientras que el costo por inyección de las muestras tratadas en el equipo de cromatografía líquida acoplado con espectrometría de masas fue fijado en \$50, el cual se encuentra establecido por el laboratorio externo.

Tabla 3.10 Precio final del método por cantidad de muestras

Parámetros:	Costos por muestras		
	N = 1	N = 8	N = 16
Costo por reactivos	\$ 6.10	\$ 48.78	\$ 97.55
Costo por materiales	\$ 7.76	\$ 62.08	\$124.16
Costo por servicios básicos	\$ 0.03	\$ 0.04	\$ 0.05
Costo por analista	\$ 2.43	\$ 7.08	\$ 12.40
Costo por inyección	\$ 50.00	\$ 50.00	\$ 50.00
Costo Total	\$ 66.33	\$167.98	\$ 284.16
%Contribución	30%		
Precio	\$ 94.75	\$ 239.97	\$ 405.94
% IVA	12%		
Precio Total	\$ 107.67	\$ 272.70	\$ 461.30

La Tabla 3.10 muestra los costos totales por parámetro para cada escenario analizado. Al costo total por muestra se consideró un mínimo de 30% de contribución para el laboratorio y el 12% del Impuesto al Valor Agregado. En el mercado nacional, el precio promedio para este tipo de servicios por una sola muestra es de \$219.67, por lo que el método propuesto es competitivo para el laboratorio que lo otorgue.

CAPITULO 4

4. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

La alta sensibilidad del sistema cromatográfico UPLC acoplado a un espectrómetro de masas permitió reducir los tiempos de análisis y el gasto de solventes. Para una correcta fragmentación de los iones precursores se establecieron las siguientes condiciones: temperatura de desolvatación: 350°C, tensiones capilares: 0,5 kV, tensión de cono: 20 V y caudales de gas de desolvatación, de cono y de colisión de 500 L/h, 25 L/h, 0,15 mL/min, respectivamente. Estas fueron de gran importancia para establecer una detección selectiva de los iones-padre e iones-hijo en el equipo, lo cual favoreció la obtención de picos moleculares adecuados para llevar a cabo de proceso de validación.

Al construir las curvas de calibrado, se logró observar una alta linealidad con un coeficiente de correlación promedio de 0.997. La exactitud, calculada en términos de recuperación, fue de 106.55%; mientras que para los criterios de repetibilidad y reproducibilidad se obtuvieron valores promedio de 4.80% y 11.70%, respectivamente. Estos resultados tienen similitud con los proporcionados por fuentes bibliográficas y están dentro de los parámetros establecidos por la metodología AOAC, linealidad (>0.990), exactitud (70 – 125%), repetibilidad (11.33%) y reproducibilidad (22.67%), a las condiciones establecidas, lo cual comprueba la validez del método.

El desarrollo de este método permitió conocer la concentración de acrilamida obteniendo valores de 14.80 µg/kg para harina de cebada (máchica), 8.59 µg/kg para avena molida, 6.49 µg/kg para la harina de arveja, 4.62 µg/kg para las mini rosquitas de trigo, 4.36 µg/kg para las galletas de vainilla, 3.13 µg/kg para las tostadas de trigo y 2.33 µg/kg para la harina de trigo. En cambio, para las matrices más complejas, como el café, se debe investigar con mayor detalle nuevas metodologías que permitan extraer acrilamida y eliminar componentes ácidos como la N-Acetil-β-alanina que ocasionan interferencias en las lecturas.

De acuerdo con la metodología planteada, se demostró que este cumple con los criterios de validación bajo las condiciones estipuladas en matrices alimentarias de harinas de cereales y derivados. Además de ser un método robusto que puede ser fácilmente replicable.

4.2 Recomendaciones

Para la etapa de extracción en muestras complejas se recomienda usar 0.5 gramos de cloruro de sodio (NaCl) para aumentar la carga iónica de la solución y evitar la formación de emulsiones cuando se extrae con hexano, lo que podría ocasionar pérdidas de muestra y errores en la lectura de datos.

Para muestras como café, que tienen un alto contenido de compuestos ácidos, se deben utilizar tubos de limpieza con sustancias dispersivas como PSA (amina primaria/secundaria) para la extracción de los ácidos grasos presentes en las mismas.

Se recomienda continuar con el estudio de una mayor diversidad de alimentos procesados, tomando muestras tanto de supermercados como de mercados municipales, ya que cada producto puede poseer un proceso de elaboración diferente que puede contribuir al aumento o disminución de acrilamida en el producto terminado.

BIBLIOGRAFÍA

- Alpözen, E., Güven, G., Özdestan, Ö., & Üren, A. (2015). Determination of acrylamide in three different bread types by an in-house validated LC-MS/MS. *Budapest Acta Alimentaria*, 44(2), 211–220. <http://real.mtak.hu/36136/1/aalim.2013.3333.pdf>
- AOAC International. (2002). AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. *In Food & Agriculture*.
- Arroyave, C. L., Arango, E. F., Zuleta, J. J., Restrepo, M. V., Lopera, A. J., Zuluaga, H., Pachón, I., & Botero, J. P. (2018). CROMATOGRFÍA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASA EN TÁNDEM: ¿QUÉ ES? ¿PARA QUE SE USA? *Organización Pablo Tobón Uribe*.
- Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. (2018). ESPECTROMETRÍA DE MASAS DE TIPO ELECTROSPRAY (ES/MS). *Universidad Autónoma de Madrid*.
- De-Alwis, J., Ross, E., & Williams, J. (2019). *Determination of Acrylamide in Processed Foods using ACQUITY UPLC I-Class and Xevo TQ-S micro*. <https://www.waters.com/content/dam/waters/en/app-notes/2019/720006495/720006495-en.pdf>
- Dirección Ejecutiva de la Agencia de Regulación, C. y V. S. (2016). Resolución 67 - Normativa Técnica Sanitaria para Alimentos Procesos. *Ministerio de Salud Pública*. https://www.controlsanitario.gob.ec/wp-content/uploads/downloads/2019/04/ARCSA-DE-067-2015-GGG_NORMATIVA-T%C3%89CNICA-SANITARIA-PARA-ALIMENTOS-PROCESADOS.pdf
- European Food Safety Authority. (2017). REGLAMENTO (UE) 2017/ 2158 DE LA COMISIÓN - Medidas de mitigación y niveles de referencia para reducir la presencia de acrilamida en los alimentos. *European Food Safety Authority*. <https://www.boe.es/doue/2017/304/L00024-00044.pdf>
- European Food Safety Authority. (2015). *Acrylamide*. <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/acrylamide>
- F.A. Beland, D.R. Doerge, & L.P. McDaniels. (2012). *Toxicology and carcinogenesis studies of acrylamide in rats and mice*. https://ntp.niehs.nih.gov/ntp/htdocs/lt_rpts/tr575_508.pdf
- González, V., Navarro, C., Ronco, A. M., González, V., Navarro, C., & Ronco, A. M. (2021). Acrilamida en los alimentos: Valores de referencia, recomendaciones y acciones de mitigación. *Revista Chilena de Nutrición*, 48(1), 109–117. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182021000100109>
- Hamzalioglu, A., Mogol, B. A., & Gökmen, V. (2018). Acrylamide: An overview of the chemistry and occurrence in foods. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 492–499. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.21817-9>

- INEC. (2013). *Encuesta Nacional de Salud y Nutrición*. https://www.ecuadorencifras.gob.ec/documentos/web-inec/Estadisticas_Sociales/ENSANUT/Publicacion%20ENSANUT%202011-2013%20tomo%201.pdf
- International Agency for Research on Cancer. (2018). *Acrylamide*. <https://monographs.iarc.who.int/wp-content/uploads/2018/06/mono60-16.pdf>
- International Programme on Chemical Safety. (1999). *Evaluation of substances*. <https://inchem.org/documents/iarc/monoeval/eval.html>
- Iturra, F. (2012). Determinación de residuos de metomil, carbofuran, carbarilo y profenofos en brócoli (*Brassica oleracea*) por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia acoplada a espectrometría de masas en tándem (UHPLC-MS/MS). *PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL ECUADOR*.
- Jozinović, A., Šarkanj, B., Ačkar, D., Balentić, J. P., Šubarić, D., Cvetković, T., Ranilović, J., Guberac, S., & Babić, J. (2019). Simultaneous determination of acrylamide and hydroxymethylfurfural in extruded products by LC-MS/MS method. *Molecules*, 24(10). <https://doi.org/10.3390/molecules24101971>
- Khan, M., Moniruzzaman, Md., & Razu, M. H. (2019). Method Development and Validation for the Quantification of Acrylamide in Potato Chips and Other Locally Available Food by LC-MS/MS in Bangladesh. *Food and Nutrition Sciences*, 10(07), 876–892. <https://doi.org/10.4236/FNS.2019.107063>
- Mayorga Bustinza, G. F., & del Castillo Herrera, C. B. (2010). Validación de una técnica de análisis por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para cuantificar norfloxacin y fenazopiridina clorhidrato en cápsulas orales. *UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS*.
- Mencin, M., Abramovič, H., Vidrih, R., & Schreiner, M. (2020). Acrylamide levels in food products on the Slovenian market. *Food Control*, 114, 107267. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2020.107267>
- Ministerio de Energía y Minas. (2022). *Las tarifas de energía eléctrica no se incrementarán en el 2022*. <https://www.rekursosyenergia.gob.ec/las-tarifas-de-energia-electrica-no-se-incrementaran-en-el-2022/>
- Moosavi, S. M., & Ghassabian, S. (2018). Linearity of Calibration Curves for Analytical Methods: A Review of Criteria for Assessment of Method Reliability. *Calibration and Validation of Analytical Methods - A Sampling of Current Approaches*. <https://doi.org/10.5772/INTECHOPEN.72932>
- Rifai, L., & Saleh, F. A. (2020). A Review on Acrylamide in Food: Occurrence, Toxicity, and Mitigation Strategies. *International Journal of Toxicology*, 39(2), 93–102. <https://doi.org/10.1177/1091581820902405>
- Robin, L. P., & Abt, E. (2018). Acrylamide: US fda guidance to industry. *Encyclopedia of Food Chemistry*, 487–491. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100596-5.22442-6>

- Santos, M. (2017). Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de acrilamida en tostadas de maíz procedentes de Monterrey y estimación de la exposición dietética [Tesis Doctoral]. In *Departamento de Ciencia Animal y de Alimentos*. Universitar Autònoma de Barcelona.
- Servicio de Acreditaciòn Ecuatoriano. (2022). *Organismos de Evaluaciòn de Conformidad Acreditados*. <http://servicios.acreditacion.gob.ec:50239/organismoCtrl/by-status/ACREDITADO>
- Servicio Ecuatoriano de Normalizaciòn. (2013). *CÓDIGO DE PRÁCTICAS PARA REDUCIR EL CONTENIDO DE ACRILAMIDA EN LOS ALIMENTOS (CAC/RCP 67-2009, IDT)*. <https://www.normalizacion.gob.ec/buzon/normas/CODEX-CAC-RCP-67.pdf>
- Stadler, R. H., & Studer, A. (2016). Acrylamide Formation Mechanisms. *Acrylamide in Food: Analysis, Content and Potential Health Effects*, 1–17. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00001-2>
- Tateo, F., Bononi, M., & Andreoli, G. (2007). Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(3–4), 232–235. <https://doi.org/10.1016/J.JFCA.2006.06.006>
- Uday, F. (2019). “Evaluaciòn del riesgo toxicològico de la acrilamida del cafè de las marcas m\u00e1s consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.” *Universidad de Cuenca. Facultad de Ciencias Qu\u00edmicas*.
- Valenzuela B, R., & Ronco M, A. M. (2007). ACRILAMIDA EN LOS ALIMENTOS. *Revista Chilena de Nutriciòn*, 34(1), 8–16. <https://doi.org/10.4067/S0717-75182007000100001>
- Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., & Ren, Y. (2007). An improved method validation for rapid determination of acrylamide in foods by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1142(2), 194–198. <https://doi.org/10.1016/J.CHROMA.2006.12.086>

APÉNDICE

Tabla A.1 Datos de curvas de calibración en matriz para acrilamida

	Día 1	Día 2	Día 3
Concentración µg/kg	Área	Área	Área
20	455.08	4153.614	4657.339
50	981.92	4436.241	5285.681
100	1932.54	4787.28	5806.586
150	2468.17	5080.758	6207.4
200	3546.68	5249.36	6897.983
300	5060.73	5911.44	7657.133
400	6982.32	6753.416	8722.3

Tabla A.2 Datos de la validación por día y por nivel

N° Muestras	Concentración µg /kg	Día 1	Día 2	Día 3
1	25	583.964	4212.084	4935.799
2	25	574.826	4210.106	4920.375
3	25	572.892	4207.827	4898.941
4	25	581.5	4200.267	4929.805
5	25	608.133	4206.736	4919.306
6	100	1774.4	4857.576	5970.061
7	100	1793.116	4705.08	5832.685
8	100	1675.612	4788.657	5807.903
9	100	1804.674	4768.667	5851.955
10	100	1859.003	4732.444	5870.289
11	400	8637.887	7137.887	9077.085
12	400	8201,728	7201,728	8632,252
13	400	8034,716	7234,716	8667,336
14	400	8286,94	7286,94	9011,502
15	400	8341,777	7141,777	8845,206

Gráfico A.1 Picos cromatográficos a los niveles de validación

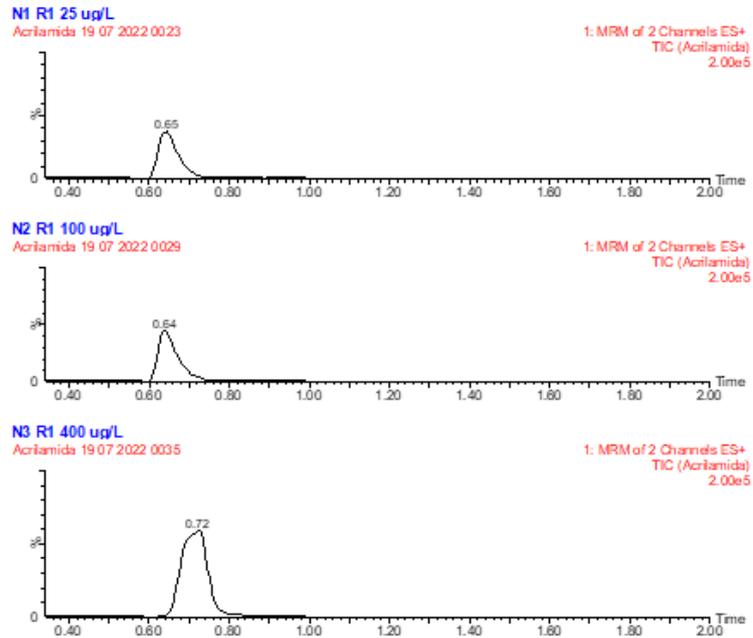


Tabla A.3 Cálculos de la concentración de acrilamida en los niveles analizados

N° Muestras	Concentración por nivel (µg/kg)	Día 1	Día 2	Día 3	Concentración (µg/kg) Dia 1	Concentración (µg/kg) Dia 2	Concentración (µg/kg) Dia 3
1	25	583.964	4212.084	4935.799	28	23	25
2	25	574.826	4210.106	4920.375	27	22	23
3	25	572.892	4207.827	4898.941	27	22	21
4	25	581.5	4200.267	4929.805	28	21	24
5	25	608.133	4206.736	4919.306	29	22	23
6	100	1774.4	4857.576	5970.061	98	122	126
7	100	1793.116	4705.08	5832.685	99	99	113
8	100	1675.612	4788.657	5807.903	92	111	110
9	100	1804.674	4768.667	5851.955	100	108	115
10	100	1859.003	4732.444	5870.289	103	103	116
11	400	8637.887	7137.887	9077.085	504	474	430
12	400	8201.728	7201.728	8632.252	478	484	387
13	400	8034.716	7234.716	8667.336	468	489	390
14	400	8286.94	7286.94	9011.502	483	497	424
15	400	8341.777	7141.777	8845.206	486	474	408

Tabla A.4 Cálculos intermedios para el parámetro de recuperación

N° Muestras	Concentración por nivel (µg/kg)	Promedio Día 1	Promedio Día 2	Promedio Día 3	%Recuperación Día 1	%Recuperación Día 2	%Recuperación Día 3
1	25	28	22	23	111.45	87.29	93.20
2	25						
3	25						
4	25						
5	25						
6	100	99	109	116	98.61	108.66	115.95
7	100						
8	100						
9	100						
10	100						
11	400	484	483	408	120.98	120.86	101.97
12	400						
13	400						
14	400						
15	400						

Gráfico A.2 Valores críticos para el test de varianza de Cochran

Level of significance $\alpha = 0.05$

k	V_x													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	36	144	∞
2	0.9985	0.9750	0.9392	0.9057	0.8772	0.8534	0.8332	0.8159	0.8010	0.7880	0.7341	0.6602	0.5813	0.5000
3	0.9669	0.8709	0.7977	0.7457	0.7071	0.6771	0.6530	0.6333	0.6167	0.6025	0.5466	0.4748	0.4031	0.3333
4	0.9065	0.7679	0.6841	0.6287	0.5895	0.5598	0.5365	0.5175	0.5017	0.4884	0.4366	0.3720	0.3093	0.2500
5	0.8412	0.6838	0.5981	0.5441	0.5065	0.4783	0.4564	0.4387	0.4241	0.4118	0.3645	0.3066	0.2513	0.2000
6	0.7808	0.6161	0.5321	0.4803	0.4447	0.4184	0.3980	0.3817	0.3682	0.3568	0.3135	0.2612	0.2119	0.1667
7	0.7271	0.5612	0.4800	0.4307	0.3974	0.3726	0.3535	0.3384	0.3259	0.3154	0.2756	0.2278	0.1833	0.1429
8	0.6798	0.5157	0.4377	0.3910	0.3595	0.3362	0.3185	0.3043	0.2926	0.2829	0.2462	0.2022	0.1616	0.1250
9	0.6385	0.4775	0.4027	0.3584	0.3286	0.3067	0.2901	0.2768	0.2659	0.2568	0.2226	0.1820	0.1446	0.1111
10	0.6020	0.4450	0.3733	0.3311	0.3029	0.2823	0.2666	0.2541	0.2439	0.2353	0.2032	0.1655	0.1308	0.1000
12	0.5410	0.3924	0.3264	0.2880	0.2624	0.2439	0.2299	0.2187	0.2098	0.2020	0.1737	0.1403	0.1100	0.0833
15	0.4709	0.3346	0.2758	0.2419	0.2195	0.2034	0.1911	0.1815	0.1736	0.1671	0.1429	0.1144	0.0889	0.0667
20	0.3894	0.2705	0.2205	0.1921	0.1735	0.1602	0.1501	0.1422	0.1357	0.1303	0.1108	0.0879	0.0675	0.0500
24	0.3434	0.2354	0.1907	0.1656	0.1493	0.1374	0.1286	0.1216	0.1160	0.1113	0.0942	0.0743	0.0567	0.0417
30	0.2929	0.1980	0.1593	0.1377	0.1237	0.1137	0.1061	0.1002	0.0958	0.0921	0.0771	0.0604	0.0457	0.0333
40	0.2370	0.1576	0.1259	0.1082	0.0968	0.0887	0.0827	0.0780	0.0745	0.0713	0.0595	0.0462	0.0347	0.0250
60	0.1737	0.1131	0.0895	0.0765	0.0682	0.0623	0.0583	0.0552	0.0520	0.0497	0.0411	0.0316	0.0234	0.0167
120	0.0998	0.0632	0.0495	0.0419	0.0371	0.0337	0.0312	0.0292	0.0279	0.0266	0.0218	0.0165	0.0120	0.0083
∞	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla A.5 Prueba de hipótesis por la prueba de Cochran

N° Muestras	Concentración por nivel (µg/kg)	Días de Validación			Varianzas					Método de Cochran		Hipótesis
		Día 1	Día 2	Día 3	Día 1	Día 2	Día 3	Máxima	Suma Total	C Calculado	C crítico	Ho = No existe diferencia significativa entre las varianzas
1	25	27.8	22.5	24.8	0.6950	0.4802	1.8864	1.8864	3.0616	0.6162	0.7071	Hipótesis Aceptada
2	25	27.3	22.2	23.3								
3	25	27.2	21.9	21.2								
4	25	27.7	20.7	24.2								
5	25	29.3	21.7	23.1								
6	100	98.2	122.1	126.1	15.6672	81.1185	37.2537	81.1185	134.0394	0.6052	0.7071	Hipótesis Aceptada
7	100	99.3	98.6	112.6								
8	100	92.4	111.5	110.2								
9	100	100.0	108.4	114.5								
10	100	103.2	102.8	116.3	171.2574	95.2069	380.0230	380.0230	646.4874	0.5878	0.7071	Hipótesis Aceptada
11	400	503.8	473.8	430.5								
12	400	478.1	483.6	386.9								
13	400	468.2	488.7	390.3								
14	400	483.1	496.7	424.0								
15	400	486.3	474.4	407.7								

Tabla A.6 Análisis de varianza de un factor para nivel de 25 µg/kg

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	5	139,318262	27,8636525	0,69498331
Día 2	5	109,111097	21,8222195	0,480202359
Día 3	5	116,499412	23,2998824	1,886405288

ANÁLISIS DE VARIANZA			
Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados
Entre grupos	99,1839958	2	49,5919979
Dentro de los grupos	12,2463638	12	1,02053032
Total	111,43036	14	

Tabla A.7 Análisis de varianza de un factor para nivel de 100 µg/kg

RESUMEN				
Grupos	Cuenta	Suma	Promedio	Varianza
Día 1	5	493,070626	98,6141253	15,66723278
Día 2	5	543,292209	108,658442	81,11849143
Día 3	5	579,730897	115,946179	37,25369392

ANÁLISIS DE VARIANZA			
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	757,332527	2	378,666263
Dentro de los grupos	536,157673	12	44,679806
Total	1293,4902	14	

Tabla A.8 Análisis de varianza de un factor para nivel de 400 µg/kg

RESUMEN				
<i>Grupos</i>	<i>Cuenta</i>	<i>Suma</i>	<i>Promedio</i>	<i>Varianza</i>
Día 1	5	2419,56253	483,912506	171,2573796
Día 2	5	2417,11616	483,423231	95,206946
Día 3	5	2039,4182	407,88364	380,0230428

ANÁLISIS DE VARIANZA			
<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>
Entre grupos	19144,7626	2	9572,38132
Dentro de los grupos	2585,94947	12	215,495789
Total	21730,7121	14	

Tabla A.9. Cálculos intermedios para los parámetros de repetibilidad y reproducibilidad

Niveles	Varianza Repetibilidad	Desviación estándar total	%RSD _r	Varianza Reproducibilidad	Varianza Interlaboratorio	Varianza de Reproducibilidad Total	Desviación estándar por reproducibilidad TOTAL	%RSD _R
25	1.0205	1.0102	4.04	49.5920	9.7143	10.7348	3.3	13.1
100	44.6798	6.6843	6.68	378.6663	66.7973	111.4771	10.6	10.6
400	215.4958	14.6798	3.67	9572.3813	1871.3771	2086.8729	45.7	11.4

Tabla A.10 Datos de curvas de calibración directa para acrilamida

Concentración µg/L	Área
1	182.32
5	836.8
10	763.49
25	2245.84
50	4302.66

Gráfico A.3. Curva de calibración directa del patrón interno

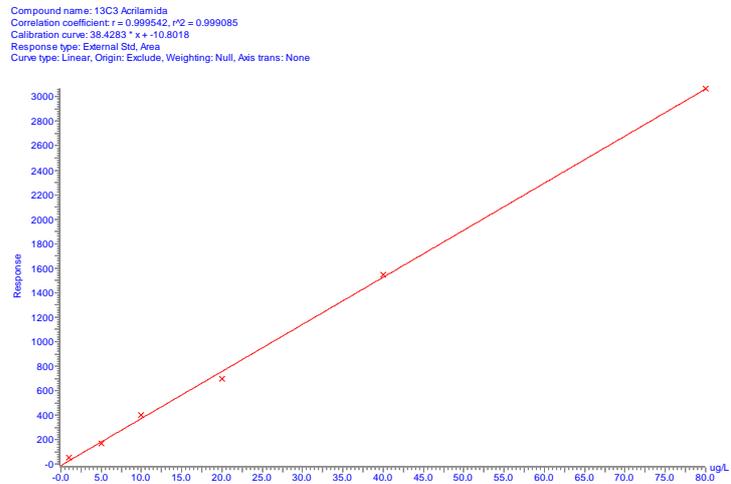


Gráfico A.4. Lecturas de patrón interno en muestras de alimentos

TargetLynx XS - MUESTRAS ANALISIS 29 AGOSTO 2022

File Edit View Display Processing Window Help

13C3 Acrilamida

Sample ID	Sample Name	Matrix	Response	Concentration (ug/L)
Acrilamida 26 08 2022 0030	Fase Movil	Solvent	121.65	2.28
Acrilamida 26 08 2022 0031	Fase Movil	Solvent	82.48	1.91
Acrilamida 26 08 2022 0042	Fase Movil	Solvent	66.80	10.57
Acrilamida 26 08 2022 0032	Cafe	Analyte	375.00	28.11
Acrilamida 26 08 2022 0050	Cafe Core	Analyte	1195.22	74.79
Acrilamida 26 08 2022 0036	Tortolines	Analyte	2771.14	164.48
Acrilamida 26 08 2022 0037	Arverja	Analyte	2629.88	156.44
Acrilamida 26 08 2022 0038	DonCafe	Analyte	1350.69	83.64
Acrilamida 26 08 2022 0039	Harina trigo	Analyte	1411.76	148.62
Acrilamida 26 08 2022 0040	Machica	Analyte	2493.69	148.69
Acrilamida 26 08 2022 0041	Galleta Dulce	Analyte	3588.49	211.00
Acrilamida 26 08 2022 0043	Grille	Analyte	2778.64	164.91
Acrilamida 26 08 2022 0044	Avena	Analyte	2335.79	139.71
Acrilamida 26 08 2022 0045	Tortolines	Analyte	2805.30	166.43
Acrilamida 26 08 2022 0046	Platanito	Analyte	3503.57	206.17
Acrilamida 26 08 2022 0047	Rosquitas	Analyte	3068.84	181.43
Acrilamida 26 08 2022 0048	Galletas	Analyte	3217.41	189.88
Acrilamida 26 08 2022 0049	Yuca	Analyte	2778.70	164.91

Gráfico A.5. Lecturas de acrilamida en muestras de alimentos

TargetLynx XS - MUESTRAS ANALISIS 29 AGOSTO 2022					
File Edit View Display Processing Window Help					
Acilamida					
Acilamida 26 08 2022 0030	Fase Movil	Solvent	41.91		0.75
Acilamida 26 08 2022 0031	Fase Movil	Solvent	32.62		0.64
Acilamida 26 08 2022 0042	Fase Movil	Solvent	17.91		2.83
Acilamida 26 08 2022 0032	Cafe	Analyte	240.55		18.17
Acilamida 26 08 2022 0050	Cafe Core	Analyte	989.24		69.75
Acilamida 26 08 2022 0036	Tortolines	Analyte	35.23		4.02
Acilamida 26 08 2022 0037	Arverja	Analyte	50.62		5.08
Acilamida 26 08 2022 0038	DonCafe	Analyte	271.54		20.30
Acilamida 26 08 2022 0039	Harina trigo	Analyte	2.03		1.73
Acilamida 26 08 2022 0040	Machica	Analyte	136.55		11.00
Acilamida 26 08 2022 0041	Galleta Dulce	Analyte	43.63		4.60
Acilamida 26 08 2022 0043	Grille	Analyte	14.36		2.58
Acilamida 26 08 2022 0044	Avena	Analyte	63.94		6.00
Acilamida 26 08 2022 0045	Tortolines	Analyte	100.22		8.50
Acilamida 26 08 2022 0046	Platanito	Analyte	61.02		5.80
Acilamida 26 08 2022 0047	Rosquitas	Analyte	37.72		4.19
Acilamida 26 08 2022 0048	Galletas	Analyte	24.47		3.28
Acilamida 26 08 2022 0049	Yuca	Analyte	41.63		4.46

Gráfico A.6. Picos cromatográficos de las muestras de café

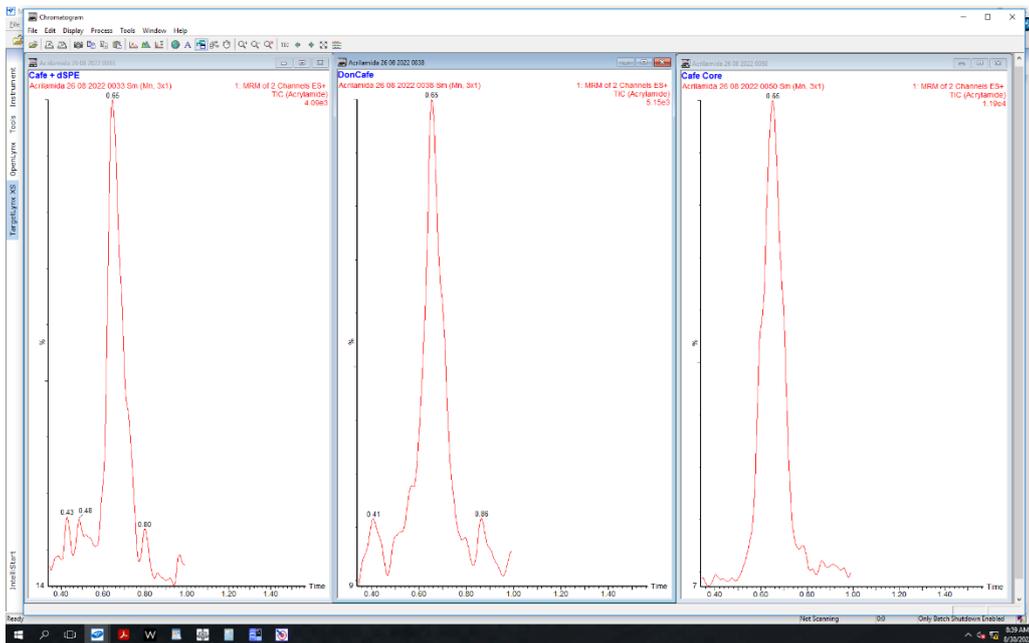


Tabla A.11 Costos de reactivos consumidos por número de muestras

Reactivo	USD	mL	USD/mL	mL usados por muestra			Costo por muestra		
				N = 1	N = 8	N = 16	\$/1 muestra	\$/8 muestras	\$/16 muestras
Metanol	\$70.56	1000	\$0.07	6	48	96	\$0.42	\$3.39	\$6.77
Hexano	\$135.07	1000	\$0.14	2	16	32	\$0.27	\$2.16	\$4.32
Acetonitrilo	\$203.61	1000	\$0.20	1	8	16	\$0.20	\$1.63	\$3.26
¹³ C ₃ Acrylamide	\$130.00	5	\$26.00	0.2	1.6	3.2	\$5.20	\$41.60	\$83.20

Tabla A.12 Costos de materiales utilizados por número de muestras

Materiales	USD	Unidad	UDS/u	Unidades usadas por muestra			Costo por muestra		
				1	8	16	\$/1 muestra	\$/8 muestras	\$/16 muestras
Jeringa de 3 mL	\$12.00	100	\$0.12	1	8	16	\$0.12	\$0.96	\$1.92
Filtro 0.22 um	\$28.99	100	\$0.29	1	8	16	\$0.29	\$2.32	\$4.64
Viales	\$35.00	100	\$0.35	1	8	16	\$0.35	\$2.80	\$5.60
Columna	\$1.400.00	2000	\$0.70	10	80	160	\$7.00	\$56.00	\$112.00

Tabla A.13 Costos energéticos utilizados por número de muestras

Equipo	Tiempo (h) N = 1	8	16	Potencia Eléctrica			Consumo eléctrico por muestra			Costo energético por muestra		
				Corriente (V)	Intensidad (A)	Potencia (W)	N = 1	N = 8	N = 16	USD	USD	USD
Centrífuga	0.33	0.33	0.33	220.00	5.00	1100.00	0.37	0.37	0.37	\$0.03	\$0.03	\$0.03
Vortex	0.08	0.67	1.33	115.00	1.30	149.50	0.01	0.10	0.20	\$0.00	\$0.01	\$0.02