



Universidad de Valladolid
Facultad de Ciencias

TRABAJO FIN DE MÁSTER

Máster en Química

ESTUDIO PARA LA DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA MEDIANTE TECNOLOGÍA NIR EN ALIMENTOS PROCESADOS

Autora: Marta del Val Armesto

*Tutor/es: Dr. Luis Mariano Debán Miguel
Dra. M.^a Isabel Campos Labadie
Departamento Química Analítica*

AGRADECIMIENTOS

A mis tutores, Luis y Maribel, por darme la oportunidad de realizar este Trabajo de Fin de Máster con ellos. Agradecerles su ayuda y dedicación a lo largo de la elaboración del trabajo, tanto de la parte experimental como de la teórica.

También quería agradecer a Javier Gamazo todo su apoyo durante estos meses.

No habría sido posible la realización de este proyecto sin cada uno de ellos.

Finalmente, gracias a la Universidad de Valladolid y a la institución CARTIF, por prestarme sus instalaciones y medios para poder elaborar este trabajo.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas	1
Resumen	3
Abstract	4
1. Introducción y antecedentes bibliográficos	5
1.1. Acrilamida	6
1.1.1. Acrilamida en alimentos	7
1.2. Formación de acrilamida	8
1.2.1. Reacción de Maillard.....	8
1.2.2. Otros factores que influyen en la formación de acrilamida	9
1.3. Métodos de detección de acrilamida: Antecedentes	10
1.3.1 Espectroscopia NIR.....	10
2. Objetivo y plan de trabajo	11
3. Materiales y equipos	12
3.1. Materiales	12
3.1.1. Reactivos y disolventes	12
3.2. Equipos	12
3.2.1. Equipo NIR.....	13
3.2.2. Equipos cromatográficos HPLC-UV/Vis	15
4. Parte experimental.....	16
4.1. Métodos de extracción de la acrilamida	16
4.1.1. Extracción con agua:acetona en % V (80:20) y los reactivos Carrez I y II.....	16
4.1.2. Extracción con agua al baño maría	18
4.1.3. Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente	19
4.1.4. Extracción con agua y agitación a temperatura 60°C.....	20
4.2. Métodos de determinación de la acrilamida	21
4.2.1. Medida con el equipo NIR.....	21
4.2.2. Calibración y validación NIR	22
4.2.3. Medida con el equipo HPLC-UV.....	23
4.2.3.1. Adiciones patrón	24
5. Resultados y discusión	25
5.1. Análisis químico	26
5.1.1. Resultados de la extracción.....	26
5.1.2. Cromatogramas obtenidos con HPLC-UV/Vis.....	27

5.2. Resultados de la calibración NIR.....	36
5.2.1 Análisis quimiométrico	36
6. Conclusiones	40
7. Bibliografía.....	41
8. Anexos.....	43
8.1. Anexo A: Listado de imágenes	43
8.2. Anexo B: Listado de tablas.....	44
8.3. Anexo C: Etiqueta nutricional del producto utilizado.....	44

Índice de abreviaturas

AA: Acrilamida

ACGIH: *American Conference of Governmental Industrial Hygienists* (Conferencia Americana de Higienistas Industriales)

CE: *European Commission* (Comisión Europea)

CIAA: *Confederation of Food and Drink Industries of the EU* (Confederación de la Industria Alimentaria en la Unión Europea)

EFSA: *European Food Safety Authority* (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria)

EPA: *Environmental Protection Agency* (Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental)

FAO: *Food and Agriculture Organization* (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)

FDA: *Food and Drug Administration* (Administración de Alimentos y Medicamentos)

FSA: *Food Standards Agency* (Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido)

GA: Glicidamida

GC-MS: *Gas Chromatography–mass spectrometry* (Cromatografía de Gases-espectrometría de masas)

HPLC-UV/Vis: *High Performance Liquid Chromatography–Ultraviolet detector* (Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia con detector Ultravioleta)

IARC: *International Agency for Research on Cancer* (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer)

JECFA: *Joint FAO/WHO Experts Committee on Food Additives* (Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios)

LC-MS: *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry* (Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas)

LC-MS/MS: *Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry* (Cromatografía de Líquidos-Espectrometría de Masas en tándem)

NIRS: *Near-Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia de Infrarrojo Cercano)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PCA *Principal Component Analysis* (Análisis de Componentes Principales)

PLSR: *Partial Least Squares Regresion* (Regresión por mínimos cuadrados parciales)

R²: Coeficiente de determinación en calibración

R²_{cv}: Coeficiente de determinación en validación cruzada

RMSEC: *Root Mean Square Error of Calibration* (Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Calibración)

RMSECV *Root Mean Square Error of Cross Validation* (Raíz Media Cuadrática del Error Típico de Validación Cruzada)

RPD: *Residual Predictive Validation* (Desviación Residual de Predicción)

SD: *Standard Desviation* (Desviación estándar)

Resumen

El pan es un alimento básico en muchos países, consumido por toda su población en una amplia gama de productos de panificación. Se ha encontrado que durante procesos de horneado y tostado a ciertas temperaturas se puede producir acrilamida, un compuesto que en determinadas concentraciones es nocivo para la salud.

La acrilamida es un compuesto formado en la reacción de Maillard, cuando reaccionan la asparagina y los azúcares reductores (glucosa) presentes en alimentos con alto contenido en almidón, al someterlos a procesos superiores a 120°C y escasa humedad.

Actualmente, los métodos utilizados implican el uso de técnicas cromatográficas de gases o líquidos con detector de masas, lo que conlleva un proceso preparatorio de la muestra además de un alto coste en tiempo y medios.

En este trabajo se pretende poner a punto un procedimiento para su determinación por cromatografía HPLC-UV/Vis con el objetivo de encontrar un método que permita contrastar los resultados con los obtenidos por espectroscopia NIR (infrarrojo cercano), realizando medidas en tiempo real, lo que supondría una gran ventaja en la industria alimenticia.

Para desarrollar un método NIR es necesario realizar múltiples medidas espectroscópicas utilizando herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos, permitiendo establecer así una relación entre los resultados obtenidos por los análisis espectroscópicos y los cromatográficos.

Palabras clave: pan, acrilamida, espectroscopia NIR (NISR), HPLC-UV/Vis, quimiometría

Abstract

Bread is a staple food in many countries, consumed by its entire population in a wide range of bread products. It has been found that during baking and roasting processes at certain temperatures, acrylamide can be produced, a compound that in certain concentrations can be harmful to health.

Acrylamide is a compound formed in the Maillard reaction, when asparagine and the reducing azures (glucose) present in foods with high starch content react, when subjected to processes higher than 120°C and low humidity.

Currently, the methods used involve the use of gas or liquid chromatographic techniques with mass detector, which entails a preparatory process for the sample as well as a high cost in time and means.

In this work we try to develop a procedure for its determination by HPLC-UV / Vis chromatography with the aim of finding a method that allows to compare the results with those obtained by NIR (near infrared) spectroscopy, making real-time measurements. It would be a great advantage in the food industry

To develop a NIR method it is necessary to perform multiple spectroscopic measurements using chemometric tools for data processing, thus establishing a relationship between the results obtained by the spectroscopic and chromatographic analyzes.

Key words: bread, acrylamide, NIR spectroscopy (NISR), HPLC-UV/Vis, chemometrics.

1. Introducción y antecedentes bibliográficos

La acrilamida, desde hace unos años, ha pasado a ser un compuesto de estudio debido a sus posibles efectos neurotóxicos, genotóxicos y cancerígenos en seres humanos. Se produce cuando tiene lugar la reacción de Maillard, es decir, la reacción entre la asparagina y los azúcares reductores presentes en los alimentos al someterlos a procesos de fritura, horneado o tostado. Por esta razón, alimentos como el pan, galletas, patatas fritas, cereales, etc. están siendo estudiados ya que muchos de ellos forman parte de nuestra dieta diaria.

En este trabajo se pretende llevar a cabo el estudio de la detección de la acrilamida en pan de molde comercial de marca blanca mediante tecnología NIRS, evaluando su potencial como herramienta de análisis aplicada a la industria alimenticia.

Para poder establecer un modelo NIR (*Imagen 1*) es necesario realizar análisis químicos y espectroscópicos. El primero de ellos consiste en proponer un método para la extracción de la acrilamida de la muestra y su posterior determinación por cromatografía de líquidos (HPLC-UV/Vis), llevándose a cabo en muestras previamente contaminadas con una concentración de AA conocida. El segundo análisis consiste en medir la muestra contaminada (de concentración conocida) por tecnología NIR. Finalmente, con los datos obtenidos por ambos análisis y mediante herramientas quimiométricas, se establece una relación entre los espectros NIR y la concentración de AA, con el fin de comprobar las posibilidades del procedimiento para determinaciones, mediante esta técnica, en tiempo real, permitiendo así minimizar costes y tiempos de análisis.

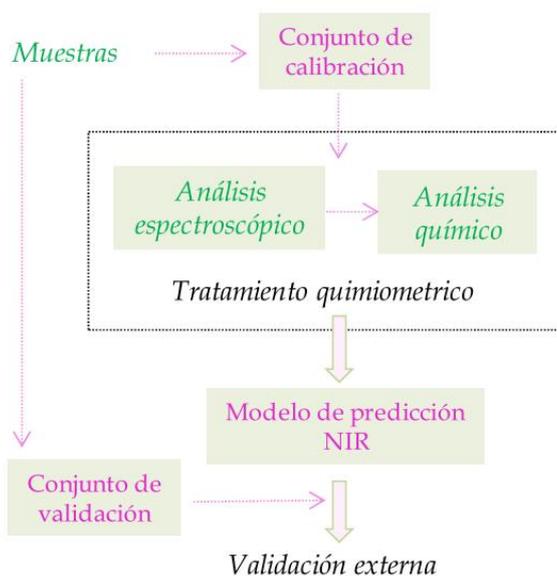


Imagen 1 Esquema de trabajo para el desarrollo del modelo de predicción NIR¹.

Actualmente, las aplicaciones de la espectroscopia NIR abarcan el análisis de productos agroalimentarios, farmacéuticos, de fibras textiles, industria química y petroquímica, e incluso aplicaciones médicas, entre otros diversos ámbitos.

Por otra parte, el pan es un importante componente alimentario y un recurso alimentario básico en muchos países. Es el resultado de la cocción de una masa obtenida por la mezcla de harina de trigo, sal y agua, fermentada por especies de microorganismos propias de la fermentación panaria como el «*Saccharomyces cerevisiae*».

El pan de molde se elabora con harina de trigo blanco o integral que se enriquece con azúcar, mantequilla y otras grasas y desempeña un papel importante en la dieta habitual de niños y adolescentes debido a sus características organolépticas. Sin embargo, tanto en su proceso de elaboración como en la forma de consumo (horneado o tostado), existe la posibilidad de formarse compuestos como la acrilamida que, a determinadas concentraciones, puede ser un posible riesgo para la salud debido a sus características neurotóxicas y cancerígenas. Además se ha comprobado que la concentración de acrilamida está relacionada con el grado de tostación (*Imagen 2*), es decir, cuanto mayor es la tostación, más oscuro es el pan y mayor contenido de sustancia presenta².

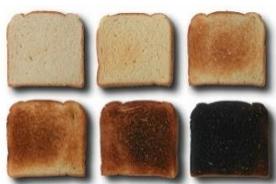


Imagen 2 Pan en diferentes grados de tostación.

1.1. Acrilamida

La acrilamida (prop-2-enamida) o AA, es un compuesto de tipo amida polar, inodoro, sólido y blanco a temperatura ambiente. Posee bajo peso molecular (71,08 g/mol) y es soluble en agua y en otros disolventes como etanol, metanol, éter, cloroformo.... En estado sólido es estable a temperatura ambiente, pero puede polimerizarse al reaccionar con agentes oxidantes formando las poliacrilamidas^{3,4}.

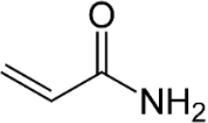
ACRILAMIDA ICSC: 0091		
Propiedades físicas		
	Punto fusión	84,5 °C
	Densidad (25°C)	1,13 g/cm ³
	Solubilidad en agua (25°C)	2040 g/L

Tabla 1 Propiedades físicas de la acrilamida⁵.

El riesgo para los seres humanos es debido a que su metabolismo hepático (*Imagen 3*) ocasiona glicidamida (GA)⁶, un epóxido que puede reaccionar con proteínas (como la hemoglobina) o con el ADN formando aductos y causar daños en el organismo debido a su actividad genotóxica^{4,7}.

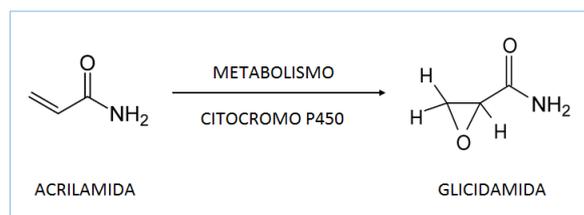


Imagen 3 Formación de glicidamida por medio de una epoxidación (2,3-epoxipropionamida).

1.1.1. Acrilamida en alimentos

Esta sustancia está relacionada con el procesamiento de alimentos ricos en almidón a altas temperaturas (por encima de 120°C) y con baja humedad⁸. Entre los alimentos que pueden reunir estas características se encuentran el pan, cereales, galletas, patatas fritas, etc..., es decir en alimentos que han pasado por un proceso de fritura, asado u horneado. Además se ha demostrado que existen otros factores que influyen directamente sobre la formación de esta sustancia, entre los que se encuentran el tiempo de tratamiento, la temperatura, el valor del pH e incluso el grosor del producto⁹.

Multitud de organizaciones como: La Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC), la Comisión Europea (CE), la Agencia Estadounidense de Protección Medioambiental (EPA), la Conferencia Americana de Higienistas Industriales (ACGIH), entre otras, clasificaron esta sustancia como probable carcinógeno y mutageno^{4,8}. A su vez, el Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA, 2005) estableció que es un compuesto de carácter neurotóxico¹⁰.

La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) realizó un informe¹¹ durante el período de 2007 a 2010, donde se describen los resultados del seguimiento de acrilamida en 25 países. En este periodo de tiempo, se estudió que la exposición a la acrilamida se encuentra en patatas fritas (entre 270-675 µg/Kg), galletas (entre 79-86 µg/Kg), productos de panadería (entre 75-1044 µg/Kg), cereales (entre 138-149 µg/Kg), café instantáneo (entre 229-1123 µg/Kg)...etc¹².

Dichos valores hay que contrastarlos con los indicativos establecidos por la CE (2011)¹³, que en el caso del pan, este valor es de 150 µg/Kg¹¹ diario.

Finalmente, EFSA ha determinado que, aunque los estudios epidemiológicos no han confirmado que sea un compuesto cancerígeno humano, los niveles de exposición actuales suponen una preocupación con respecto a estos efectos cancerígenos¹⁴.

La CE avaló una serie de medidas voluntarias para reducir la presencia de acrilamida en alimentos entre las que se encuentran las “ToolBox”, cajas de herramientas elaboradas por la Confederación de la Industria Alimentaria en la Unión Europea (CIAA), que detallan los métodos existentes para reducir la acrilamida en los alimentos tras realizar estudios acerca de su formación^{15,16}. No obstante, existen otros organismos como la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA), la Agencia de Normas Alimentarias del Reino Unido (FSA), etc..., que también están implicadas en concienciar a la población de los efectos de la acrilamida y en disminuir su contenido en los alimentos⁴.

1.2. Formación de acrilamida

1.2.1. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard¹⁸ (*Imagen 4*) implica una cascada de mecanismos por los cuales se desarrollan el aroma, el color y la textura de los alimentos cocidos. En esta reacción tiene lugar la formación de productos intermedios capaces de formar acrilamida a través de diferentes vías, cuando reaccionan la asparagina y un azúcar reductor (glucosa) en procesos de altas temperaturas y escasa humedad.

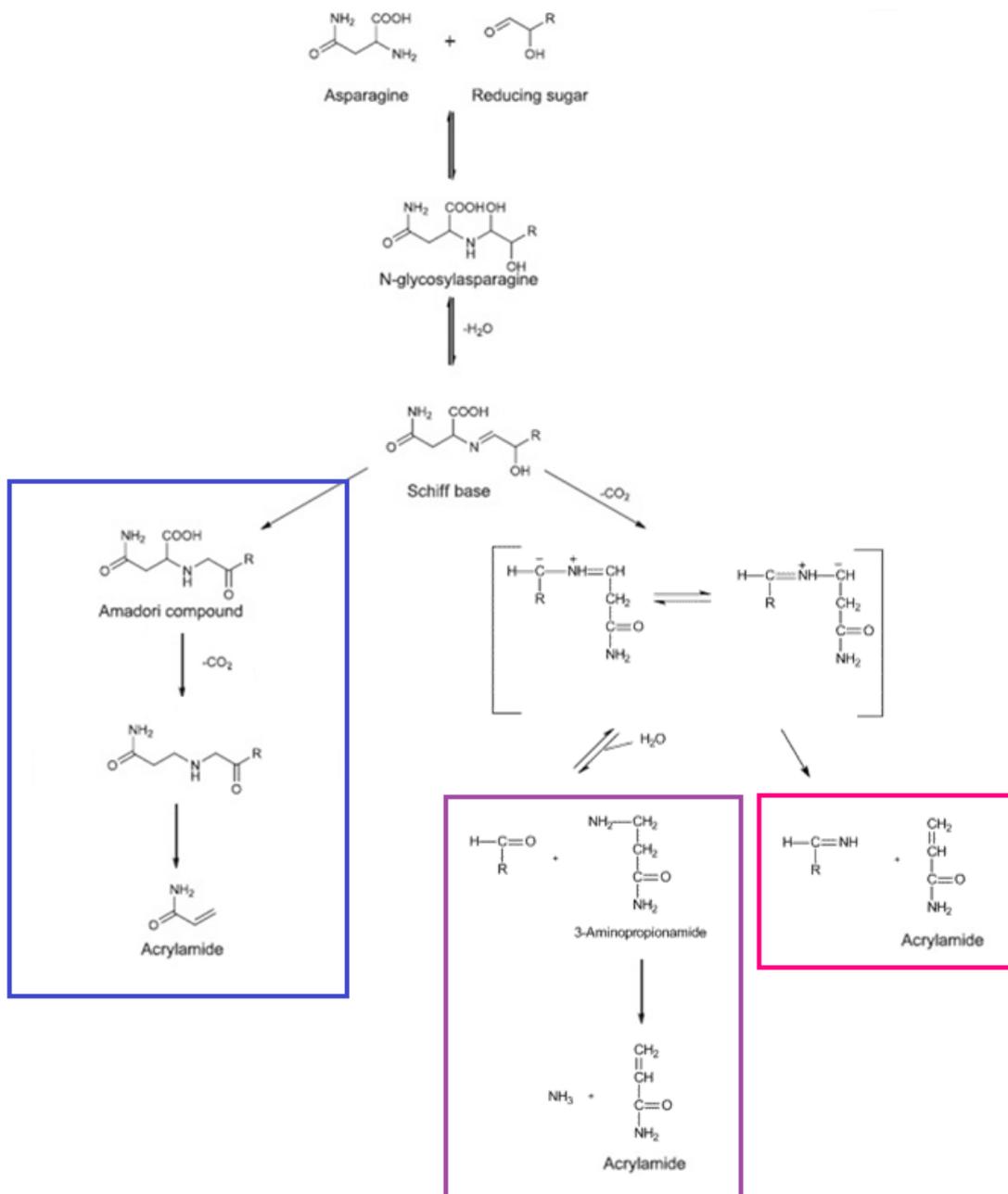


Imagen 4 Reacción de Maillard. En azul marcada la vía 1, en morado la vía 2 y en rosa la vía 3^{19,20}.

El primer paso es una condensación amino-azúcar entre la asparagina y la glucosa, formando N-glicosilasparagina (glucosamina), que, tras la pérdida de una molécula de agua, da lugar a la base de Schiff, el compuesto principal a partir del cual se forma la acrilamida por distintos mecanismos^{19,20}:

Por una parte, a partir de la transposición de la base de Schiff se forma el compuesto de Amadori, que, tras su descarboxilación y una posterior β -eliminación de hidrógeno, da lugar a la AA (Vía 1).

Por otra parte, bajo calor, la base de Schiff se descarboxila formando un producto que, o bien puede hidrolizarse para formar 3-aminopropionamida (3-APA), intermedio altamente reactivo que puede degradarse aún más cuando se calienta formando AA mediante la eliminación de amoníaco (Vía 2); o bien la base de Schiff descarboxilada puede descomponerse directamente formando AA mediante la eliminación de una imina (Vía 3).

La formación de AA por la Vía 3 está relacionada con la temperatura de reacción, evidenciándose concentraciones de AA a temperaturas cercanas a 120°C; sin embargo, por la Vía 2 no se presenta AA hasta alcanzar temperaturas superiores a 160°C.

1.2.2. Otros factores que influyen en la formación de acrilamida

Entre ellos se encuentran el tiempo de tratamiento, la temperatura, el valor del pH y el grosor del producto^{4,17}.

➤ Tiempo de tratamiento y temperatura

Cuando el tratamiento tiene lugar entre temperaturas de 120°C y 185°C (y escasa humedad), la formación de acrilamida aumenta.

➤ Composición química de los alimentos

La AA se forma a partir de sus precursores, principalmente azúcares reductores y asparagina. Sin embargo, existen otras moléculas precursoras como 3-aminopropanamida (3-APA), que también influyen en su formación.

➤ pH de los alimentos

Cuanto más ácido es el pH, la velocidad de las reacciones de degradación térmica de la AA aumenta. A pH bajo el grupo α -amino de la L-asparagina se protona y como consecuencia disminuye su potencial nucleófilo.

➤ Grosor del alimento

Cuanto menor espesor tenga el alimento (en este caso la rebanada de pan) mayor relación superficie/volumen, por tanto mayor será la formación de acrilamida.

1.3. Métodos de detección de acrilamida: Antecedentes

Habitualmente su detección se realiza a través de métodos estándar como son la cromatografía de líquidos o gases acoplada a un espectrómetro de masas (LC-MS, LC-MS/MS, GC-MS...) ^{2,21,22}, presentando ventajas como alta sensibilidad, especificidad y repetibilidad, sin embargo, son poco aconsejables debido a su detección lenta y al alto coste del equipo y su mantenimiento.

Existen otros métodos más rápidos que actualmente están adoptando interés como son los métodos de indicación de color ²³, métodos de ensayo inmuno-enzimático (ELISA) ²⁴, métodos basados en biosensores electroquímicos ²⁵ o métodos de detección fluorescentes ²¹. No obstante, para este segundo tipo de métodos se deben analizar múltiples muestras de alimentos y realizar numerosos estudios e investigaciones para verificar su versatilidad en el futuro.

Sin embargo, existe otro método rápido de detección denominado espectroscopia de infrarrojo cercano (NIRS), que permite la detección de acrilamida en alimentos y que es el utilizado en este trabajo.

1.3.1. Espectroscopia NIR

Desde la década de los 70 se establece como una técnica alternativa a los métodos químicos y químico-biológicos tradicionales. El desarrollo de la informática y la posibilidad de utilizar ordenadores con mayor capacidad de cálculo y memoria, ayudó a obtener y almacenar gran cantidad de información espectral, ya que en el NIR no se producen picos aislados característicos para cada compuesto, sino que hay superposición de bandas correspondientes a diferentes grupos funcionales. Su auge como técnica de análisis fue en los años 80 y 90 gracias a los avances tecnológicos, cuando se hizo posible el registro de espectros de manera rápida y reproducible (instrumentos de barrido, interferómetros...) ^{26,27}.

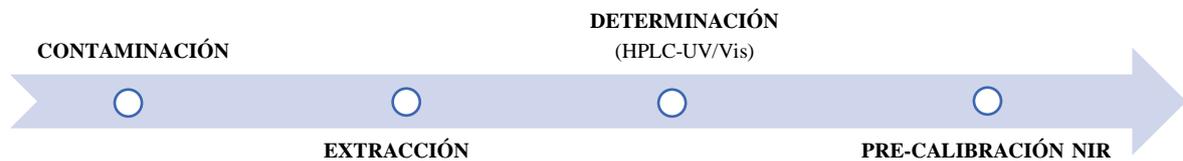
2. Objetivo y plan de trabajo

Objetivo general:

Realizar una serie de ensayos en base a los cuales poder obtener resultados preliminares sobre la relación entre la cantidad de acrilamida previamente añadida a un pan de molde, la determinada (previa extracción) por HPLC/UV-Vis y los correspondientes espectros NIR.

Plan de trabajo:

- I. Contaminación de muestras de pan de molde comercial de marca blanca con una concentración de acrilamida conocida.
- II. Extracción del compuesto mediante diferentes procedimientos.
- III. Determinación y cuantificación de la acrilamida extraída mediante cromatografía de líquidos con detector ultravioleta (HPLC-UV/Vis).
- IV. Pre-calibración NIR:
 - A. Obtener el espectro NIR de la muestra contaminada.
 - B. Establecer una ecuación entre la cantidad de acrilamida añadida conocida y el espectro.
- V. Discusión de resultados.



3. Materiales y equipos

3.1. Materiales

3.1.1. Reactivos y disolventes

Nombre	Características
Agua desionizada	PURELAB Classic, Elga
Acetona	≥99.5%, Sigma-Aldrich
Acetonitrilo	HPLC, ≥99.9%, Sigma-Aldrich
Metanol	HPLC, ≥99.9%, Sigma-Aldrich
Acrilamida	≥99.0%, Sigma-Aldrich
Asparagina	≥98.0%, Sigma-Aldrich
Reactivo Carrez I	Disolución de 239g de Zn(O ₂ CCH ₃) ₂ / 1L de agua, Sigma-Aldrich
Reactivo Carrez II	Disolución de 107g de K ₄ [Fe(CN) ₆] *3H ₂ O / 1L de agua, Sigma-Aldrich

Tabla 2 Reactivos y disolventes utilizados.

3.2. Equipos

Nombre	Modelo
Equipo de ultrasonidos	Ultrasonic LC 304
Centrifugadora	Allegra 64R, Rotor: F1010
Centrifugadora	Centrifuge BEi, sin rotor
Equipo HPLC-UV/Vis	Agilent Technologies 1200 Series
Equipo NIR	MPA (Multi Purpose Analyzer), Bruker Optics
Agitador vibrador	Vibromatic, P SELECTA
Agitador multipuesto	OVAN
Balanza analítica	Precisa

Tabla 3 Equipos utilizados.

Otro Material

Material habitual de laboratorio: termómetros, espátulas, probetas, matraces aforados, placas de vidrio, etc.

3.2.1. Equipo NIR

La tecnología NIR se caracteriza por no necesitar tratamiento previo de la muestra, ser rápida y precisa. Además es una técnica no destructiva, que no requiere el uso de reactivos y es económica en cuanto al coste de la medida. Permite el análisis multicomponente y medir en tiempo real. Sin embargo, el coste del equipo es alto y el tratamiento de los datos requiere el uso de programas estadísticos.

Esta técnica está incluida en el campo de la espectroscopia molecular, que estudia la interacción de la radiación electromagnética con la materia. La longitud de onda en el espectro se mide normalmente en nanómetros y su zona espectral (*Imagen 5*) está situada entre la región visible y la región infrarroja (entre 800 nm a 2.500 nm). En términos de frecuencia, la región recoge información desde 4.000 a 12.000 cm^{-1} .

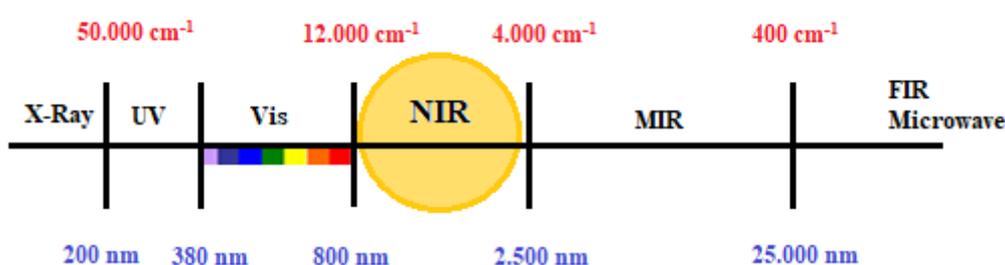


Imagen 5 Espectro electromagnético.

Su funcionamiento es el siguiente (*Imagen 6*): la radiación electromagnética utilizada se dirige a la muestra y se modifica de acuerdo con la composición de esta. La luz modificada se detecta y las modificaciones espectrales se convierten en información sobre la composición de la muestra. Esta conversión de algoritmos son las llamadas “calibraciones”.

Los mecanismos por los cuales la radiación actúa sobre la muestra son reflectancia, transmitancia, transreflectancia e interactancia-reflectancia. En nuestro caso se ha utilizado reflectancia difusa.

La reflectancia es más favorable para muestras sólidas, ya que la radiación penetra entre 0.1-1 mm sobre la superficie de la muestra. En este mecanismo, las dos componentes de la reflexión (especular y difusa), contienen información acerca de la composición de la muestra, especialmente la componente difusa, por lo que es la base de las medidas en la región del infrarrojo cercano. La radiación penetra perpendicularmente unos milímetros en la muestra y posteriormente es reflejada y recogida por un detector ubicado a 45° del rayo de luz incidente y en el mismo lado que la fuente emisora. En este caso, el paso óptico es indeterminado.

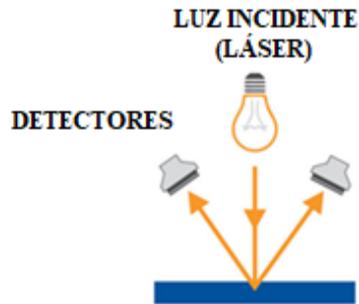


Imagen 6 Modo de reflectancia NIR.

La absorción en el infrarrojo cercano corresponde a sobretonos y bandas de combinación de las vibraciones fundamentales observadas en el infrarrojo medio, existiendo la posibilidad de que las bandas de combinación correspondan a más de dos vibraciones diferentes. Sin embargo, estas vibraciones deben corresponder al mismo grupo funcional y deben tener la misma simetría. De esta manera, las bandas O-H, N-H, C-H, S-H, entre otras, se pueden observar debido a su alta absorción en esta región espectral.

Por lo tanto, esta tecnología nos permitiría cuantificar parámetros nutricionales básicos (como proteínas, humedad, grasa, almidón...), o bien controlar la calidad del alimento y determinar los aminoácidos totales y/o digestibles en ingredientes, pigmentos/color, adulterantes/contaminantes...

En este trabajo, el equipo NIR empleado consiste en un espectrómetro de infrarrojo cercano por Transformada de Fourier FT-NIR, que abarca desde 15.000 hasta 3.600 cm^{-1} (660-2780 nm), dependiendo del tipo de medida y del detector. Las medidas se realizan por reflectancia empleando el módulo de esfera integradora, diseñado para la medida directa de un área de muestra de 15 mm^2 de diámetro, utilizando en este modo un detector de PbS ($12.800\text{-}3.600 \text{ cm}^{-1}$).



Imagen 7 Equipo NIR utilizado en este trabajo.

3.2.2. Equipo cromatográfico HPLC-UV/Vis

La cromatografía es una técnica que permite separar, aislar e identificar los componentes de una mezcla de compuestos químicos. La separación tiene lugar cuando una fase móvil (líquido filtrado y desgasificado para evitar flujos inestables, formación de burbujas o interferencia de partículas extrañas) que transporta la muestra, fluye a través de una columna que contiene a la fase estacionaria (formada por moléculas de sílice o polímero), de tal manera que la separación va a depender del grado de interacción entre ambas fases. En este caso la detección se lleva a cabo con un detector ultravioleta (UV/Vis).

En esta técnica, el análisis cualitativo está basado en la medida de parámetros cromatográficos (tiempos de retención) mientras que el análisis cuantitativo está basado en la medida de las áreas de los picos cromatográficos que se relacionan con la concentración.

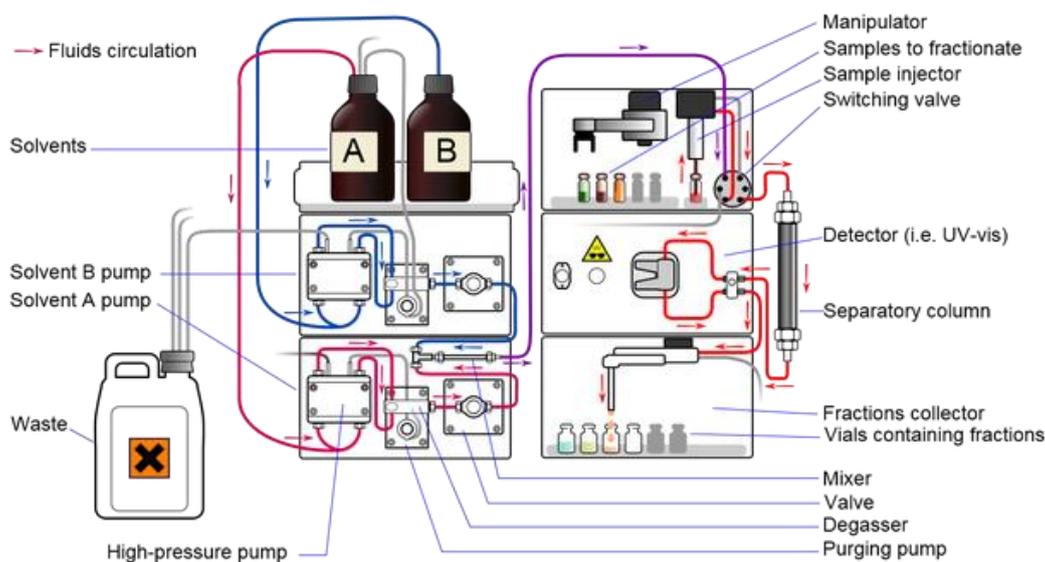


Imagen 8 Equipo cromatográfico HPLC-UV/Vis²⁸.



Imagen 9 Equipo de cromatografía HPLC-UV/Vis utilizado en este trabajo.

4. Parte experimental

4.1. Métodos de extracción de la acrilamida

Se quiere determinar el contenido de AA en muestras de pan de molde comercial de marca blanca. Para ello, la sustancia se contamina con una cantidad conocida de acrilamida y después se lleva a cabo su extracción mediante diferentes metodologías: extracción con agua:acetona en %V (80:20) y los reactivos Carrez I y II; extracción con agua al baño maría; extracción con agua y agitación a temperatura ambiente, y extracción con agua y agitación a temperatura 60°C. Todos los procesos se realizan por triplicado y se explican a continuación.

➤ Preparación de muestras

El procedimiento para la contaminación de las muestras en todos los procesos es el mismo. Se pesan 4 g de muestra que nos garantizan la realización de las extracciones y de las medidas al menos por triplicado y se contaminan utilizando concentraciones de acrilamida entre 0,1 y 20,0 ppm. Para garantizar el carácter homogéneo de la contaminación, se añade siempre el mismo volumen de disolución por gramo de muestra, en concreto, 1 mL/g.

4.1.1. Extracción con agua:acetona en %V (80:20) y los reactivos Carrez I y II

A. Procedimiento experimental

Se pesa 1 g de las muestras tratadas con 1 mL de disolución de AA de diferentes concentraciones conocidas, con el objetivo de detectar entre 0,1 y 20,0 ppm de acrilamida. Se añade un volumen de 8 mL en %V agua:acetona (80:20), se agita durante 30 s y se centrifuga. Una vez centrifugado se deshecha el sólido que queda en el fondo del tubo y se añade a la fase acuosa 1 mL de Carrez I (disolución de ferrocianuro de potasio) y 1 mL de Carrez II (disolución de acetato de zinc), tornándose la disolución de un color amarillento y formándose un precipitado blanquecino resultado de las proteínas, grasas, hidratos de carbono del alimento y posiblemente del precipitado de ferrocianuro de zinc. Se centrifuga de nuevo, se desecha el sólido y se enrasa a un volumen final de 10 mL.

B. Preparación de disoluciones patrón de acrilamida

Se prepara un patrón de 1000 ppm a partir del cual se preparan otros patrones de concentración: 1, 5, 10, 20, 50, 100 y 200 ppm.

Extracción con agua:acetona en %V (80:20) y los reactivos Carrez I y II		
1	2	3
Preparación de las muestras de pan y las disoluciones patrón. Empapar los 4 g de muestra con 4 mL de disolución y dejar secar 24 h.	Muestras secas tras 24 h.	Homogeneizar la muestra.
		
4	5	6
Pesar 1g de muestra en cada tubo y añadir 8 mL de la mezcla agua:acetona (80:20).	Agitar todos los tubos durante 30 s.	Baño de ultrasonidos durante 5 min.
		
7	8	9
Centrifugar y desechar el sólido.	Añadir los reactivos Carrez I y Carrez II.	Segunda centrifugación.
		
10		
Fase acuosa restante enrasada a un volumen de 10 mL.		
		

Tabla 4 Primer procedimiento de extracción.

4.1.2. Extracción con agua al baño maría

A. Procedimiento experimental

Se pesa 1 g de las muestras tratadas con 1 mL de disolución de AA de diferentes concentraciones conocidas, con el objetivo de detectar entre 2,0 y 20,0 ppm de acrilamida. Se deposita en un cartucho poroso, se tapa con algodón y se introduce en un Erlenmeyer con aproximadamente 100 mL de agua desionizada. Se deja al baño maría durante 24 h y posteriormente se filtra, para eliminar posibles impurezas sólidas, con un filtro de poro de 0,45 μm , enrasando finalmente al volumen de 100 mL.

B. Preparación de disoluciones patrón de acrilamida

Se prepara un patrón de 2000 ppm a partir del cual se preparan otros patrones de concentración 200, 500, 1000, 2000 ppm.

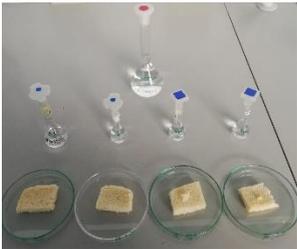
Extracción con agua al baño maría	
1	2
Preparación de las muestras de pan y las disoluciones patrón. Empapar los 4 g de muestra con 4mL de disolución y dejar secar 24 h.	Muestras secas tras 24 h y trituradas.
	
3	4
Introducción de la muestra en el cartucho y todo ello en un Erlenmeyer.	Baño maría durante 24 h.
	

Tabla 5 Segundo procedimiento de extracción.

4.1.3. Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente

A. Procedimiento experimental

Se pesa 1 g de las muestras tratadas con 1 mL de disolución de AA de diferentes concentraciones conocidas, con el objetivo de detectar entre 1,0 y 5,0 ppm de acrilamida. Se añade a un tubo de centrifuga junto con 8 mL de agua desionizada, se agita durante 90 min y posteriormente se centrifuga 10 min a 4000 rpm. Finalmente se filtra para eliminar posibles impurezas sólidas, con un filtro de poro de 0,45 μm , enrasando finalmente al volumen de 10 mL.

B. Preparación de disoluciones patrón de acrilamida

Se prepara un patrón de 100 ppm a partir del cual se preparan otros patrones de concentración 10, 20 y 50 ppm.

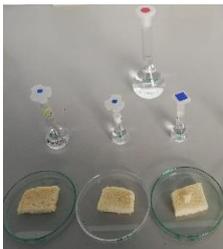
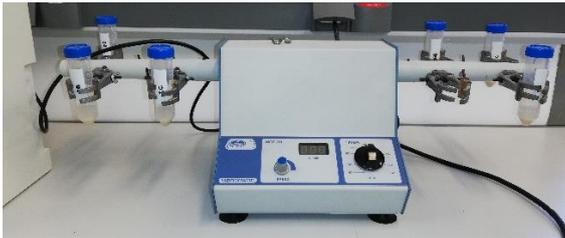
Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente	
1	2
Preparación de las muestras de pan y las disoluciones patrón. Empapar los 4 g de muestra con 4mL de disolución y dejar secar 24 h.	Muestras secas tras 24 h y trituradas.
	
3	
Introducción de la muestra en un tubo de centrifuga y agitar 90min.	
	

Tabla 6 Tercer procedimiento de extracción.

4.1.4. Extracción con agua y agitación a temperatura 60°C

A. Procedimiento experimental

Se pesa 1 g de las muestras tratadas con 1 mL de disolución de AA de diferentes concentraciones conocidas, con el objetivo de detectar entre 1,0 y 5,0 ppm de acrilamida. Se añade a un tubo de centrifuga junto con 75 mL de agua desionizada, se agita durante 90 min a 600 rpm y posteriormente se centrifuga 10 min a 4000 rpm. Finalmente se filtra para eliminar posibles impurezas sólidas, con un filtro de poro de 0,45 µm, enrasando finalmente al volumen de 100 mL.

B. Preparación de disoluciones patrón de acrilamida

Se prepara un patrón de 1000 ppm a partir del cual se preparan otros patrones de concentración 100, 200 y 500 ppm.

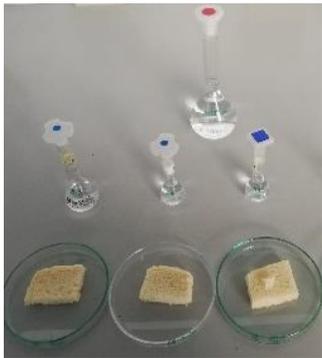
Extracción con agua y agitación a temperatura 60°C	
1	2
Preparación de las muestras de pan y las disoluciones patrón. Empapar los 4 g de muestra con 4 mL de disolución y dejar secar 24 h.	Muestras secas tras 24 h y trituradas.
	
3	
Introducción de la muestra en un matraz y ponerlo en agitación con Tª 60°C	
	

Tabla 7 Cuarto procedimiento de extracción.

4.2. Métodos de determinación de la acrilamida

4.2.1. Medida con el equipo NIR

Se procede como pre-calibración, al tratamiento de unas treinta muestras de pan de molde con diferentes concentraciones de acrilamida, con el objetivo de establecer una relación entre la cantidad añadida y sus espectros NIR. El equipo, dotado de un láser de He-Ne, emite luz roja con una longitud de onda de 633 nm.

A. Procedimiento experimental

Se toman 4 g de cada una de las muestras contaminadas con concentraciones desde 0,05 hasta 5,00 ppm y se mide su absorbancia, empleando 32 y 64 barridos (condicionados por las posibilidades del equipo) en un rango de frecuencias comprendido entre 4000 y 12000 cm^{-1} .

B. Preparación de disoluciones patrón de acrilamida

Se prepara un blanco de agua desionizada y una disolución patrón de 100 ppm a partir de la cual se preparan disoluciones de concentraciones entre 0,05 y 5,00 ppm para 32 muestras de pan.

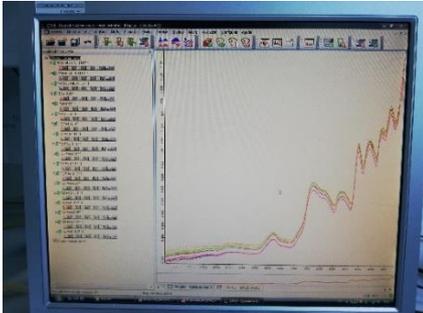
Espectroscopia NIR	
1	
Preparación de las muestras de pan. Empapar los 4 g de muestra con 4 mL de disolución y dejar secar 24 h.	
	
2	3
Introducción de la muestra en el equipo NIR.	Medida directa de la absorbancia de la muestra.
	

Tabla 8 Procedimiento de determinación de acrilamida mediante espectroscopia NIR.

4.2.2. Calibración y validación NIR

Una vez se han realizado las medidas de las muestras de pan contaminadas con acrilamida mediante el equipo NIR y se ha obtenido su espectro, se procede a realizar la calibración del equipo. Debido a que las bandas de espectros NIR son anchas y se superponen, el desarrollo de aplicaciones cuantitativas se basa en la obtención de calibraciones a través de métodos multivariantes para lograr el ajuste lineal de la información disponible. Además, las muestras a las que se va a aplicar el modelo desarrollado han de estar bien representadas en el conjunto de calibración y deben presentar todas la misma matriz que la utilizada en la construcción del modelo.

Los modelos de calibración se han desarrollado mediante regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), utilizando el software quimiométrico OPUS/QUANT™ versión 7.0 y empleando el método de validación cruzada. La capacidad de predicción de las ecuaciones obtenidas se determina con sus respectivos coeficientes de determinación (R^2 , R^2_{cv}), los errores de predicción (RMSEC, RMSECV) y la desviación residual de predicción (RPD).

Como se ha mencionado anteriormente, se establecen 32 y 64 barridos para la realización de la medida espectral de cada muestra contaminada, con el objetivo de aumentar el número de mediciones y observar si hay diferencias al aumentar el número de barridos. Se programa el equipo para que realice la medida por triplicado, aplicando a cada muestra el número de barridos establecidos. Se obtienen seis espectros para cada muestra, tres de ellos tomados a 32 barridos y otros tres a 64, ambos realizados con una resolución de 16 cm^{-1} . El tiempo de adquisición para cada grupo de espectros fue de 10,08 y 20,22 s, respectivamente.

Para la optimización del proceso de calibración se llevan a cabo tres procesos:

1. Análisis de componentes principales (PCA)

Es una técnica estadística de síntesis de información o de reducción de la dimensión (número de variables). Los nuevos factores (variables latentes) serán una combinación lineal de las variables originales, y además serán independientes entre sí (ortogonales). En este estudio se manejan únicamente los espectros de las muestras contaminadas y mediante los gráficos de puntuación (Score Plot) se estudia cuales no pertenecen o se desvían del conjunto de calibración.

2. Detección y eliminación de valores atípicos (*outliers*)

Un valor atípico es una observación numéricamente distante del resto de los datos. Las estadísticas derivadas de los conjuntos de datos que incluyen *outliers* serán frecuentemente engañosas, por lo que para su detección se emplean la *Distancia de Mahalanobis* (que indica como de diferente es el espectro de la muestra del espectro promedio de la población) y el residuo espectral (que es la diferencia entre el espectro medido y el que se espera teóricamente a partir del análisis de los factores del modelo de calibración).

3. Aplicación de pre-procesamientos matemáticos

Como la señal de absorción es a menudo débil (si se compara con todos los efectos de dispersión), es necesario procesar matemáticamente los datos espectrales con el fin de extraer información valiosa de las propiedades químicas de las muestras.

➤ Calibración del equipo

El programa recoge la información de todos los espectros obtenidos para los 32 y 64 barridos de las 32 muestras de estudio anteriormente mencionadas, y proporciona el error de calibración (RMSEC) y el coeficiente de determinación R^2 .

➤ Calibración del equipo con método de validación cruzada

Consiste en tomar los datos originales y crear a partir de ellos dos conjuntos separados: un grupo de muestras se saca del conjunto de calibración y se utiliza para validar el modelo desarrollado con el grupo de muestras restante. Este proceso se repite sucesivamente hasta que todas las muestras han sido analizadas. Para establecer el subconjunto de validación se excluye un 10% del conjunto de calibración, en este estudio el conjunto de muestras de calibración se divide en subconjuntos de 3 muestras. De este proceso se obtienen el error en validación cruzada (RMSECV), el coeficiente de determinación R^2_{CV} y la desviación residual de predicción (RPD). Las mejores calibraciones se seleccionan en base a los valores más altos de R^2_{CV} y RPD y de menor RMSECV²⁹.

- RMSECV: medida cuantitativa de la precisión del modelo desarrollado y del coeficiente de determinación (R^2_{CV}), determinado a partir de los valores de referencia (valor real) frente a los valores predichos por los modelos NIR (valor predicho).
- RPD: relación entre la desviación estándar de los datos obtenidos mediante el análisis de referencia (SD de referencia) y el error estándar de predicción de validación cruzada de los mismos (SECV), cuyo valor ideal debe ser superior a 2,5-3,0. Si bien en los casos en los que la desviación estándar (SD) es menor de la unidad, puede no llegarse a ese valor ideal. Esto ocurre cuando el conjunto de muestras no se encuentra distribuidas homogéneamente en todo el rango de calibración.

4.2.3. Medida con el equipo HPLC-UV/Vis

Una vez se ha extraído la muestra con las diferentes metodologías explicadas anteriormente, se procede al estudio de la concentración extraída con el objetivo de poner a punto uno de los métodos de extracción utilizados.

Para la medida con el equipo cromatográfico, en primer lugar hay que determinar la longitud de onda óptima de absorción de la sustancia. En este caso se utilizó un detector diodo array y el resultado obtenido fueron 210 nm, valor fijado en el detector ultravioleta del equipo HPLC-UV/Vis.

En segundo lugar, se determinan las condiciones de la fase móvil en base a previos estudios realizados. Como la acrilamida es un compuesto polar, la fase móvil tiene que ser polar para extraer el compuesto más rápidamente, haciéndolo pasar por una fase estacionaria apolar contenida en la columna. Las condiciones establecidas fueron: 60% agua, 10% metanol y 30% acetonitrilo.

Una vez determinado el tiempo y el área del pico de la sustancia, para cuantificar la cantidad de AA que presentan las diferentes disoluciones se realiza el método de adiciones patrón.

4.2.3.1. Adiciones patrón

Permiten calcular la concentración de sustancias que se encuentran en una pequeñísima proporción del total de la muestra, así que cuánto más baja resulta su concentración, esta será medida con un margen de error mayor.

Es cierto que las muestras están contaminadas con una concentración de AA conocida, por tanto, si el método de extracción fuera óptimo, se debería detectar la misma cantidad con la que se ha contaminado el pan. No obstante, nuestra muestra es compleja y hay que tener en cuenta el efecto matriz ya que la existencia de interferentes (proteínas, ácidos grasos, carbohidratos de carbono... no eliminados tras su extracción) influiría en su medida. Para poder cuantificar cuanta acrilamida se ha extraído de verdad, se necesitan realizar adiciones patrón sobre la muestra.

A. Procedimiento experimental

Después de su extracción, se añade 1 mL de la disolución de acrilamida extraída a un matraz aforado de 10 mL. A continuación se realizan adiciones de 1.0, 2.0 y 5.0 mL de concentraciones 2,0 y 20,0 ppm y finalmente se enrasa al volumen establecido (*Imagen 10*). Las concentraciones de interés son 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 y 10.0 ppm. Finalmente, se miden las muestras por HPLC-UV/Vis en las condiciones establecidas anteriormente (60% agua, 10% metanol y 30% acetonitrilo).

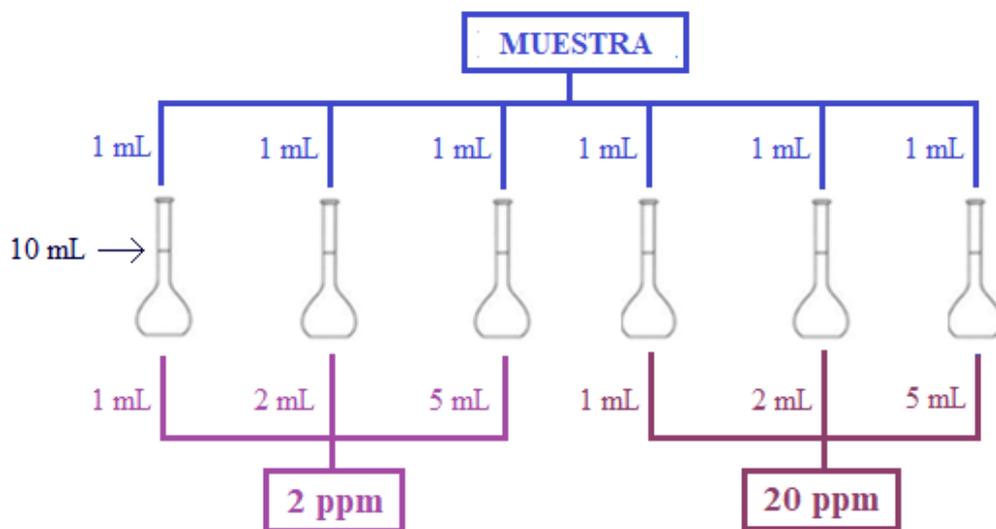


Imagen 10 Procedimiento de adiciones patrón.

5. Resultados y discusión

El alimento de estudio es pan de molde comercial de marca blanca, cuya información nutricional (*Anexo C: Etiqueta nutricional del producto utilizado*) se recoge en la *Tabla 9*.



Información nutricional (valores medidos por 100 g)	
Valor energético	1,102 kJ / 261 kcal
Grasas	4,5 g
de las cuales Saturadas	1 g
Hidratos de carbono	45 g
de los cuales Azúcares	6 g
Fibra alimentaria	4,1 g
Proteínas	8,1 g
Sal	1,3 g

Tabla 9 Valores nutricionales del pan de estudio.

También puede contener grasas monoinsaturadas y poliinsaturadas (como omega 3 y omega 6), vitaminas (A, B₆, B₉, C...), minerales (fosforo, hierro, magnesio...), triptófano (aminoácido que forma las proteínas), etc.

El porcentaje de hidratos de carbono (45%) corresponde principalmente al almidón (C₆H₁₀O₅)_n, un polisacárido compuesto por amilosa y amilopectina. No obstante también presenta un 6% de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa...) y un 4,1% de fibra, un compuesto formado por celulosa, glucosa, galactosa, arabinosa, sustancias pépticas, etc.

5.1. Análisis químico

5.1.1. Resultados de la extracción

Tras llevar a cabo la extracción de la acrilamida a partir de las cuatro metodologías diferentes y realizar las adiciones patrón, el resultado del % de sustancia extraída se recoge en la *Tabla 10*.

- Procedimiento 1: Extracción con agua:acetona en % V (80:20) y los reactivos Carrez I y II.
- Procedimiento 2: Extracción con agua al baño maría.
- Procedimiento 3: Extracción con agua y agitación a temperatura 60°C.
- Procedimiento 4: Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente.

Concentraciones añadidas (ppm)	% de acrilamida extraída				
	Proced. 1	Proced. 2		Proced. 3	Proced. 4
1	-	-	-	43,45	7,08
2	9,78	4,42	5,05	9,41	7,97
5	3,44	4,20	4,57	7,03	7,97
10	-	2,02	5,73	-	-
20	1,44	2,28	1,19	-	-

Tabla 10 Resultados obtenidos para las cuatro metodologías utilizadas para la extracción de la acrilamida.

En los procedimientos 1, 2 y 3 se observa que a mayor concentración de acrilamida, mayor es su retención en el alimento.

En el procedimiento 1, el uso de los reactivos Carrez ocasiona la formación de un precipitado blanquecino de ferrocianuro de cinc, junto a las proteínas, carbohidratos, etc..., lo cual puede causar la retención de la acrilamida por adsorción. Se observa que al aumentar 10 veces la concentración, se aumenta aproximadamente 10 veces la retención.

En el procedimiento 2, lo que se hace es una extracción con agua a unos 60°C durante 24 h. Se observa que los valores obtenidos son constantes, en torno al 4-5%, pero con muy bajo rendimiento.

Con el procedimiento 3, se obtiene la mayor cantidad extraída (43,45%) para bajas concentraciones, sin embargo para altas concentraciones el rendimiento sigue siendo muy bajo, del orden del 7%.

Finalmente, el procedimiento 4 proporciona una extracción más o menos constante de la sustancia, en torno al 8%.

De todo lo anterior, concluimos que los resultados en cuanto a la extracción de la acrilamida para concentraciones superiores a 2 ppm en muestras de pan son de muy bajo rendimiento; no obstante para bajas concentraciones, los resultados más satisfactorios son los obtenidos con el procedimiento 3, con agua y agitación a temperatura 60°C.

5.1.2. Cromatogramas obtenidos con HPLC-UV/Vis

Como se ha explicado anteriormente (4.2.3), la longitud de onda óptima de absorción fueron 210 nm y las condiciones de la fase móvil fueron: 60% agua, 10% metanol y 30% acetonitrilo.

Se determinaron el tiempo y las áreas del pico del compuesto y se realizaron adiciones patrón para cuantificar la cantidad de AA que presentan las diferentes extracciones. Las medidas se contrastaron con los correspondientes blancos en cada caso. Los resultados obtenidos se recogen a continuación.

En primer lugar, las *Imágenes 11* y *12* recogen información de dos disoluciones de acrilamida de diferentes concentraciones (20 y 200 ppm) en agua desionizada. En ambos casos se observa un pico predominante en torno a 1,5 min, así como un aumento en la intensidad del pico y en su área cuando se aumenta su concentración.

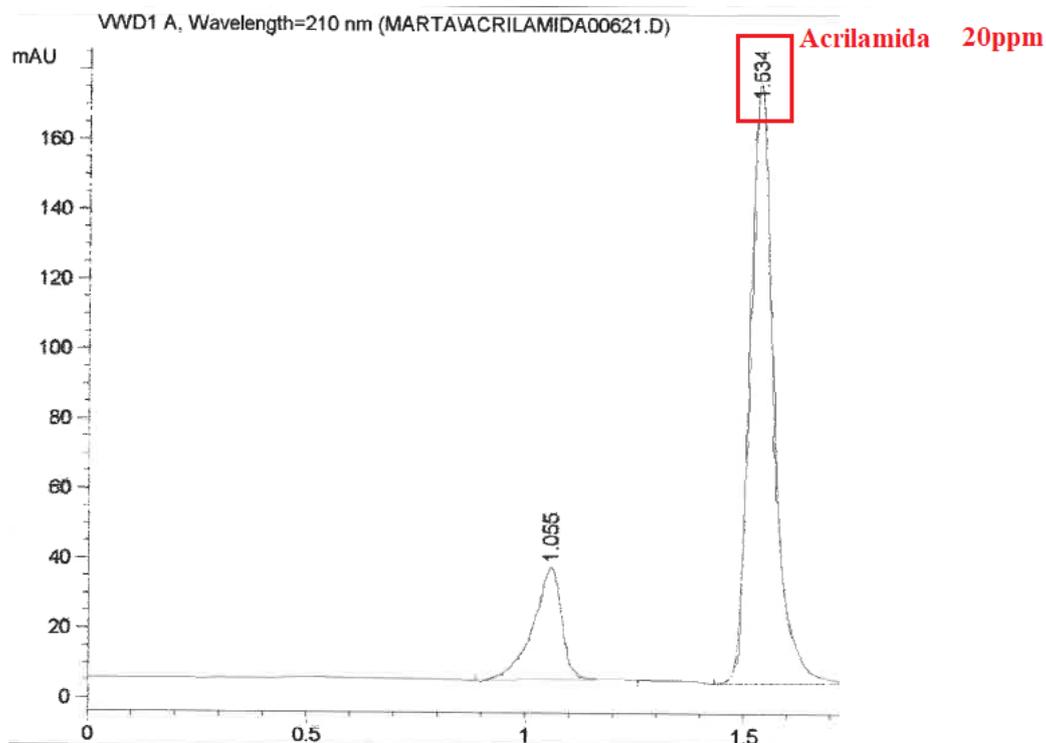


Imagen 11 Cromatograma correspondiente a una disolución de 20 ppm de acrilamida en agua desionizada.

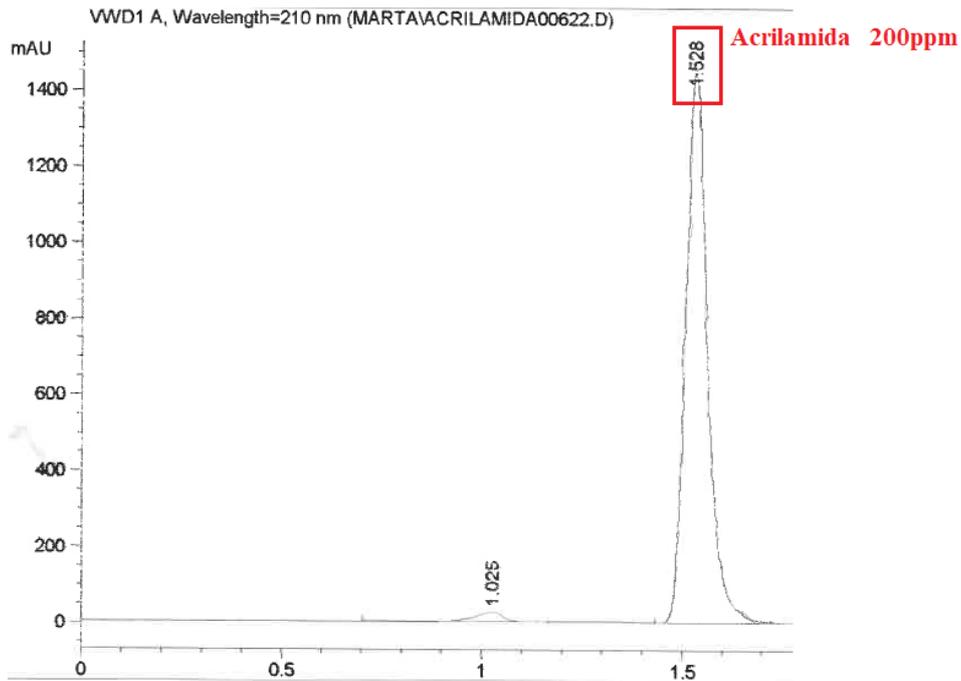


Imagen 12 Cromatograma correspondiente a una disolución de 200 ppm de acrilamida en agua desionizada.

A continuación y en relación al primer procedimiento de extracción, se midió una disolución de 200 ppm de acrilamida en agua:acetona en % V (80:20), observándose en la *Imagen 13* el pico de la AA en 1,5 min y un nuevo pico a 1,9 min que, en principio, podría ser la acetona .

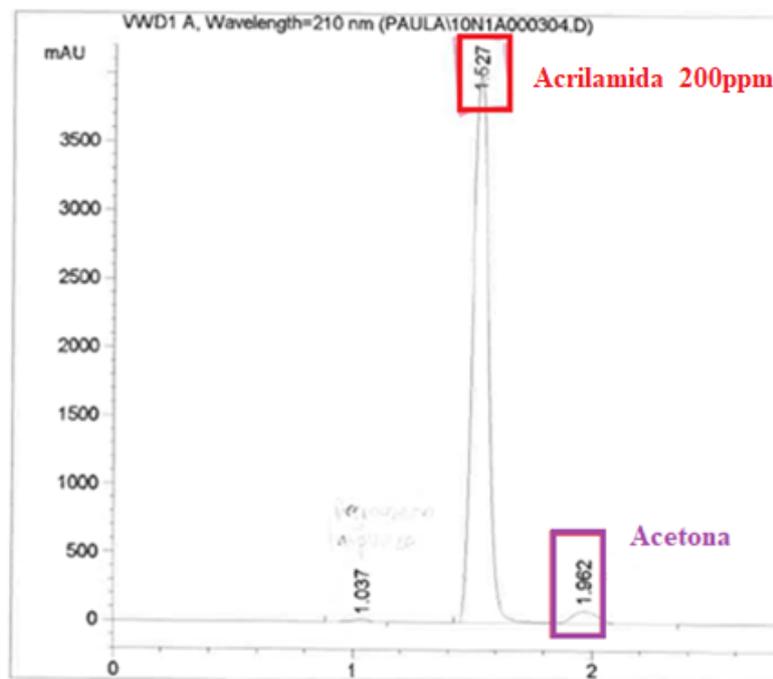


Imagen 13 Cromatograma correspondiente a una disolución de 200 ppm de acrilamida en de agua:acetona en %V (80:20).

Para comprobar que el pico corresponde al disolvente, se midió una disolución de agua:acetona en %V (80:20), verificándose en la *Imagen 14* que efectivamente, el pico de 1,9 min corresponde a la acetona.

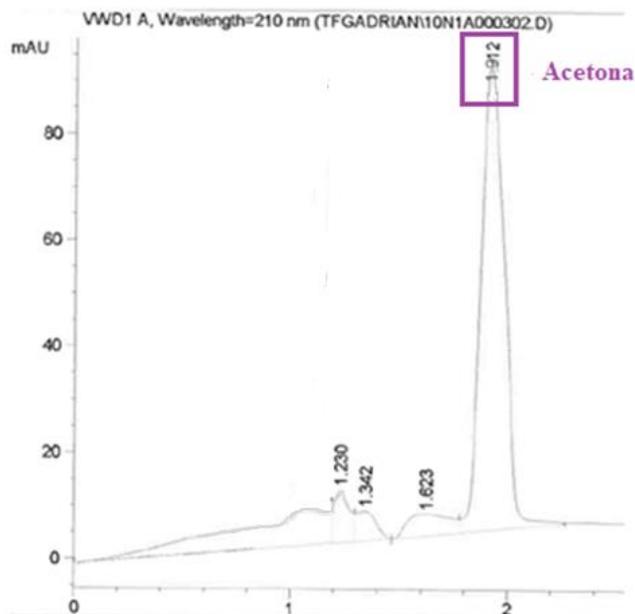


Imagen 14 Cromatograma correspondiente a una disolución de agua:acetona en %V (80:20).

También se realizaron medidas de los reactivos Carrez I y Carrez II en una disolución de agua:acetona en %V (80:20), observándose en la *Imagen 15* que sus picos salen a 1,3 min y 1,6 min.

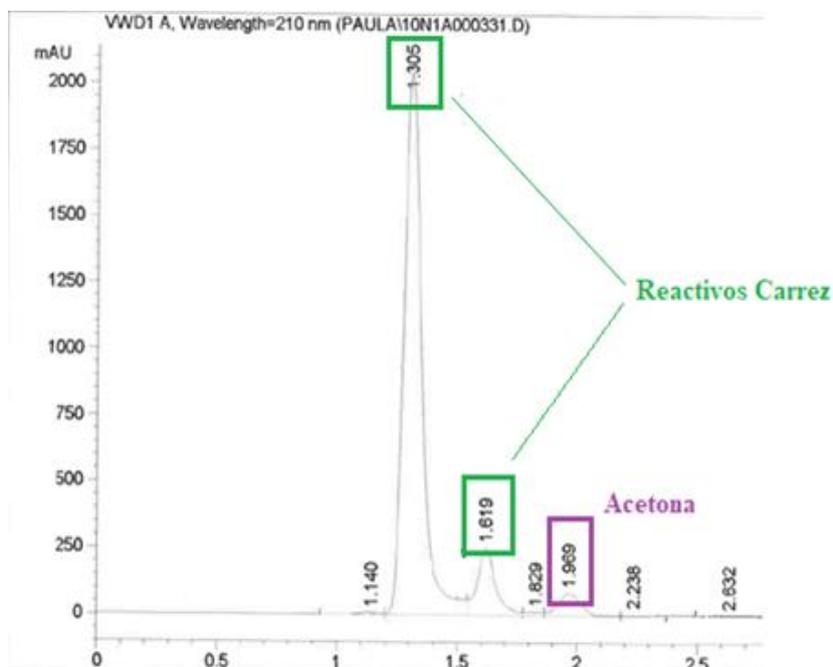


Imagen 15 Cromatograma correspondiente a una disolución de los reactivos Carrez I y II en agua:acetona en %V (80:20).

Otro compuesto de interés fue uno de sus precursores, la asparagina. La *Imagen 16* recoge información de una disolución de 50 ppm en agua desionizada, observándose un pico predominante en torno a 1,2 min, así como otros picos que se atribuyen a impurezas.

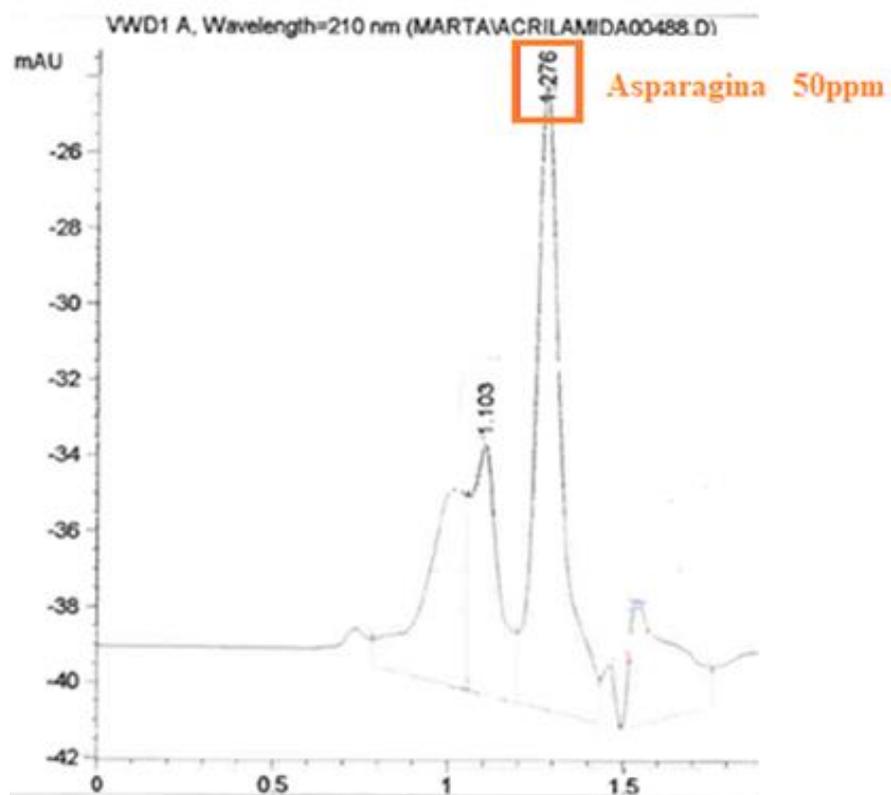


Imagen 16 Cromatograma correspondiente a una disolución de 50 ppm de asparagina en agua desionizada.

PRIMER PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Extracción con agua:acetona en %V (80:20) y los reactivos Carrez I y II.

En la *Imagen 17* se pueden observar los picos correspondientes a los reactivos Carrez I y II (1,3 y 1,6 min), la acetona (1,9 min) y la acrilamida (1,5 min), que se corresponden con los blancos realizados anteriormente. Además también aparecen más picos probablemente debidos a otros componentes presentes en este tipo de pan.

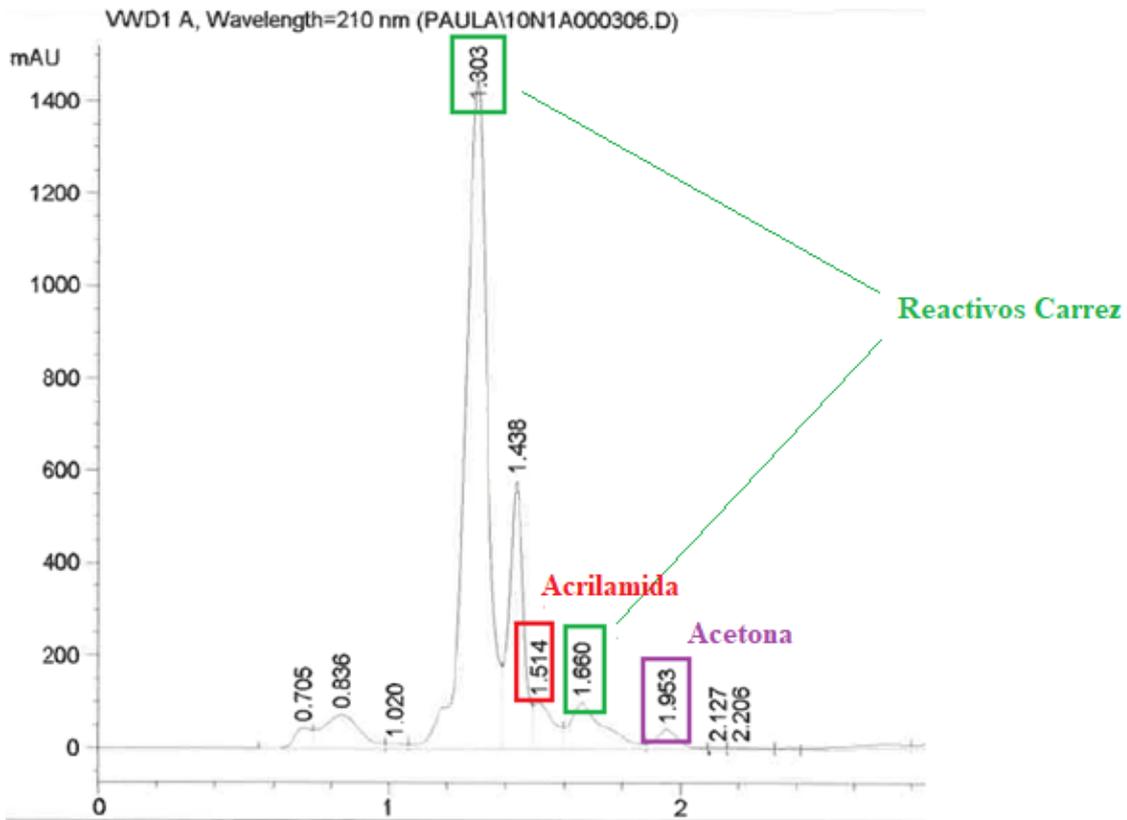


Imagen 17 Cromatograma correspondiente al primer procedimiento de extracción.

✚ SEGUNDO PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Extracción con agua al baño maría.

En este caso, la *Imagen 18* recoge información de los picos correspondientes a la asparagina (1,2 min) y la acrilamida (1,5 min), que se corresponden con los blancos realizados anteriormente. A diferencia que en el caso anterior y como es lógico, no hay picos a 1,3 min 1,6 min y 1,9 min, que se atribuían a los reactivos Carrez y a la acetona. Al igual que en el caso anterior, también aparecen más picos correspondientes a otros componentes de este tipo de pan.

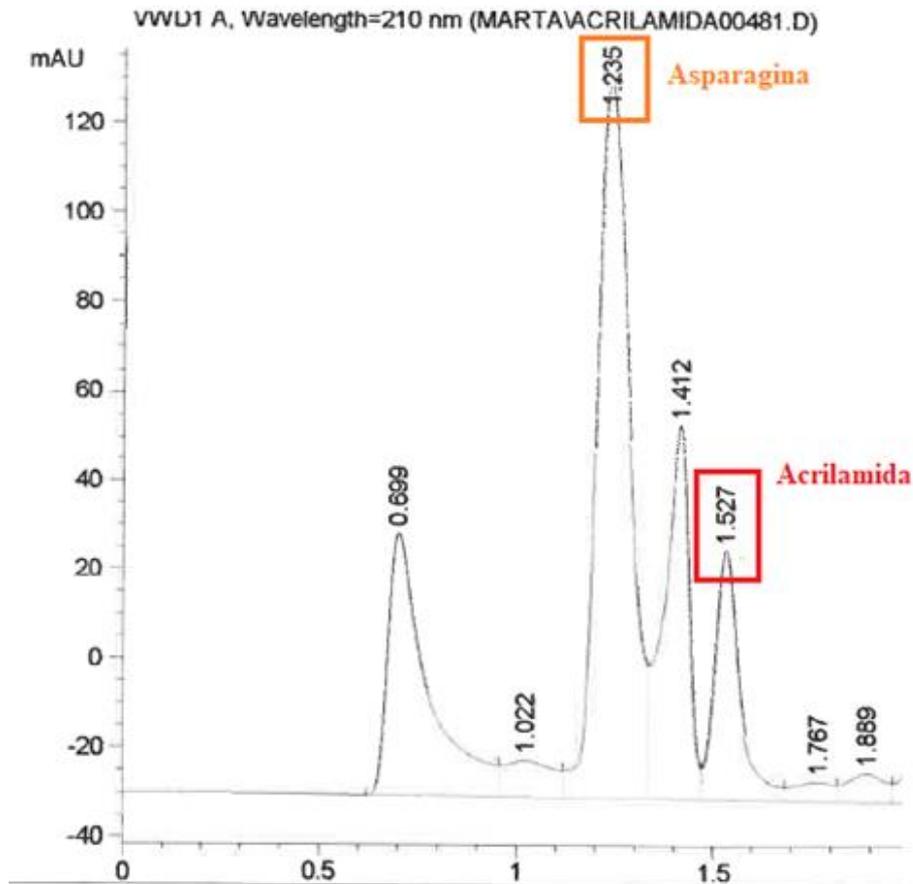


Imagen 18 Cromatograma correspondiente al segundo procedimiento de extracción.

✚ TERCER PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Extracción con agua y agitación a temperatura 60°C.

La *Imagen 19* muestra el pico de acrilamida (1,5 min) y asparagina (1,2 min), diferenciándose con los procedimientos 1 y 2 en el uso de agitación a temperatura de 60°C, obteniendo una mejor extracción de la muestra para bajas concentraciones. Al igual que en los casos anteriores, se extraen otros componentes de este tipo de pan.

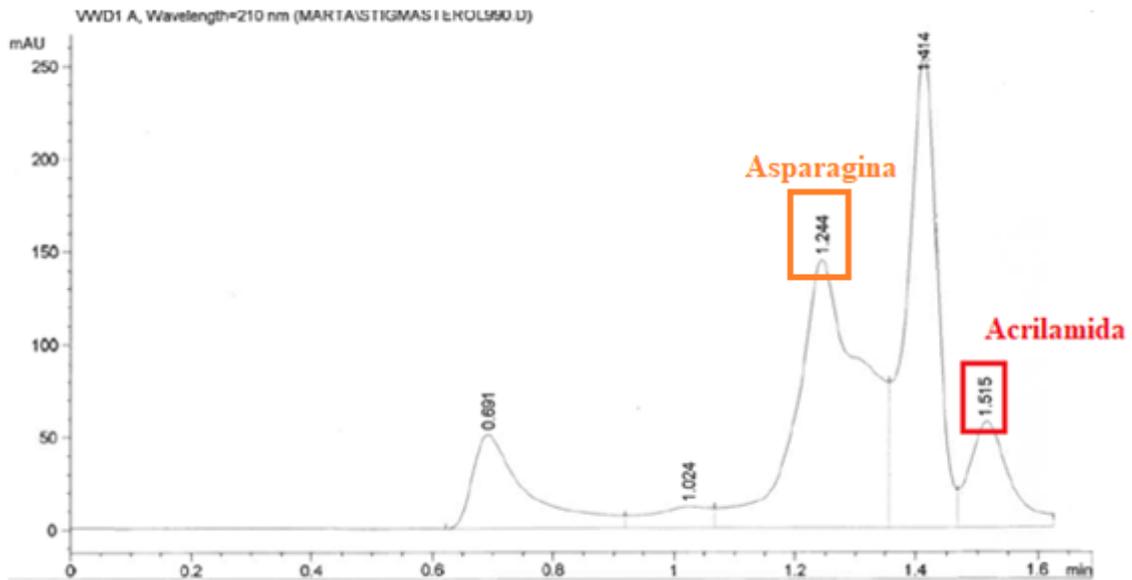


Imagen 19 Cromatograma correspondiente al tercer procedimiento de extracción.

✚ CUARTO PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente.

De la misma forma que en el procedimiento 3, se lleva a cabo la extracción con agitación pero a temperatura ambiente, obteniéndose un resultado menos satisfactorio que en el caso anterior. En la *Imagen 20* se puede observar la acrilamida (1,5 min), la asparagina (1,2 min) y otros componentes de este tipo de pan.

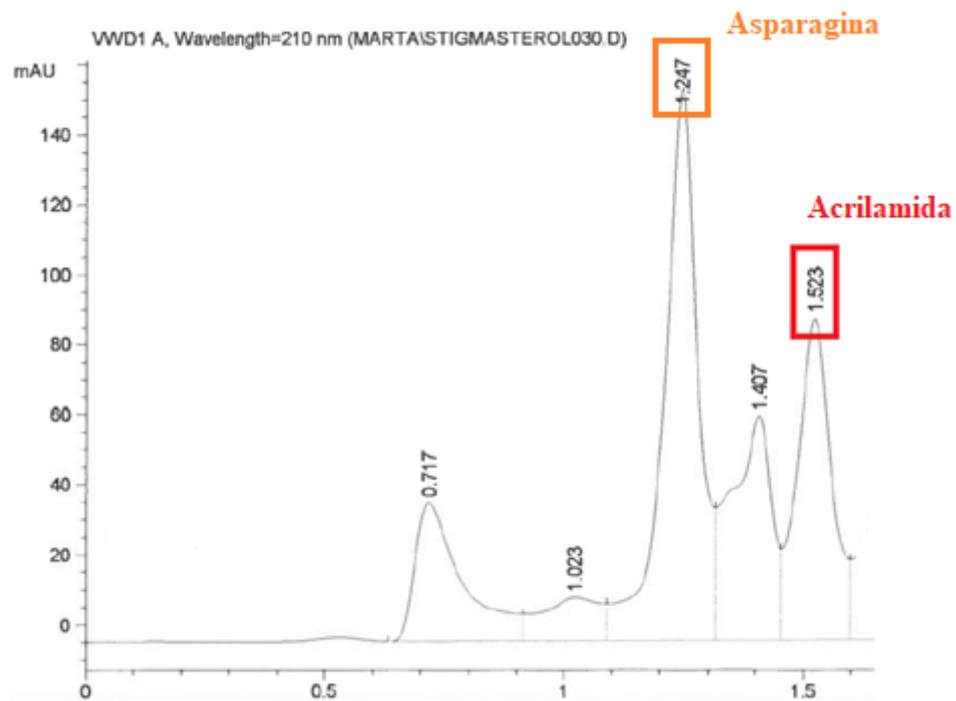


Imagen 20 Cromatograma correspondiente al cuarto procedimiento de extracción.

Adiciones patrón

Las adiciones patrón se realizaron añadiendo concentraciones de 0.2, 0.4, 1.0, 2.0, 4.0 y 10.0 ppm a la disolución de muestra extraída. En este caso, la *Imagen 21* muestra los cromatogramas obtenidos tras las adiciones de 0,2 y 10,0 ppm sobre una de las réplicas extraídas con el procedimiento 4 (Extracción con agua y agitación a temperatura ambiente).

En ambos casos, se observa el pico de acrilamida en torno a 1,5 min, así como un aumento de su intensidad y de su área cuando se aumenta su concentración.

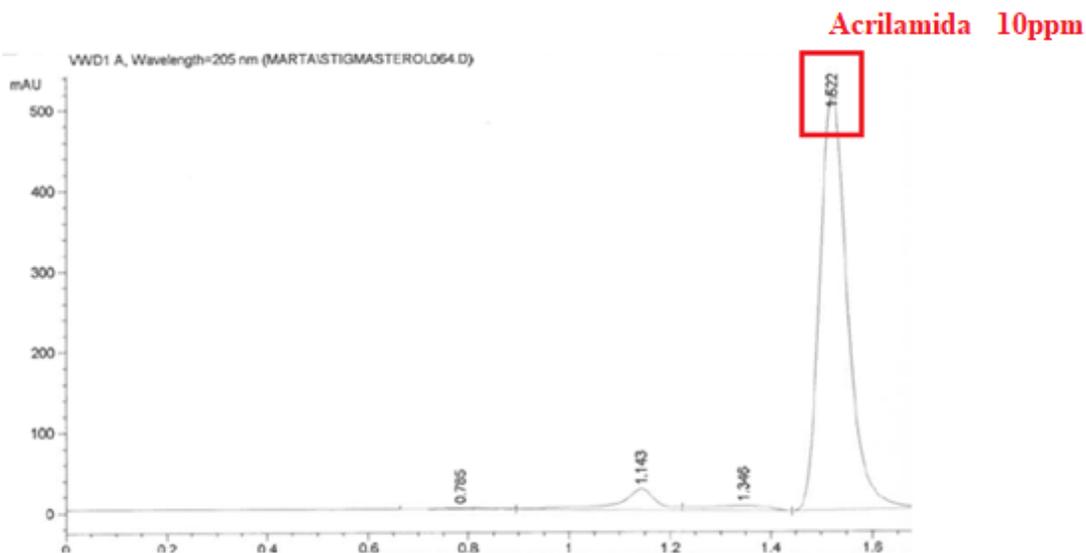
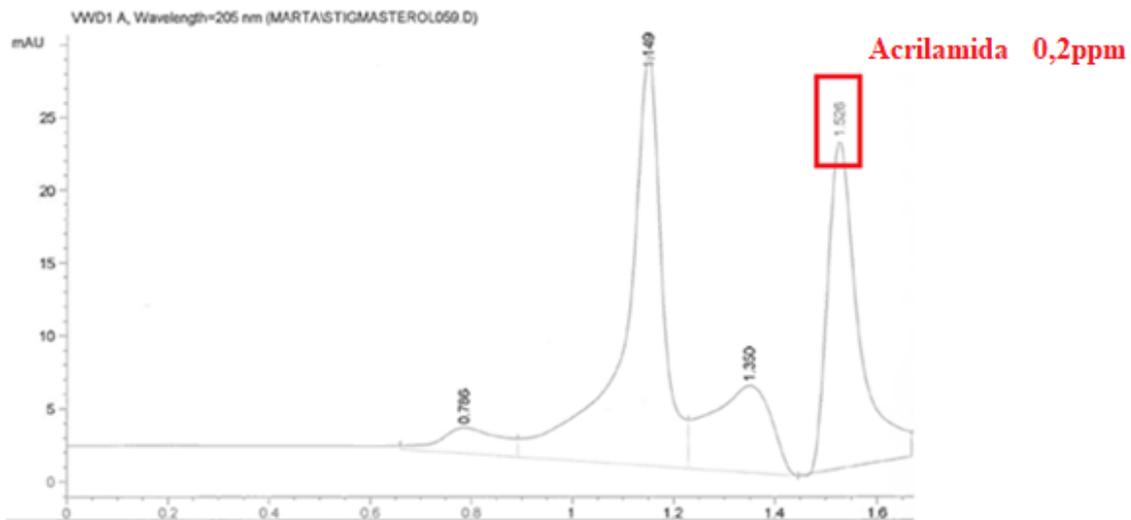


Imagen 21 Cromatogramas correspondiente a las adiciones patrón de 0,2 y 10,0 ppm, realizadas sobre una muestra (extraída) con el cuarto procedimiento de extracción.

5.2. Resultados de la calibración NIR

Se realizaron diferentes calibraciones para mediciones espectrales en modo reflectancia a distintos números de barridos (32 y 64), con una resolución de 16 cm^{-1} sobre un conjunto de 32 muestras de pan de molde. Para el análisis quimiométrico, el método de regresión aplicado fue el análisis por mínimos cuadrados parciales (PLSR).

En la *Imagen 22* se observan los espectros obtenidos de las muestras medidas, presentando una forma muy similar en tamaño y pico en la misma región de frecuencias del espectro electromagnético, entre $4.000\text{ }12.000\text{ cm}^{-1}$.

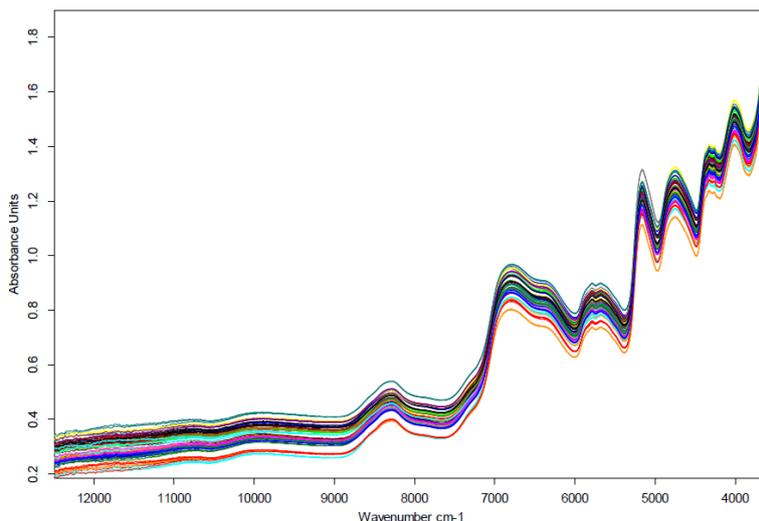


Imagen 22 Espectros NIR de 32 muestras de pan de molde obtenidos por reflexión a 32 barridos con una esfera integradora de 15 mm^2 de área.

5.2.1. Análisis quimiométrico

Para la evolución de los modelos predictivos, se llevó a cabo un PCA para las 32 muestras (empleando 32 y 64 barridos) tanto de los espectros por triplicado como del promedio de los mismos (*Imagen 23*). Después se identificaron y eliminaron los valores atípicos (*outliers*) y finalmente, se realizó la evaluación por validación cruzada.

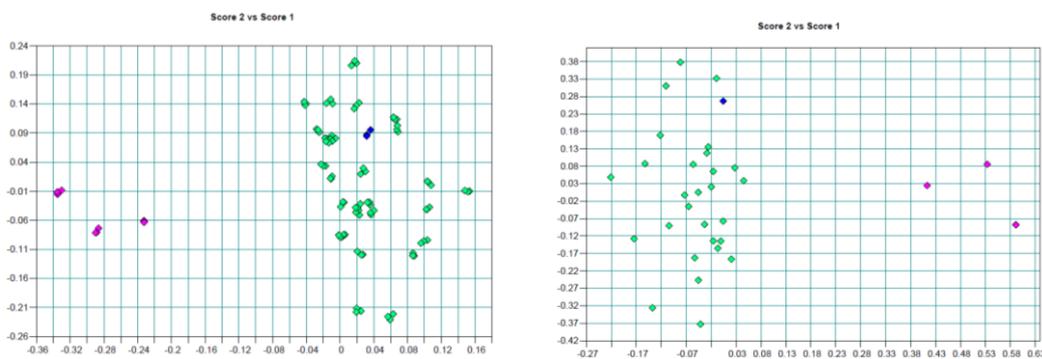


Imagen 23 PCA para 32 muestras de pan de molde empleando 32 barridos, tanto de los espectros por triplicado (izq.) como del promedio de los mismos (dcha.). En todos los casos se representa PC1 frente PC2.

Los valores verdes y azules corresponden a 29 muestras medidas el mismo día, siendo el azul el blanco. Los valores rosas corresponden a 3 muestras medidas otro día diferente en las mismas condiciones (haciendo un total de 32 muestras). En ambos análisis, se observa que las muestras medidas el mismo día y el blanco se integran en un mismo conjunto, mientras que las muestras del segundo día se encuentran alejadas, por lo que estas tres muestras se excluyen del conjunto de calibración, teniendo un total de 29 muestras finales para realizar la calibración con método de validación cruzada.

Empleando 64 barridos los resultados son similares, no aporta información relevante con respecto a la de 32. No obstante, si el número de muestras fuera bastante mayor aportando muestras medidas en diferentes días, los espectros obtenidos podrían integrarse en el mismo conjunto de calibración.

Los resultados obtenidos en los tres mejores modelos en cada caso (32 y 64 barridos) se recogen *Tabla 11*. En dos de ellos se utilizaron los tres espectros tomados consecutivamente sobre la misma muestra en las mismas condiciones, mientras que en el otro modelo se empleó el espectro promedio de las tres medidas.

Los resultados que se obtuvieron empleando el espectro promedio fueron mejores. Por un lado, se promediaron las diferencias que podían aparecer en las tres medidas espectrales tomadas (aunque hubieran sido tomadas de forma consecutiva), como por ejemplo el calentamiento de la muestra tras la primera exposición al láser de la sonda; y por otro lado, se tomó en cuenta que se asociaba un único espectro al valor de referencia del parámetro. Además, el cálculo del espectro promedio de una muestra reduce el ruido espectral, ya que este es considerado aleatorio.

Parámetro	N.º de barridos	Modelo	CALIBRACIÓN						VALIDACIÓN CRUZADA		
			N.º de muestras	Rango de frecuencias	Pre-procesamiento	Factores PLS	R ²	RMSEC	R ² _{cv}	RMSECV	RPD
Acrilamida (ppm)	32	3 espectros	32	9403.8- 6094.3 5454.1-4597.8	Normalización vectorial (SNV)	9	91.51	0.456	51.54	1.03	1.44
	32	3 espectros	29	9403.8-4597.8	Corrección de dispersión multiplicativa	8	88.36	0.502	65.85	0.814	1.71
	32	promedio	29	9403.8-4597.8	Primera derivada + Sustracción de línea recta	8	95.39	0.36	73.09	0.722	1.93
	64	3 espectros	32	7506.1-4597.8	Primera derivada + Sustracción de línea recta	9	80.83	0.686	65.73	1.19	1.25
	64	3 espectros	29	9403.8- 6094.3 5454.1-4597.8	Sustracción de línea recta	6	65.13	0.858	65.92	1.2	1.16
	64	promedio	29	7506.1-4597.8	Primera derivada + Sustracción de línea recta	7	78.84	0.753	69.46	1.17	1.19

Tabla 11 Resultados obtenidos en calibración y validación para el parámetro acrilamida.

Los gráficos de los valores predichos por NIR frente a los obtenidos en el laboratorio (valores reales) se recogen en la *Imagen 24*, donde se observan dos líneas de tendencia: la verde sería lo ideal ($R^2 \approx 1$), mientras que la azul es la obtenida en este trabajo, con un $R^2 = 0,8553$, es decir, que el error entre ambos gráficos es aproximadamente del 15%.

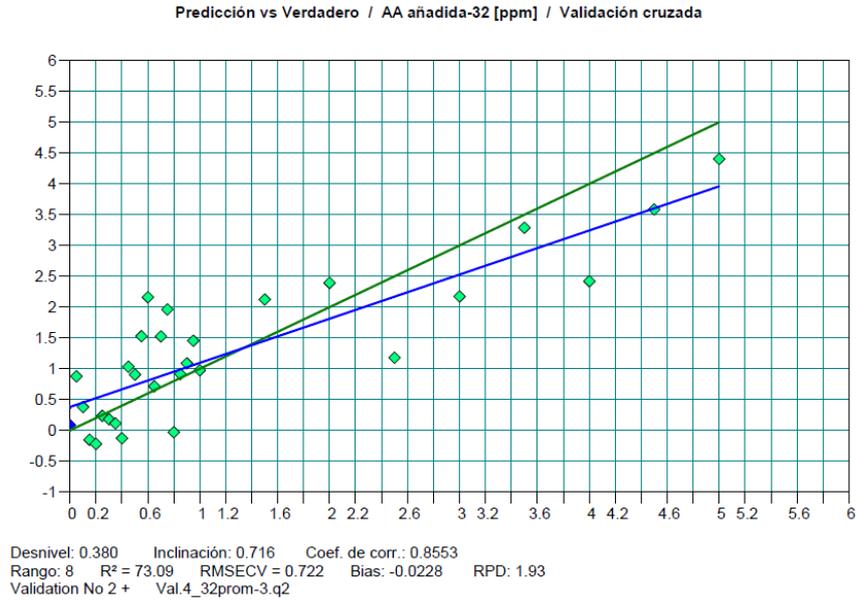


Imagen 24 Gráfico de predicción NIR: Valores predichos frente a reales en los modelos medidos para 29 muestras de pan de molde a 32 barridos.

Para la validación del modelo, la *Imagen 25* recoge los mejores resultados obtenidos. La ecuación requiere un total de 8 factores PLS para obtener un error de predicción de 0,722 ppm, un coeficiente de correlación del 73,09% y una capacidad predictiva de 1,93.

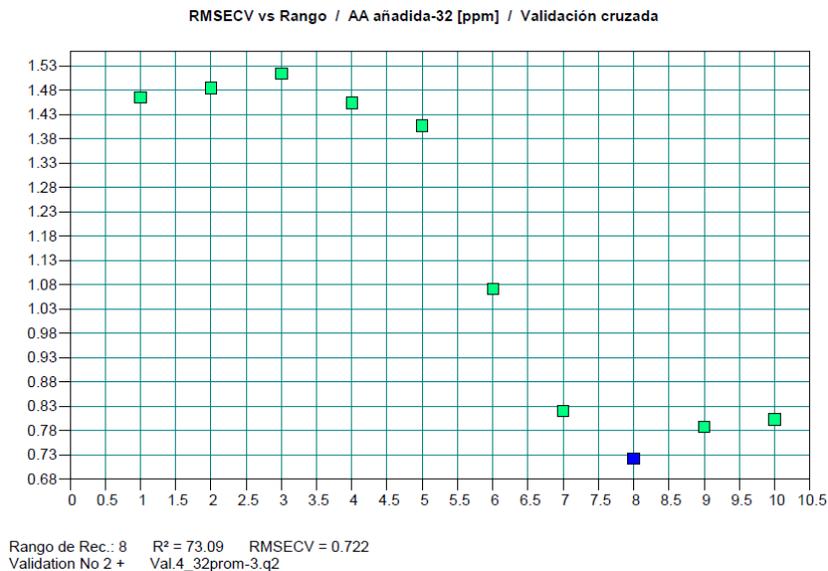


Imagen 25 RMSECV frente a Rango.

6. Conclusiones

- Se han realizado diferentes procesos para la extracción de acrilamida en muestras de pan de molde comercial de marca blanca. La mayor cantidad recuperada para concentraciones del orden de la ppm es de un 43,45% y se obtiene utilizando extracción con agua en agitación a temperatura de 60°C.
- Se pone a punto un método para la determinación de acrilamida en muestras de pan de molde por cromatografía de líquidos HPLC-UV/Vis. Se obtiene un pico perfectamente identificable en torno a 1,5 min. El límite de detección LOD es del orden de 0,12 ppm y el de cuantificación LOQ del orden de 0,39 ppm.
- Se realiza una pre-calibración para la determinación de acrilamida en muestras de pan mediante tecnología NIRS, observándose en el gráfico de predicción un error de un 15% para un estudio sobre treinta muestras. Así mismo, se obtiene un error de predicción de 0,722 ppm y un coeficiente de determinación del 73,09 %.

Propuesta de estudio

- Realizar los mismos experimentos sobre muestras de pan horneado o tostado, con el objetivo de poder determinar su concentración exclusivamente por medidas NIRS, lo que implicaría un gran avance en el control de la industria alimenticia.

7. Bibliografía

1. Campos Labadie, M. I. Aplicación de la tecnología NIRS para la determinación de sodio y parámetros implicados en el proceso industrial del jamón curado. (2015).
2. Norouzi, E., Kamankesh, M., Mohammadi, A. & Attaran, A. Acrylamide in bread samples: Determining using ultrasonic-assisted extraction and microextraction method followed by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Cereal Sci.* **79**, 1–5 (2018).
3. Vaclavik, L., Capuano, E., Gökmen, V. & Hajslova, J. Prediction of acrylamide formation in biscuits based on fingerprint data generated by ambient ionization mass spectrometry employing direct analysis in real time (DART) ion source. *Food Chem.* **173**, 290–297 (2015).
4. Hurtado, M. C. *et al.* Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas. *Revista del Comité científico de la AECOSAN* **26**, 39 (2017).
5. Organización de las Naciones Unidas, ONU. Fichas Internacionales de Seguridad Química: Acrilamida. 2 (2000).
6. Dybing, E. *et al.* Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem. Toxicol.* **43**, 365–410 (2005).
7. Yadav, A., Sengar, N., Issac, A. & Dutta, M. K. Image processing based acrylamide detection from fried potato chip images using continuous wavelet transform. *Comput. Electron. Agric.* **145**, 349–362 (2018).
8. Xu, Y. *et al.* Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: Current status and future prospects. *Food Chem. Toxicol.* **69**, 1–12 (2014).
9. Giraldo, J. C. Aspectos sobre acrilamida: formación, cuantificación, mitigación y futuras consideraciones. **10**, 119–134 (2015).
10. Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios, JECFA. Acrilamida AECOSAN. 12–15 (2017).
11. European Food Safety Authority, EFSA. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA J.* **10**, 2938 (2012).
12. Pedreschi, F., Mariotti, M. S. & Granby, K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J. Sci. Food Agric.* **94**, 9–20 (2014).
13. European Commission, CE. Commission recommendation on investigations into the levels of acrylamide in food. 6 (2001).
14. Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA J.* **13**, 4104 (2015).
15. Comisión Europea, CE. Una Caja de herramientas para reducir los niveles de acrilamida en productos de bollería, galletería, pastelería y repostería. 1–2
16. Comisión Europea, CE. Una Caja de herramientas para reducir los niveles de acrilamida en patatas fritas tipo “ chip ”. 1–2

17. Santos, M. E. L. Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de acrilamida en tostadas de tortillas de maíz procedentes de Monterrey (México) y estimación de la exposición dietética. (2017).
18. Maillard, L.C. Action des acides aminés sur les sucres: formation des mélanoidines par voie méthodique. *C R Hebd. Séances Acad. Sci* **154**, 66–68 (1912).
19. Paulin Yañez, G., Güemes Vera, N., Piloni Martini, J. & Quintero Lira, A. Revisión: Acrilamida en los alimentos, daños a la salud y estrategias para su inhibición. *Boletín Ciencias Agropecu. del ICAP* **3**, (2017).
20. Zyzak, D. V. *et al.* Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 4782–4787 (2003).
21. Liu, C. *et al.* Fluorescence determination of acrylamide in heat-processed foods. *Talanta* **123**, 95–100 (2014).
22. De Paola, E. L. *et al.* Determination of acrylamide in dried fruits and edible seeds using QuEChERS extraction and LC separation with MS detection. *Food Chem.* **217**, 191–195 (2017).
23. Gökmen, V. & Şenyuva, H. Z. Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating. *Food Chem.* **99**, 238–243 (2006).
24. 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).
25. Batra, B., Lata, S., Sharma, M. & Pundir, C. S. An acrylamide biosensor based on immobilization of hemoglobin onto multiwalled carbon nanotube/copper nanoparticles/polyaniline hybrid film. *Anal. Biochem.* **433**, 210–217 (2013).
26. Polesello, A., Giangiacomo, R. & Dull, G. G. Application of near infrared spectrophotometry to the nondestructive analysis of foods: A review of experimental results. *C R C Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **18**, 203–230 (1983).
27. Alomar, D. & Fuchslocher, R. Fundamento de la espectroscopia de reflectancia en el infrarrojo cercano (NIRS) como método de análisis de forrajes. *Agro Sur* **26**, 88–104 (1998).
28. Instrumentación en HPLC: esquema-hplc @ lidaconlaquimica.files.wordpress.com. (2015). Available at: <https://lidaconlaquimica.files.wordpress.com/2015/08/esquema-hplc.png>.
29. Shenk, J. S. & Westerhaus, M. O. Population Definition, Sample Selection, and Calibration Procedures for Near Infrared Reflectance Spectroscopy. *Crop Sci.* **31**, 469 (1991).

8. Anexos

8.1. Anexo A: Listado de imágenes

Imagen	Texto	Pág.
1	Esquema de trabajo para el desarrollo del modelo de predicción NIR.	5
2	Pan en diferentes grados de tostación.	6
3	Formación de glicidamida por medio de una epoxidación (2,3-epoxipropionamida).	7
4	Reacción de Maillard.	9
5	Espectro electromagnético.	13
6	Modo de reflectancia NIR.	14
7	Equipo NIR utilizado en este trabajo.	14
8	Equipo cromatográfico HPLC-UV/Vis.	15
9	Equipo de cromatografía HPLC-UV/Vis utilizado en este trabajo.	15
10	Procedimiento de adiciones patrón.	24
11	Cromatograma correspondiente a una disolución de 20 ppm de acrilamida en agua desionizada.	27
12	Cromatograma correspondiente a una disolución de 200 ppm de acrilamida en agua desionizada.	28
13	Cromatograma correspondiente a una disolución de 200 ppm de acrilamida en de agua:acetona en % V (80:20).	28
14	Cromatograma correspondiente a una disolución de agua:acetona en % V (80:20).	29
15	Cromatograma correspondiente a una disolución de los reactivos Carrez I y II en agua:acetona en % V (80:20).	29
16	Cromatograma correspondiente a una disolución de 50 ppm de asparagina en agua desionizada.	30
17	Cromatograma correspondiente al primer procedimiento de extracción.	31
18	Cromatograma correspondiente al segundo procedimiento de extracción.	32
19	Cromatograma correspondiente al tercer procedimiento de extracción.	33
20	Cromatograma correspondiente al cuarto procedimiento de extracción.	34
21	Cromatogramas correspondiente a las adiciones patrón de 0,2 y 10,0 ppm, realizadas sobre una muestra (extraída) con el cuarto procedimiento de extracción.	35
22	Espectros NIR de 32 muestras de pan de molde obtenidos por reflexión a 32 barridos con una esfera integradora de 15 mm ² de área.	36
23	PCA para 32 muestras de pan de molde empleando 32 barridos, tanto de los espectros por triplicado (izq.) como del promedio de los mismos (dcha.). En todos los casos se representa PC1 frente PC2.	36
24	Gráfico de predicción NIR: Valores predichos frente a reales en los modelos medidos para 29 muestras de pan de molde a 32 barridos.	39
25	RMSECV frente a Rango.	39

8.2. Anexo B: Listado de tablas

Tabla	Texto	Pág.
1	Propiedades físicas de la acrilamida.	6
2	Reactivos y disolventes utilizados.	12
3	Equipos utilizados.	12
4	Primer procedimiento de extracción.	17
5	Segundo procedimiento de extracción.	18
6	Tercer procedimiento de extracción.	19
7	Cuarto procedimiento de extracción.	20
8	Procedimiento de determinación de acrilamida mediante espectroscopia NIR.	21
9	Valores nutricionales del pan de estudio.	25
10	Resultados obtenidos para las cuatro metodologías utilizadas para la extracción de la acrilamida.	26
11	Resultados obtenidos en calibración y validación para el parámetro acrilamida.	38

8.3. Anexo C: Etiqueta nutricional del producto utilizado



Información nutricional:
Valores medios por 100 g

Valor energético:	1.102 kJ / 261 kcal
Grasas:	4,5 g
de las cuales Saturadas:	1 g
Hidratos de carbono:	45 g
de los cuales Azúcares:	6 g
Fibra alimentaria:	4,1 g
Proteínas:	8,1 g
Sal:	1,3 g