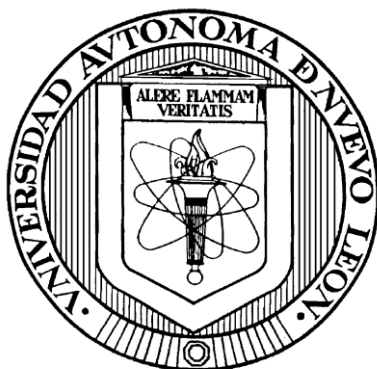


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**

**FACULTAD DE MEDICINA**



**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA ACRILAMIDA  
EN TORTILLAS TOSTADAS EMPLEANDO MICROEXTRACCIÓN  
EN GOTA Y LÍQUIDOS IÓNICOS (IL-SDME)**

**Por**

**Q. B. P. ANDRÉS VARGAS GARCÍA.**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRÍA EN CIENCIAS con Especialidad  
en Química Biomédica**

**Enero, 2012**

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA ACRILAMIDA  
EN TORTILLAS TOSTADAS EMPLEANDO MICROEXTRACCIÓN  
EN GOTA Y LÍQUIDOS IÓNICOS (IL-SDME)**

**Aprobación de la Tesis:**



---

**DR. C. LIDIA RUNIA NACCHA TORRES**  
Director de Tesis



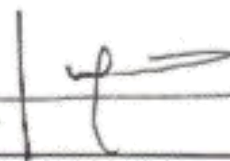
---

**DR. C. ROCÍO CASTRO RÍOS**  
Co – Director de Tesis



---

**DR. C. NOEMÍ WAKSMAN DE TORRES**  
Comisión de Tesis



---

**DR. med. GERARDO E. MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA ACRILAMIDA  
EN TORTILLAS TOSTADAS EMPLEANDO MICROEXTRACCIÓN  
EN GOTTA Y LÍQUIDOS IÓNICOS (IL-SDME)**

**Presentado por:**

**Q. B. P. ANDRÉS VARGAS GARCÍA**

Este trabajo se realizó en el Departamento de Química Analítica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la Dirección de la Dra. Lidia Runia Naccha Torres y la Co-Dirección de la Dra. Noemí Waksman de Torres y de la Dra. Rocío Castro Ríos.

**FIRMAS**

**DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Lidia Runia Naccha Torres**

**CO – DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Noemí Waksman de Torres**

**CO – DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**Dra. Rocío Castro Ríos**

## **Agradecimientos**

Mi Papá, Mamá, Gabriela y Any me dan el mejor apoyo y sobretodo desinteresado, espero un día regresarles más de lo que me han dado. Lo que ustedes han hecho por mí, la manera que he visto que ustedes tratan a la demás gente y como se manejan entre todos los demás es mi referencia de lo correcto. Así como ustedes me han tratado es como trataré a los siguientes miembros de nuestra familia.

Sarah los planes que nos hacemos cuando estamos fantaseando ayudan a esforzarme para hacerlos realidad. Gracias por apoyarme y seguir planeando juntos.

A los hermanos que se escogen, están repartidos por todos lados, muchas gracias por su amistad. A todos con los que compartí el cubículo David, Marsela, Elda, Martha, Laura, Joel, Jonathan, Lorena, Omar, Sergio, Edwin, Cecilia. Al personal del departamento Dorita, Tania, Laura, Magda, Chela, Karina, Lucy, Agustín, Gloria y en especial a Marivel. Los que no son del cubículo Graciela, Idalia, Magda, Anabel, Idalia, Dra. Cavazos, Dra. Ma. de la Luz, Dr. Salazar, Dra. Rosalba, Dra. Álvarez, Dr. Alejandro, Dra. Aurora, M.C. Cristina, M.C. Elsa, Dra. Rivas. Con todos ustedes coincidí en un mismo tiempo y espacio cualquier detalle, consejo, favor, conversación o lección fue parte del desarrollo moral y científico. Siempre serán recordados, agradezco su tiempo y consideraciones.

Dra. Lidia Naccha su apoyo moral y científico, su tiempo, fueron imprescindibles para que este trabajo pudiera ser terminado, agradezco mucho su paciencia, admiro su personalidad y es un ejemplo a seguir que conservare para el resto de mi vida.

Dra. Roció Castro agradezco que me haya dejado ser parte del proyecto que usted dirige y la dirección que le dio al trabajo.

Dra. Noemí Waksman su experiencia y liderazgo son admirables, agradezco su apoyo durante la estancia en el departamento, aparte del desarrollo científico, todo fue una enseñanza.

A CONACYT por ser el becario 231977. Al proyecto 106506 del Fondo de Ciencia Básica 2008 de SEP.CONACYT.

## RESUMEN

Q.B.P. Andrés Vargas García

Fecha de graduación: Enero de 2012

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

Titulo del estudio:

**DESARROLLO DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA ACRILAMIDA EN TORTILLAS TOSTADAS EMPLEANDO MICROEXTRACCIÓN EN GOTA Y LÍQUIDOS IÓNICOS (IL-SDME)**

Número de páginas: 118

**Candidato para el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en Química Biomédica.**

**Área de estudio: Química Analítica.**

### **Propósito y Método de Estudio:**

La acrilamida es un compuesto altamente hidrofílico. Tiene efectos neurotóxicos, genotóxicos y carcinogénicos; catalogada como probable carcinógeno para el hombre por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer. Se genera en alimentos ricos en carbohidratos cuando estos son sometidos al proceso de cocción por horneado, fritura o asado por encima de 120°C, por medio de la reacción de Maillard. Debido a los altos niveles de acrilamida reportados en 2002 en diferentes alimentos, se generó gran preocupación a nivel mundial por la determinación de este compuesto en alimentos, debido a su alta toxicidad.

Los métodos que existen para cuantificar acrilamida en alimentos presentan desventajas debido a la naturaleza hidrofílica de la acrilamida, ya que las técnicas de separación convencionales no son eficientes para analitos polares. En este trabajo se presenta el desarrollo de un método analítico para acrilamida en tortillas tostadas empleando microextracción en gota y líquidos iónicos. En la primera etapa se seleccionaron los líquidos iónicos inmiscibles en agua y los de mayor tamaño de gota. En la segunda, se desarrolló un método por HPLC para separar y cuantificar acrilamida en mezclas con IL inmiscibles en agua empleando diferentes columnas. Las condiciones óptimas se obtuvieron utilizando la columna Atlantis dC18 con una fase móvil agua-metanol en gradiente y un flujo de 0.15 µL/min a 30°C. En la tercera etapa se seleccionaron los IL de acuerdo a su coeficiente de partición y la solubilidad de la acrilamida, siendo los mejores OMIM PF<sub>6</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>. En la cuarta etapa se optimizó y validó el método de SDME empleando IL. El líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> se seleccionó como mejor solvente de extracción de acrilamida. Las condiciones óptimas de extracción fueron: tamaño de gota 4.5 µL, tiempo de extracción 10 min a una temperatura de 50°C y agitación 500 rpm. El método propuesto se validó evaluando la linealidad en un intervalo de concentración de 2 a 32 ppm., con coeficientes de correlación mayores a 0.99. La exactitud expresada como porcentaje de recuperación fue de 85.24% a 109.77%. La precisión expresada como % DER fue de 21%. Los límites de detección y cuantificación fueron relativamente altos de 10 y 30 ppm respectivamente. Finalmente se aplicó el método desarrollado y validado a muestras comerciales de tortillas tostadas.

### **Contribuciones y Conclusiones:**

El IL TES NTfO<sub>2</sub> fue el mejor solvente de extracción de acrilamida empleando SDME. El método desarrollado de SDME empleando IL para análisis de acrilamida en tortillas tostadas es un método moderno, rápido, exacto, económico y permite el cuidado del medio ambiente; aunque no es suficientemente sensible. De las muestras analizadas solo en una se detectó acrilamida.

**FIRMA DEL DIRECTOR**

---

**Dra. Lidia Runia Naccha Torres**

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
I	INTRODUCCIÓN	1
	1.1. Acrilamida, propiedades físicas y químicas	1
	1.2 Toxicidad de la acrilamida	4
	1.3 Usos, fabricación y exposición a la acrilamida	5
	1.3.1 Usos	5
	1.3.2 Fabricación	6
	1.3.3 Exposición	6
	1.4 Formación de acrilamida en alimentos	8
	1.4.1 Estrategias para reducir la formación de acrilamida en alimentos cocinados	11
	1.5 Legislación internacional para controlar la exposición a acrilamida	13
	1.6 Métodos analíticos para la cuantificación de acrilamida en alimentos	14
	1.7 Opciones de métodos analíticos amigables con el medio ambiente	19
	1.8 Microextracción en gota	21
	1.9 Líquidos iónicos	23
II	JUSTIFICACIÓN	30
III	OBJETIVOS	31
	3.1 Objetivo general	31
	3.2 Objetivos específicos	31
IV	MATERIALES Y MÉTODOS	33
	4.1 Reactivos	33
	4.1.1 Preparación de reactivos	35
	4.2 Material	36
	4.3 Equipos	38
	4.4 Características de la muestra.	39
	4.5 Espectro UV	39
	4.6 Miscibilidad de los líquidos iónicos.	39
	4.7 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción	40
	4.8 Método cromatográfico	41
	4.8.1 Optimización de las condiciones de separación	41
	4.8.2 Validación del sistema cromatográfico	43
	4.8.2.1 Linealidad	43
	4.8.2.2 Precisión.	43
	4.8.2.3 Exactitud	44
	4.8.2.4 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)	44

4.9 Pruebas de solubilidad y coeficiente de partición	44
4.9.1 Solubilidad	44
4.9.2 Coeficiente de partición	45
4.10 Método de Microextracción en gota (SDME)	46
4.10.1 Selección del solvente de extracción	46
4.10.2 Optimización de las condiciones de extracción	47
4.10.3 Comparación de la eficiencia de extracción de NTfO <sub>2</sub> y MPPipe NTfO <sub>2</sub>	47
4.10.4 Validación del método de SDME	48
4.10.4.1 Linealidad	48
4.10.4.2 Exactitud y precisión	49
4.10.4.3 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC).	50
4.11 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.	50
V <b>RESULTADOS</b>	51
5.1 Espectro UV – Visible.	51
5.2 Miscibilidad de los líquidos iónicos	52
5.3 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción	53
5.4 Método cromatográfico	54
5.4.1 Optimización de las condiciones de separación	54
5.4.2 Validación del sistema cromatográfico.	55
5.5 Solubilidad y coeficiente de partición	56
5.5.1 Solubilidad	56
5.5.2 Coeficiente de partición	57
5.6 Método de Microextracción en gota (SDME)	58
5.6.1 Selección del solvente de extracción	58
5.6.2 Optimización de las condiciones de extracción	61
5.6.3 Comparación de la eficiencia de extracción de TES NTfO <sub>2</sub> y MPPipe NTfO <sub>2</sub>	65
5.6.4 Validación del método de SDME	65
5.7 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.	67
VI <b>DISCUSIÓN</b>	69
6.1 Espectro UV.	69
6.2 Evaluación de miscibilidad	70
6.3 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción	73
6.4 Método cromatográfico	75
6.4.1 Optimización de las condiciones de separación	75
6.4.2 Validación del sistema cromatográfico	76
6.5 Solubilidad y coeficiente de partición	77
6.6 Método de Microextracción en gota (SDME)	79
6.6.1 Selección del solvente de extracción	79
6.6.2 Optimización de las condiciones de extracción	81

6.6.3 Comparación de la eficiencia de extracción de NTfO <sub>2</sub> y MPPipe NTfO <sub>2</sub>	82
6.6.4 Validación del método de SDME	82
6.7 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.	84
VII CONCLUSIONES	85
VIII PERSPECTIVAS	86
BIBLIOGRAFÍA	87
APÉNDICE	98
Resultados del desarrollo del método cromatográfico	98
A.1 Interacciones hidrofílicas	99
A.2 Modo mixto: Fase inversa – intercambio catiónico	103
A.3 Cromatografía de par iónico	107
A.4 Cromatografía de fase inversa	109



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Estructura de la acrilamida.	1
2	Formación de acrilamida en la reacción de Maillard.	10
3	Estructura de algunos cationes y aniones que integran a los líquidos iónicos.	27
4	Espectro UV de la acrilamida.	51
5	Cromatograma del líquido iónico TES-NTfO <sub>2</sub> usado como solvente de extracción en una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm.	58
6	Cromatogramas de la SDME usando líquidos iónicos como solventes.	60
7	Optimización de la temperatura para el TES NTfO <sub>2</sub> .	61
8	Optimización de la velocidad de agitación para el TES NTfO <sub>2</sub> .	62
9	Optimización del tiempo de extracción para el TES NTfO <sub>2</sub> .	62
10	Optimización de la temperatura para el MPPipe NTfO <sub>2</sub> .	63
11	Optimización del tiempo de extracción para el MPPipe NTfO <sub>2</sub> .	63
12	Optimización de la velocidad de agitación para el MPPipe NTfO <sub>2</sub> .	64
13	Curva de calibración del método.	66
14	Cromatograma de una muestra adicionada con 10 ppm de estándar de acrilamida.	67

## LISTADO DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
1	Solubilidad de la acrilamida en diferentes solventes.	2
2	Resumen de métodos analíticos para determinar acrilamida en alimentos.	15
3	Métodos cromatográficos para análisis en presencia de IL.	25
4	Condiciones iniciales del método HPLC.	41
5	Condiciones cromatográficas evaluadas.	42
6	Resultados de las pruebas de miscibilidad.	52
7	Resultados de volumen de gota y tiempo de exposición.	53
8	Resultados obtenidos para la separación de acrilamida de los IL empleando diferentes columnas cromatográficas.	54
9	Condiciones óptimas para la separación cromatográfica.	55
10	Validación del sistema cromatográfico	56
11	Solubilidad de los líquidos iónicos.	57
12	Coefficientes de partición líquido iónico/agua de la acrilamida.	57
13	Respuesta analítica al aplicar la SDME a una solución de acrilamida con diferentes líquidos iónicos.	59
14	Respuestas analíticas al realizar la SDME.	61
15	Condiciones óptimas de extracción.	64
16	Eficiencia de extracción de los líquidos iónicos MPPipe-NTfO <sub>2</sub> y TES-NTfO <sub>2</sub>	65
17	Parámetros de validación de la SDME.	66
18	Resultado del análisis de acrilamida en tortillas tostadas comerciales.	68

## ABREVIATURAS

%DER	Desviación estándar relativa expresada en porcentaje
°C	Grados centígrados
μL	Microlitro
AcN	Acetonitrilo
AlCl <sub>4</sub>	Tetracloroaluminato
AMIM	1-amil-3-metilimidazolio
BEIM	1-butil-3-etilimidazolio
BF <sub>4</sub>	Tetrafluorborato
BMIM	1-butil-3-metilimidazolio
BMMIM	1-butil-2,3-dimetilimidazolio
BMPyrr	1-butil-1-metilpirrolidinio
BPyr	1-butilpiridinio
Br	Bromo
BTMA	N-butil-N,N,N-trimetilamonio
BzMIM	1-benzil-3-metilimidazolio
Cl	Cloro
DEFosf	Dietilfosfato
DMIM	1-decil-3-metilimidazolio
EA	Etilamonio
EBzMIM	1-etilbenzil-3-metilimidazolio

EEIM	1,3-dietilimidazolio
ESI	Ionización electro spray
EMIM	1-etil-3-metilimidazolio
FAP	tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato
FD	Detector de fluorescencia
FDA	Agencia de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos.
FI-CI	Fase inversa – cromatografía iónica
g	Gramos
HMIM	1-hexil-3-metilimidazolio
HNH2MPL	1-(6-amino-hexil)-1-metilpirrolidinio
HPLC	Cromatógrafo líquido de alto desempeño
hrs	Horas
HRTOF	Alta resolución tiempo de vuelo
IL-DLLME	Microextracción líquido-líquido dispersiva usando líquidos iónicos
IL-SDME	Microextracción en gota usando líquidos iónicos
kDa	Kilodaltones
LD	Límite de detección
LI	Líquidos iónicos
LLE	Extracción líquido – líquido
LPME	Microextracción en fase líquida
LC	Límite de cuantificación
M	Molar
m	Pendiente de la curva de calibración

MBPyr	4-metil-N-butilpiridinio
MeOH	Metanol
min	Minutos
MMPIM	1,2-dimetil-3-propilimidazolio
MPPipe	N-metil-N-propilpiperidinio
MPPyr	3-metil-N-propilpiridinio
MPPyrrol	1-metil-1-propilpirrolidinio
Ms	Metanosulfonato
MS	Espectroscopia de masas
mta	Muestra
MTOA	N-metil-N,N,N-trioctilamonio
nm	Nanómetros
NMIM	1-metil-3-nonilimidazolio
NO <sub>3</sub>	Nitrato
NTfO <sub>2</sub>	bis(trifluorometilsulfonil)imida
OMIM	1-metil-3-octilimidazolio
PF <sub>6</sub>	Hexafluorofosfato
PH <sub>3</sub> T	trihexil(tetradecil)fosfonio
PMIM	1-metil-3-propilimidazolio
PPB	Partes por billón
ppm	Partes por millón
PTFE	Politetrafluoroetileno
r	Coefficiente de correlación
Ref	Referencia

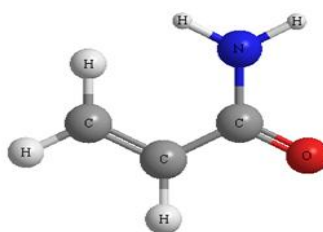
rpm	Revoluciones por minuto
Sbl	Desviación estándar de la respuesta del blanco
SDME	Microextracción en gota
SPE	Extracción en fase sólida
SPME	Microextracción en fase sólida
TES	Trietilsulfonio
TFA	Ácido trifluoroacético
TfO	Trifluorometilsulfonato
UV	Ultra violeta - visible
xg	Gravedades

## CAPÍTULO I

### INTRODUCCIÓN

#### 1.1. Acrilamida, propiedades físicas y químicas

La acrilamida (2-propenamida) es la más simple de las amidas  $\alpha$ - $\beta$  insaturadas, tiene propiedades físicas y químicas derivadas de los dos grupos funcionales que posee: amida y enlace vinílico (Figura 1) (Lin *et al.*, 1995). Se puede encontrar como un sólido blanco cristalino o en solución acuosa (Manson *et al.*, 2005).



**Figura 1.** Estructura de la acrilamida.

Es un monómero con masa molecular de 71.08 g/mol con un punto de fusión de  $84.5 \pm 0.3^{\circ}\text{C}$  y de ebullición de  $125^{\circ}\text{C}$  a 125 mm Hg, tiene una densidad de 1.27 g/L a  $25^{\circ}\text{C}$ , no es inflamable y tiene una presión de vapor de  $6.75 \times 10^{-3}$  mmHg (Manson *et al.*, 2005 y Girma, 2006). Es una molécula neutra altamente polar, el grupo amida es capaz de formar puentes de hidrógeno mientras la parte vinílica tiene interacciones hidrofóbicas (Friedman, 2005), por lo tanto tiene un coeficiente de partición octanol/agua de -1.65 hasta -0.67. La solubilidad en diferentes solventes se muestra en la Tabla 1 (Girma, 2006).

**Tabla 1.** Solubilidad de la acrilamida en diferentes solventes.

Solvente	Gramos/100 g de solvente a $100^{\circ}\text{C}$
Acetonitrilo	39.6
Acetona	63.1
Benceno	0.3
Monobutiléter del etilenglicol	31.0
Cloroformo	2.7
1,2-dicloroetano	1.5
N,N-dimetilformamida	119.0
Dimetilsulfóxido	124.0
Dioxano	30.0
Etanol	86.2
Acetato de etilo	12.6
Heptano	$6.8 \times 10^{-3}$
Metanol	155.0
Piridina	61.9
Agua	215.5
Cloroformo	$3.8 \times 10^{-2}$



Comparado con otros monómeros olefínicos, la acrilamida tiene buena estabilidad térmica y una larga vida de anaquel (Girma, 2006), sin embargo, puede polimerizarse inmediatamente a temperaturas por arriba de su punto de fusión (Manson *et al.*, 2005). Se ha demostrado que la acrilamida pura no polimeriza, solo se torna algo amarilla, después de estar almacenada tres semanas a 50°C, e inclusive después de 24 horas a temperaturas justo por debajo de su punto de fusión (80 °C), se puede observar de muy poca a nula formación de poliacrilamida (Girma, 2006).

Dado que la acrilamida tiene un doble enlace reactivo deficiente de electrones y un grupo amida, sufre reacciones típicas de estos grupos funcionales, además exhibe propiedades de un ácido y una base débil (Castle y Eriksson, 2005). Al igual que otras enamidas, la acrilamida es estable bajo condiciones básicas o neutras, pero con ácidos de Bronsted se protona para formar iones N-acilimonio que pueden reaccionar con oxígeno o azufre (Wang y Porco, 2001; Padwa y Brodney, 2002), pero a pHs extremos se hidroliza para formar amonio y ácido acrílico (Girma *et al.*, 2005). El doble enlace electrofílico puede participar en reacciones como adición nucleofílica con grupos funcionales que tengan hidrógenos ácidos, reacciones Diels-Alder o reacciones mediadas por radicales libres (Friedman, 2005; Girma *et al.*, 2005). En un estudio en 1995 Lin *et al.* determinó la afinidad de los probables sitios de protonación en la acrilamida y concluyó, en un modelo teórico, que el átomo de oxígeno es el sitio más probable para protonarse, seguido por el nitrógeno, C<sub>2</sub> y C<sub>1</sub>. La química de la acrilamida es más compleja que la del resto de las amidas alifáticas (Lin *et al.*, 1995).

En presencia de radicales libres la acrilamida fácilmente forma poliacrilamida siguiendo el mecanismo de polimerización vinílica. La polimerización puede ser iniciada por diferentes sistemas entre ellos: peróxidos, persulfatos, pares redox, compuestos azo, sistemas fotoquímicos, perboratos, percarbonatos y radiación (Girma, 2006).

## 1.2 Toxicidad de la acrilamida

Las propiedades físicas y químicas hacen de la acrilamida un agente tóxico capaz de reaccionar con varias biomoléculas (Friedman, 2005). Su bajo peso molecular y alta polaridad le facilitan su distribución en tejidos, lo cual se ha demostrado en experimentos con animales empleando isótopos (Claus *et al.*, 2008). Se ha constatado en diferentes estudios que dosis mayores a 203 mg/kg causan efectos adversos en el desarrollo y reproducción de roedores, tales como, degeneración neural, deficiencia de enzimas intestinales, fertilidad reducida y espermias anormales (El-Ziney *et al.*, 2009).

La acrilamida está catalogada por la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer (International Agency of Research on Cancer) dentro del grupo 2A como un probable carcinógeno para el ser humano, además se sabe que tiene efectos neurotóxicos y genotóxicos (Wang *et al.*, 2008; Küttinga *et al.*, 2009). Una vez ingerida la acrilamida es fácilmente distribuida por todo el cuerpo vía el torrente sanguíneo. Puede ser encontrada en el timo, hígado, corazón, cerebro, riñones e inclusive en leche materna humana. La conjugación de acrilamida a glutatión, así como su epoxidación a gliciamida

en el hígado vía citocromo P450, representa la mayor ruta metabólica. Los estudios toxicocinéticos, revelaron que la epoxidación a gliciamida es considerado un paso crítico para los efectos genotóxicos de la acrilamida y sus metabolitos. Acrilamida y gliciamida, a una mayor proporción, pueden reaccionar con macromoléculas como hemoglobina y enzimas, adicionalmente, la gliciamida puede reaccionar con el DNA, promoviendo mutaciones puntuales y eventualmente cáncer. Aunque los efectos nocivos solo han sido demostrados en bio-ensayos *in vivo* e *in vitro*, en modelos animales y dosis experimentales, la acrilamida permanece “potencialmente cancerígena para humanos” hasta que más estudios provean evidencia clara de lo opuesto. Por lo tanto, la exposición a acrilamida debe permanecer tan baja como sea razonablemente posible (Claus *et al.*, 2008).

### **1.3 Usos, fabricación y exposición a la acrilamida**

#### **1.3.1 Usos**

La acrilamida es utilizada en la producción de polímeros (poliacrilamida) y copolímeros en una gran variedad de industrias con diferentes propósitos (Niaz *et al.*, 2008). Se utiliza en la fabricación de productos orgánicos; en la industria textil y papelera para darle lustre, pulimiento y firmeza a las fibras; en los laboratorios para preparar geles para electroforesis y cromatografía; en el tratamiento de agua potable y no potable se emplea como agente floculante facilitando la remoción de los sólidos

suspendidos; en pozos petroleros para controlar el flujo y en la construcción de túneles y cimientos de presas para prevenir escurrimientos (Küttinga *et al.*, 2009; Kaplan *et al.*, 2009 y Wang *et al.*, 2008).

### **1.3.2 Fabricación**

Existen varios procesos para la fabricación de acrilamida, el más usado desde 1970 por generar productos de alta pureza es la hidratación catalítica del acrilonitrilo a acrilamida, el segundo de mayor uso es el método de ácido sulfúrico. Una hidratación enzimática de acrilonitrilo a acrilamida llevada a cabo por microorganismos también puede ser usada para su fabricación (Manson *et al.*, 2005). Para satisfacer la demanda, en los años noventa, se manufacturaron anualmente en Japón, Estados Unidos y Europa de 50,000 a 77,000 toneladas de acrilamida, y ha sido comercializada a gran escala desde mediados de 1950 (El-Ziney *et al.*, 2009).

### **1.3.3 Exposición**

El monómero usado en la industria y la liberación de residuos de monómero de la poliacrilamida usada en tratamientos de agua y construcción han sido considerados como las dos mayores fuentes de exposición a acrilamida (Girma, 2006). La ruta de exposición con mayor incidencia en el área de trabajo se debe a la absorción dérmica del monómero de acrilamida en solución y la inhalación del monómero seco o solución de acrilamida en aerosol (Küttinga *et al.*, 2009). Debido a la gran solubilidad en agua, tiene

una fácil movilidad en ambientes acuosos, siendo la principal fuente de contaminación la liberación de residuos de monómero por las diferentes industrias que utilizan poliacrilamida (Niaz *et al.*, 2008).

Fuera del área de trabajo, la población en general está expuesta a acrilamida, ya que es posible que los alimentos se contaminen por una migración de acrilamida desde los empaques hacia los comestibles, además está presente en el humo del tabaco (aproximadamente 1 µg por cigarrillo) atribuido a la combustión incompleta de materia orgánica (B'Hymer y Cheever, 2007).

Los diferentes procesos de cocción de alimentos como horneado, fritura o asado inducen la formación de acrilamida, considerándose ésta como un contaminante de alimentos (Wenzi *et al.*, 2007). En abril del 2002 la Administración Nacional Sueca de Alimentos (Swedish National Food Administration, SNFA) detectó altas concentraciones de acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos que fueron sometidos a cocción, originando atención y preocupación internacional (Boroushaki *et al.*, 2010). En mayo del 2002 la Agencia de Estandarización de Alimentos del Reino Unido (UK Food Standards Agency) confirmó los niveles encontrados en alimentos cocinados (Wang *et al.*, 2008).

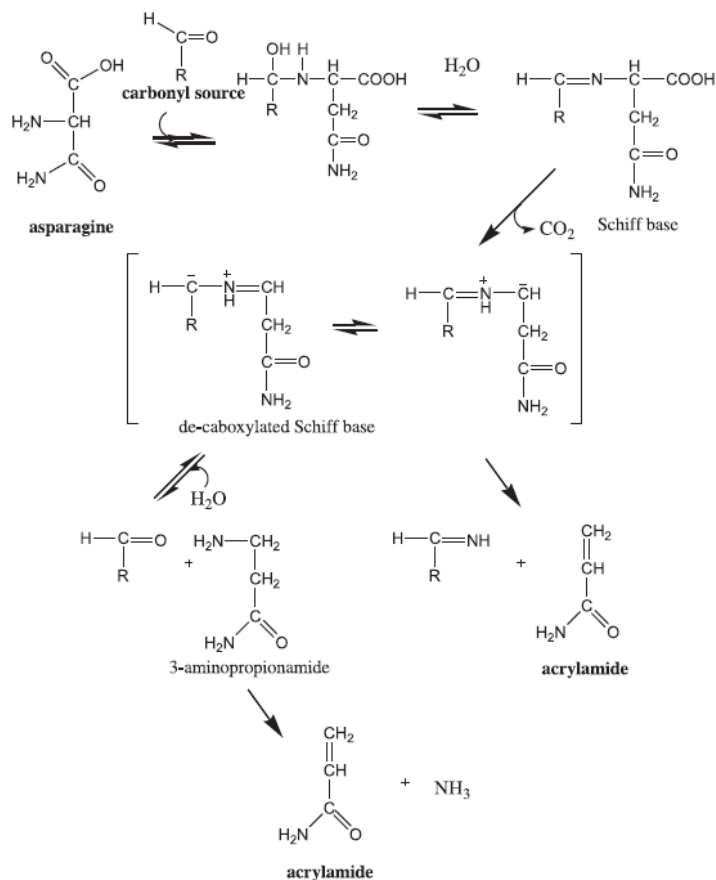
## 1.4 Formación de acrilamida en alimentos

Científicos en el área de alimentos han estado tratando de elucidar la reacción química de la formación de acrilamida en alimentos y buscar tratamientos efectivos para reducir o inhibir su presencia así como investigar la química de su toxicidad (Zhu *et al.*, 2009).

La reacción de Maillard es propuesta como el mecanismo más probable para la generación de acrilamida en alimentos cocinados (Barutcu *et al.*, 2009). Pero predecir el contenido de acrilamida en alimentos sometidos a algún procedimiento de cocción no es sencillo, porque existen múltiples parámetros actuando en este sistema complejo (Kaplan *et al.*, 2009).

Se ha reportado que la incidencia de acrilamida en los alimentos se da durante el proceso llamado reacción oscura de Maillard a temperaturas por arriba de los 120°C (Barutcu *et al.*, 2009), que involucra la reacción de un amino ácido específico y un azúcar reductor. Particularmente la acrilamida se forma como resultados de la reacción entre asparagina y un azúcar reductor (glucosa, fructosa, etc.) Cuando se preparan alimentos horneados, fritos o asados ricos en carbohidratos (Claus *et al.*, 2008 y Kaplan *et al.*, 2009).

Considerando que en principio la asparagina se convierte a acrilamida por descarboxilación y desaminación térmica, durante la cocción de los alimentos los carbohidratos son necesarios para efectuar la conversión de asparagina a acrilamida. En teoría muchos compuestos carbonílicos pueden ayudar a llevar a cabo esta reacción, sin embargo, se ha demostrado que compuestos  $\alpha$ -hidroxi carbonil, como fructosa o glucosa, son mucho más eficientes que otros, debido al efecto reductor en la energía de activación. El primer paso en esta reacción (Figura 2) es la formación de una base de Schiff intermediaria, para la descarboxilación del producto Amadori intacto. La base de Schiff intermediaria puede tanto hidrolizarse para formar 3-aminopropionamida, un precursor potente para la acrilamida, o someterse a una eliminación  $\alpha - \beta$  para formar directamente acrilamida. El mecanismo de formación de acrilamida en la reacción de Maillard todavía no está completamente elucidado, sin embargo, la formación de asparagina y azúcares reductores en la reacción de Maillard representa la principal ruta de formación, mientras otros mecanismos proveen solo caminos adicionales (Claus *et al.*, 2008).



**Figura 2.** Formación de acrilamida en la reacción de Maillard.

La formación de acrilamida depende de la forma como se preparen los alimentos, influyen temperatura y tiempo de cocción, también influye el tamaño, la composición y humedad de los alimentos. La concentración de acrilamida se incrementa con el aumento en el contenido total de asparagina, agua y azúcares reductores (Kaplan *et al.*, 2009). El tipo de aceite usado para la preparación de los alimentos también influye en el contenido total de acrilamida (Mestdagh *et al.*, 2005). La detección de altas concentraciones de acrilamida es común en alimentos cocinados ricos en almidón, evidenciando la fuerte



relación entre la formación de acrilamida y el contenido de azúcar, especialmente glucosa y fructosa (Barutcu *et al.*, 2009).

#### **1.4.1 Estrategias para reducir la formación de acrilamida en alimentos cocinados**

La SNFA y la Universidad de Estocolmo reportaron en el 2002 concentraciones de acrilamida de 30 – 2300  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en alimentos ricos en carbohidratos horneados y fritos. En el mismo año el Instituto Nacional Japonés de Investigación en Alimentos reportó de 64 – 5000  $\mu\text{g}/\text{kg}$  en botanas basadas en papas (Hasegawa *et al.*, 2007). Desde entonces, la Comunidad Europea y la Organización Mundial de la Salud han iniciado proyectos para minimizar el contenido de acrilamida en alimentos tanto comerciales como caseros (Gökmen y Senyuva, 2007).

En sistemas modelo acuosos para monitorear la formación de acrilamida, se comparó el efecto de calentar el sistema modelo en agua hirviendo o en microondas y se concluyó que se genera mayor cantidad de acrilamida cuando se calienta en microondas. También se analizó el efecto de formación de acrilamida con el microondas regulado con diferentes poder de 100 a 600 W y se determinó que es recomendable usar la menor potencias para reducir la formación de acrilamida al cocinar en microondas (Yuan *et al.*, 2007). En otro reporte, también usando sistemas modelo, determinaron que adicionar cationes divalentes en solución a la superficie del alimento, antes de ser cocinado, disminuye la formación de acrilamida. Una posible explicación a este

fenómeno, es que los iones  $\text{Ca}^{2+}$  inhiben la formación de la base de Schiff entre los grupos carbonilo y amino en etapas primarias de la reacción de Maillard (Wenzi *et al.*, 2007).

Un grupo de compuestos fenólicos puede tener efectos contrarios en la formación de acrilamida al reaccionar con diferentes precursores durante el desarrollo de la reacción de Maillard, y de esta manera cambiar la cinética y redireccionar las rutas químicas. Inclusive se conoce que los compuestos fenólicos, como los taninos, pueden precipitar los aminoácidos a través de complejación, modificando la disponibilidad de la asparagina para la reacción de Maillard. Los compuestos fenólicos, y otros compuestos, procedentes de extractos de plantas, han demostrado tener efectos en la formación de acrilamida durante la reacción de Maillard (Zhu *et al.*, 2009).

Debido a la existencia de resultados muy variados de niveles de acrilamida en alimentos, es necesario realizar más estudios relacionados con la concentración de acrilamida en comidas o bebidas procesados a alta temperatura (Kaplan *et al.*, 2009). Inferir los hallazgos de estudios de exposición dietaria de un país a otro resulta inadmisibile por las diferencias entre naciones y regiones geográficas, tanto por los hábitos alimenticios como por las prácticas de elaboración de alimentos (El-Ziney *et al.*, 2009)

En México, el maíz es el alimento base de la dieta diaria, la forma más importante de consumo del maíz es como tortilla. La tecnología de la Nixtamalización permite transformar el maíz para la elaboración de tortillas (Cornejo-Villegas *et al.* 2011). El alto porcentaje de acrilamida encontrado en papas fritas, es debido a las reacciones que se llevan a cabo entre los carbohidratos y los aminoácidos que contiene la papa al momento de cocinarse. El maíz tiene un contenido similar a la papa en carbohidratos y proteínas (Sánchez *et al.*, 2007; Acero, 2000; Amany *et al.*, 2009; Casañas *et al.*, 2002). La nixtamalización degrada las proteínas en sus péptidos individuales aumentando su probabilidad de reaccionar con los azúcares durante el momento de cocción para preparar las tortillas, o al momento de ser sometidas a un proceso de cocción extra al preparar tostadas de maíz. Es por eso que las tortillas tostadas de maíz tienen una alta probabilidad de generar acrilamida.

### **1.5. Legislación internacional para controlar la exposición a acrilamida**

Algunas instituciones han fijado normas para proteger a la población general de la exposición a la acrilamida. Así, la Organización Mundial de la Salud ha fijado una concentración máxima de acrilamida de 0.5 µg/L de agua potable, mientras que la Agencia para el Cuidado del Medio Ambiente de los Estados Unidos prohíbe la presencia de acrilamida en agua potable. Debido a la migración de acrilamida desde los empaques a los alimentos, la Unión Europea estableció la concentración máxima permitida de 10 µg/g en alimentos (Marin *et al.*, 2006). En México no existe regulación

en la concentración de esta molécula en alimentos (García-Lopez y Alfaro-Macedo, 2007).

### **1.6 Métodos analíticos para la cuantificación de acrilamida en alimentos**

Debido a los efectos tóxicos de la acrilamida, a nivel mundial hubo interés en desarrollar métodos analíticos para cuantificar acrilamida, En una publicación de Keramat *et al.* (20011) se reportan los métodos más recientes para cuantificar acrilamida en alimentos, resumidos en la tabla 2. En esta tabla también se incluye el método desarrollado en el Departamento de Química Analítica por Granados-Guzmán en el 2008, para cuantificar acrilamida en tortillas tostadas.

La mayoría de los reportes publicados de procedimientos analíticos para cuantificar acrilamida en alimentos han sido desarrollados en GC-MS o LC/MS (El-Ziney *et al.*, 2009), con la ventaja que cromatografía líquida no necesita derivatización (bromación). Sin embargo, la acrilamida por ser tan polar no es retenida por las fases estacionarias comunes utilizadas en cromatografía líquida y aparecen problemas de interferencias con la matriz de la muestra por lo que es necesario adicionar pasos de preparación de muestra (Küttinga *et al.*, 2009).

**Tabla 2.** Resumen de métodos analíticos para determinar acrilamida en alimentos.

Ref.	Muestra/ alimento	Extracción y limpieza	Columna	Detector, LD y LC
Cromatografía de líquidos				
Brandl <i>et al.</i> , 2002	Varios	Extracción acelerada de mta usando CH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> con 2% etanol, 2 g de mta + 200µL H <sub>2</sub> O en 5 ciclos (10 min cada uno a 80°C, 100 bar).	Synergy Polar-Rp	MS/MS; LD = 10 ng/mL
Rosén y Hellenäs, 2002.	Puré de papas, harina de centeno, pan tostado, papas fritas.	2-4 g de mta + 40 mL H <sub>2</sub> O, homogenización (2 min a 9500xg), centrifugación (3600 rpm, 10 min), extra centrifugación para papas fritas, (10 min a 16,800xg), precipitar por congelación, pretratamiento con SPE con 1 mL de AcN y lavar con H <sub>2</sub> O, filtrar con acrodiscos de 0.22 µm	Hypercarb	MS/MS; LD = <10 µg/kg; LC = 30 µg/kg
Ono <i>et al.</i> , 2003	Varios	50 g de mta + 300 mL de H <sub>2</sub> O, homogenización, centrifugación (20 min x 46000xg), congelar y derretir sobrenadante, centrifugación (10 min a 21 700xg) fraccionamiento de 0.5 – 2 mL de sobrenadante con SPE, colectar fracción y centrifugar (10 min a 27000xg) filtración de sobrenadante a través de acrodiscos de 0,22 µm, centrifugación de filtrado con exclusión molecular de 3 kDa (50 min a 1400xg)	Atlantis dC18	MS/MS LD = 0.2 ng/mL. LC = 0.80 ng/mL
Roach <i>et al.</i> , 2003	Cereal, pan, papas fritas, café	1 g mta + 9mL H <sub>2</sub> O, mezclar 20 min centrifugación 15 min 9000 rpm, centrifugación de 5 mL de la alícuota en un tubo de filtración para centrifuga (2 a 4 min a 9000 rpm) preacondicionar SPE, 3.5 mL MeOH y después 3.5 mL H <sub>2</sub> O	Synergy Hydro-RP	ESI/MS/MS; LD = 10 µg/kg
Becalski <i>et al.</i> , 2003	Papas fritas, cereal tostado, pan y café	16 g de mta + 80 mL de H <sub>2</sub> O + 10 mL CH <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> , mezclar (15 min) centrifugar (2 hrs a 24000xg), centrifugar en filtro para centrifuga de 5 kDa 10 mL de sobrenadante (4 hrs a 4000xg), pasar 5 mL del filtrado a través de cartucho Oasis Max conectado con cartucho Oasis MCX en tándem. Cargar el eluato en un cartucho Envi carv preacondicionado	Hypercarb	MS/MS, LD = 6.0 µg/kg
Riediker y Stadler 2003	Cereal, galletas	Extracción con agua, homogenizar, usando una herramienta de dispersión mezclar con AcN centrifugar, evaporar AcN y resuspender con H <sub>2</sub> O, preacondicionamiento de cartuchos SPE Isolute multimode y Accubond II SCX con MeOH y H <sub>2</sub> O, cargar y colectar 2 mL del extracto, cargar y colectar 1 mL del extracto en el segundo cartucho, colectar eluato. Filtrar con acrodiscos.	Shodex RS pack, columna de gel de polimetacrilato	ESI-MS/MS; LD = 20 – 15 µg/kg; LC = 70 – 45 µg/kg
Mestdagh <i>et al.</i> , 2004	Papas a la francesa	1 g de mta + 10 mL hexano agitar 10 min y centrifugar (10 min a 4000 rpm), remover hexano adicionar 10 mL de H <sub>2</sub> O, centrifugar 20 min a 4000 rpm, ultrafiltración a través de filtro de membrana de 0.45 µm, preacondicionar cartuchos Oasis HLB y Varian Bond Elute Accurate con 5 mL de MeOH y 5 mL de H <sub>2</sub> O y cargar mta.	Atlantis dC 18	MS/MS

Andrzejewski <i>et al.</i> , 2004	Varios	Extracción con H <sub>2</sub> O, en tubos para centrifuga y agitar con vortex (30 seg) centrifugar. Transferir alícuota a tubos de filtración de 0.45 µm y centrifugar. Acondicionar cartucho (Oasis HLB con 3.5 mL de MeOH y H <sub>2</sub> O) cargar 1.5 mL de extracto, eluir con 1.5 mL de H <sub>2</sub> O transferir al segundo cartucho (AcBond Elut/Accucat acondicionado con 2.5 mL de MeOH) eluir con 1 mL de MeOH	Synergy Hydro-RP	MS/MS; LD = 10 µg/kg
Gökmen <i>et al.</i> , 2005	Papas fritas	2 g de mta + 10 mL de MeOH, mezclar por centrifugación (10 min a 11180xg), clarificar el sobrenadante con Carrez I y II y centrifugar, secar 2 mL de sobrenadante con nitrógeno, resuspender en 1 mL de H <sub>2</sub> O, preacondicionar el cartucho Oasis HLB con 1 mL de MeOH y 1 mL de H <sub>2</sub> O, llenar con el extracto (1 mL) y colectar, filtrar a través de acrodisco de 0.45 µm	Atlantis dC 18, Atlantis HILIC, Zorbax SIL, Zorbax Stable-bond, HiChrom 5 C18, Luna C18, Synergy MAXRP,	DAD; LD = 2.0 µg/mL; LC = 4.0 µg/kg
Zhang <i>et al.</i> , 2007	Varios	1.5 g de mta adicionar 20 mL de éter de petróleo reposar 10 min, mezclar 10 min, remover el éter de petróleo y repetir la extracción de grasa, adicionar 7 mL de NaCl (2 M) y agitar por 20 min, centrifugar 15 min a 15000 rpm, extraer el residuo con 8 mL de NaCl, extraer la solución de NaCl con 15 mL de acetato de etilo 3 veces. Secar fase orgánica con nitrógeno, adicionar 1.5 mL de agua al residuo, preacondicionar el cartucho Oasis HLB (3.5 mL de MeOH y 3.5 mL de H <sub>2</sub> O), llenar (1.5 mL) y extraer	Atlantis dC 18	ESI-MS/MS; LD = 1 - µg/kg; LC = 4 -5 µg/kg
Kim <i>et al.</i> , 2007	Arroz, pan, frituras de maíz, papas fritas, dulces y café	10 g de mta + 98 mL de H <sub>2</sub> O, agitar 20 min, centrifugar (10 min a 9000 rpm) acondicionar cartucho de SPE C18 (5 mL de MeOH y 5 mL de H <sub>2</sub> O) cargar y colectar, filtrar a través de filtro de membrana de 0.45 µm	Aqua C18	MS/MS; LC = 2 µg/kg
Genga <i>et al.</i> , 2008	Frituras de papas, comida china frita, comida horneada	2 g de mta + 10 mL de MeOH 75%, tratar con Carrez I y II, agitar (45 min a 100 rpm) centrifugar (10 min a 1000 rpm), evaporar 5 mL de sobrenadante a 1 mL con nitrógeno. Preacondicionar cartucho Oasis HLB (5 mL de MeOH y 5 mL de H <sub>2</sub> O), cargar y eluir con 2 mL de MeOH 10% filtrar con acrodisco de jeringa de 0.45 µm.	HC-75 H <sup>+</sup>	DAD; LD = 30 µg/kg
Liu <i>et al.</i> , 2008	Té	1 g de mta + 9 mL de H <sub>2</sub> O agitar 20 min adicionar 10 mL de AcN + 4 g de sulfato anhídrido de magnesio + 0.5 g de NaCl, mezclar 1 min, centrifugar (5 min a 5000 rpm) separar la capa de AcN y secar con nitrógeno, disolver el residuo en 0.5 mL de H <sub>2</sub> O, filtrar a través de acrodisco de 0.45 µm. Preacondicionar cartucho Oasis MCX (2 mL de MeOH y 2 mL de H <sub>2</sub> O)	ODS C18	MS/MS; LD = 1 ng/mL; LC = 5 ng/mL.

		cargar y coleccionar. Filtrar a través de acrodisco de 0.22 $\mu\text{m}$		
Granados-Guzmán, 2008	Tortillas tostadas	4 g de mta + 40 mL de MeOH, agitar 2 min en vortex y 20 min en agitador rotatorio, centrifugar (15 min 4600 rpm). Filtrar en filtros 0.45 $\mu\text{m}$ (5 min a 4600 rpm). Evaporar MeOH del filtrado. Resuspender en 8 mL de H <sub>2</sub> O. Cargar muestra en cartucho WCX y eluir con MeOH, pasar eluato a ENV+, eluir con MeOH, descartar 9.5 mL y coleccionar 2 mL. Evaporar y reconstituir en 0.1 mL de H <sub>2</sub> O. Filtrar en acrodiscos 0.45 $\mu\text{m}$ e inyectar en HPLC	Tándem ISRP-GFFII e Intersil Ph.	UV 210 nm. LD = 0.017 $\mu\text{g/g}$ y LC = 0.058 $\mu\text{g/g}$ .
Cromatografía de Gases				
Tareke <i>et al.</i> , 2000	Comida frita	10 g de mta + 10 mL de H <sub>2</sub> O, filtración del extracto a través de filtro de fibra de vidrio, purificación en columna de carbograph. Formar derivado bromado	HP PAS 1701	MS; LD = 5 $\mu\text{g/kg}$
Tareke <i>et al.</i> , 2002	Alimentos ricos en proteínas y carbohidratos	10 g de mta + 10 mL de H <sub>2</sub> O, filtrar el extracto a través de filtro de fibra de vidrio, purificación en columna de carbograph. Formar derivado bromado	BPX-10	MS; LD = 5 $\mu\text{g/kg}$
Ono <i>et al.</i> , 2003	Varios	50 g de mta + 300 a 400 mL de H <sub>2</sub> O, homogenizar, centrifugar (20 min a 48000xg) congelar y derretir el sobrenadante, centrifugar 10 min a 21700xg, fraccionar 0.5 a 2 mL de sobrenadante en cartucho de SPE, coleccionar la fracción y centrifugar (10 min a 27000xg), filtrar el sobrenadante a través de acrodisco de 0.22 $\mu\text{m}$ , centrifugar el filtrado con exclusión de 3 kDa (50 min a 14000 xg)	CP-Sil 24 CB	MS; LD = 0.2 ng/mL
Hamlet <i>et al.</i> , 2004	Pan	5 g de mta + H <sub>2</sub> O desionizada, agitar 1 min, adicionar 0.3 mL de ácido acético glacial, tratar con Carrez I y II, centrifugar por 20 min a 1942xg	Rtx-50	MS/MS; LD = 0.01 ng/mL
Pittet <i>et al.</i> , 2004	Cereales	Pesar 15 g de mta en un recipiente para centrifuga de 250 mL, suspender en 150 mL de H <sub>2</sub> O y homogenizar por 30 seg, acidificar la suspensión a un pH de 4 a 5 adicionando ácido acético glacial (aproximadamente 1 mL), tratar sucesivamente con Carrez I y II (2 mL de cada uno), centrifugar a 16000 xg por 15 min, bromar, transferir el extracto a una columna cromatográfica de vidrio que contenga sulfato calcinado de sodio y Florisil activado (5 g de cada uno), usando pequeñas alícuotas diluidas en hexano (50 mL), eluir derivado de acrilamida con acetona (150 mL) evaporar a aproximadamente 2 mL y después secar con nitrógeno, redissolver en acetato de etilo (400 $\mu\text{L}$ ), adicionar trietilamina (40 $\mu\text{L}$ ), filtrar a través de microfilos de 0.2 $\mu\text{m}$	ZB-WAX	MS; LD = 2 $\mu\text{g/kg}$

Dunovska <i>et al.</i> , 2006	Papas tostadas, cereales de desayuno, pan tostado	3 g de mta + 4.5 mL de H <sub>2</sub> O desionizada, sonicar 30 min, adicionar 24 mL de propanol, centrifugar 5 min a 11000 xg, adicionar 5 gotas de aceite de oliva, secar. Disolver el residuo en 2 mL de AcN, extraer grasas con 10 y 5 mL de hexano, mezclar 1 mL de AcN con 50 mg de absorbente PSA, centrifugar por 1 min a 11000 rpm.	INNOW <sub>x</sub>	HRTOF MS, LC = 15 a 40 µg/kg
Serpen y Gokmen 2007	Papas fritas	2 g de mta + 20 mL de MeOH, clarificar con Carrez, centrifugar 10 min a 10000 rpm, usando tubos de filtros para centrifuga de 0.45 µm,	HP INNOWAX	MS; LD = 15 ng/g; LC = 50 ng/g.
Zhang <i>et al.</i> , 2007	Varios	1.5 g de mta adicionar 20 mL de éter de petróleo agitar 10 min, remover el éter de petróleo y repetir la extracción de grasas, adicionar 7 mL de NaCl (2 M), agitar 20 min, centrifugar 15 min a 15000 rpm, extraer el residuo con 8 mL de NaCl.	HP INNOWAX	MECD; LD = 10 µg/kg
Lee <i>et al.</i> , 2007	Papas a la francesa	10 g de mta + 100 mL de H <sub>2</sub> O, centrifugar 10 min a 5000 rpm, diluir alícuota de 1,5 mL a 15 mL con agua, mezclar con 15 mL de buffer a pH 7, extraer con fibra de SPME	DB-WAX Silica	PCI-MS/MS; LD = 0.1 µg/L

Los procedimientos de extracción convencionales generalmente usan solventes que requieren un manejo y disposición especial, hacen etapas repetidas de extracción, centrifugación y concentración con el fin de alcanzar los límites de cuantificación, en algunos casos los solventes forman una emulsión afectando el tiempo total de análisis. Debido a la alta polaridad de la acrilamida, el agua es el solvente de extracción por elección. Sin embargo, usar agua como solvente presenta como inconveniente coextraer la gran mayoría de los componentes de los alimentos como azúcares, proteínas, amino ácidos y ácidos orgánicos. Las técnicas de purificación más frecuentemente usadas incluyen la adición de solución de Carrez para eliminar proteínas, extracción con solventes orgánicos para eliminar grasas y la extracción en fase sólida (SPE). Además de pasos adicionales dependiendo de la complejidad de la muestra (Fernandes y Soares, 2007).



Se han desarrollado técnicas alternativas para cuantificar acrilamida como la polarimetría para análisis en agua, biosensores mutados en nemátodos que en presencia de acrilamida se observa la emisión de la proteína verde fluorescente, métodos basados en electroforesis capilar de zona posterior a repetidos pasos de extracción y limpieza de muestra (Niaz *et al.*, 2008; Hasegawa *et al.*, 2007 y Wenzl, *et al.*, 2007).

El antecedente directo de este trabajo es una tesis de maestría llevada a cabo en el Departamento de Química Analítica, en la cual se desarrolló un método para cuantificar acrilamida en tortillas tostadas de maíz (Granados-Guzman, 2008). El método incluye una preparación de muestra similar al recomendado y expuesto por la FDA (FDA, 2009) sin embargo este método es largo y tedioso. Para optimizar la determinación de acrilamida en tortillas tostadas de maíz en este trabajo se busca implementar el uso de líquidos iónicos y técnicas de microextracción.

### **1.7 Opciones de métodos analíticos amigables con el medio ambiente**

La química analítica verde, principalmente, persigue reemplazar métodos contaminantes por métodos más limpios que minimicen los riesgos ambientales y humanos; para alcanzar este objetivo se ha optado por seguir varias estrategias como sustituir los reactivos tóxicos y miniaturizar las metodologías analíticas (Armenta *et al.*, 2008). En este contexto las técnicas de microextracción se han desarrollado a partir de las técnicas clásicas de tratamiento de muestra como son la extracción en fase sólida

(SPE) y la extracción líquido-líquido (LLE) (Pena-Pereira *et al.*, 2010). Cada técnica de extracción tiene sus propios méritos y la selección del procedimiento de extracción depende de factores, como eficiencia de extracción, costos, simplicidad de operación, tipo y cantidad de medio de extracción (Tobiszewski *et al.*, 2009).

La extracción líquido-líquido LLE puede ser considerada como una técnica clásica para el tratamiento de muestra que ha sido ampliamente usada en diferentes aplicaciones, especialmente para muestras acuosas. El principal inconveniente de LLE es que es procedimiento tardado y laborioso que requiere largas cantidades de solvente orgánico. Estos solventes deben ser de alta pureza, cuyos costos son caros, además de ser tóxicos y generar residuos peligrosos (Yanyan *et al.*, 2007 y Sarafraz-Yazdi y Mofazzeli, 2010).

En años recientes, técnicas de extracción miniaturizada en microescala han sido reportadas como alternativas a la LLE, algunas de ellas son la microextracción en fase sólida (SPME) y la microextracción en fase líquida (LPME). La SPME ha sido satisfactoriamente usada para el análisis de un amplio rango de analitos, desde los volátiles hasta los semivolátiles. Sin embargo, las fibras de SPME son todavía relativamente caras y tienen tiempos de vida limitados, por lo tanto, LPME es una de las alternativas más atractivas. La LPME resuelve varias de las desventajas de la LLE, así como algunas de la SPME (Yanyan *et al.*, 2007; Sarafraz-Yazdi y Mofazzeli, 2010).

La microextracción en gota (SDME) es un enfoque que ha evolucionado de la LPME. En esta técnica, la fase extractante es una gota de solvente, suspendida en la punta de la aguja de una microjeringa, directamente inmersa en una muestra de solución acuosa en agitación o en contacto cercano con su espacio superior (headspace). (Berthod *et al.*, 2008 y Qingyang *et al.*, 2010). Existen reportes que señalan la sustitución de los solventes orgánicos tradicionales en la SDME, por solventes amigables con el medio ambiente como son los líquidos iónicos (Sarafraz-Yazdi y Mofazzeli, 2010).

### 1.8 Microextracción en gota

La SDME está basada en el principio de que la relación entre la concentración del soluto en las fases inmiscibles es constante una vez alcanzado el equilibrio. Puede ser explicado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Coeficiente de distribución} = \frac{\text{Concentración del soluto fase orgánica}}{\text{Concentración del soluto fase acuosa}} \quad (\text{Ec. 1})$$

Las fases inmiscibles comúnmente son una fase orgánica y una acuosa, en el numerador está la fase extractante. Una gota de solvente es expuesta a una solución acuosa que contiene el analito y es extraído hacia la gota. De esta manera, es posible alcanzar altos factores de enriquecimientos debido a la alta proporción de volumen de

fase acuosa contra el volumen de fase orgánica. Después de la extracción, la microgota es retraída nuevamente dentro de la microjeringa e inyectada en el instrumento analítico como un cromatógrafo de gases o un cromatógrafo de líquidos (Pakade y Tewary, 2010).

La eficiencia de extracción depende en varios parámetros: naturaleza del solvente de extracción, tiempo de exposición, agitación, volumen de la gota de solvente y concentración de sal (Pakade y Tewary, 2010 y Xu *et al.*, 2007).

Se sabe que la estabilidad de una gota de solvente inmiscible depende de varios factores, el volumen de la gota, la densidad del solvente orgánico y la densidad del solventes acuoso. Para tener una gota que no se desprenda de la punta de la aguja se necesita una fuerza de adhesión adecuada. Por lo tanto hay limitaciones experimentales en el volumen de gota lo que define la cantidad de analito extraído, esto puede afectar la eficiencia de extracción (Pakade y Tewary, 2010 y Ye *et al.*, 2007).

La velocidad de agitación es otro parámetro que afecta la eficiencia de extracción en la SDME. En general, la extracción es potenciada a mayores velocidades de agitación, pero debe ser optimizada con miras de tener una gota estable. Algunos autores han modificado la forma de la punta de la aguja para aumentar el área de contacto aguja-solvente, resultando en mayor adherencia entre la gota y la punta, lo que permite que la gota pueda soportar mayor velocidad de agitación (Pakade y Tewary, 2010 y Ye *et al.*, 2007). Una alternativa contemporánea que resuelve el problema de la inestabilidad de la

gota es el uso de solventes versátiles como son los líquidos iónicos debido a su baja presión de vapor y alta viscosidad, permiten el uso de mayores y reproducibles volúmenes de extracción (Sarafraz-Yazdi y Mofazzeli 2010).

## 1.9 Líquidos iónicos

Se considera líquido iónico, a cualquier sal que tenga un punto de fusión por debajo de los 100°C. Si el punto de fusión está por debajo de la temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ), el líquido iónico se le conoce como líquido iónico a temperatura ambiente (Berthod, *et al.*, 2008).

Los líquidos iónicos son una clase nueva de solventes con peculiares características, entre ellas: amplio rango de temperaturas en el que se encuentran en estado líquido, baja volatilidad (casi nula presión de vapor), buena estabilidad térmica, conductividad eléctrica, amplio rango de viscosidad, miscibilidad ajustable, son reusables, no inflamables y habilidad para disolver compuestos orgánicos e inorgánicos (Sun y Armstrong, 2010 y Crosthwaite *et al.*, 2004)

Los líquidos iónicos han ganado popularidad como una alternativa de solventes “verdes” para ser aplicados en procesos electroquímicos, de síntesis y separación (Chiappe y Pieraccini, 2005). Como solventes alternativos para reacciones orgánicas y

procesos catalíticos, los líquidos iónicos poseen propiedades fisicoquímicas que los hacen un medio mejorado para incrementar la reactividad y selectividad, entre otras características (Chiappe *et al.*, 2009). En las separaciones analíticas se emplean debido a: su alta conductividad eléctrica que es importante cuando son usados como electrolitos en electroforesis capilar; su alta viscosidad y tensión superficiales que están relacionados con su utilización como revestimiento en las columnas de cromatografía de gases y características peculiares mencionadas anteriormente permiten su aplicación en la extracción líquida y preconcentración en headspace (Berthod *et al.*, 2008). Además, los líquidos iónicos son compatibles con la cromatografía en fase líquida y pueden ser inyectados directamente en el cromatógrafo por ser no volátiles e inocuos con la columna cromatográfica (Qingyang *et al.*, 2010).

La Tabla 3 muestra métodos por HPLC desarrollados para diversos análisis cuando están presentes líquidos iónicos.

La razón principal por la que los líquidos iónicos son estables, es la atracción entre sus iones con diferente carga. Esta atracción hace que los iones se junten, con lo que se libera energía y se logra que los iones formen una matriz o red. El relativamente gran tamaño de uno o ambos de los iones en los líquidos iónicos y su asimetría son factores para la gran estabilidad y el bajo punto de fusión de estos materiales (Brown *et al.*, 2004).

**Tabla 3:** Métodos cromatográficos para análisis en presencia de IL.

Ref.	Fase. Estacionaria	Fase Móvil	Det.	Téc. $\mu$ Ext	IL*
Zhang y Shi 2010	C18	0.1% Ac. Acético – Acetonitrilo al 19% en metanol 24:76	UV	DLLME	HMIM PF <sub>6</sub>
He <i>et al.</i> 2010	C18	Agua – Metanol 28:72	UV	DLLME	BBIM PF <sub>6</sub>
Cruz-Vera <i>et al.</i> 2009.	C18	Agua – Metanol – Ac. acético 40:60:20	UV	DLLME	BMIM PF <sub>6</sub>
Bai <i>et al.</i> 2009	C18	Agua - Metanol 20:80	UV	DLLME	HMIM PF <sub>6</sub>
Cruz-Vera <i>et al.</i> 2008	Tándem C18–C8	Agua – Metanol – Ac. Acético 40:50:20	UV	dLPME	BMIM PF <sub>6</sub>
Cruz-Vera <i>et al.</i> 2009	Tándem C8–C18	Agua – Acetonitrilo – Ac. Acético 40:40:20:2	UV	dLPME	BMIM PF <sub>6</sub>
Chang <i>et al.</i> 2008	C18	Agua - Acetonitrilo (Gradiente)	UV	DLLME	BMIM PF <sub>6</sub>
He <i>et al.</i> 2009	C18	Agua – Metanol 25:75	UV	DLLME	OMIM PF <sub>6</sub>
Liu <i>et al.</i> 2004	C18	Agua - Acetonitrilo 30:70	FD	SDME	HMIM PF <sub>6</sub>
Liu <i>et al.</i> , 2005	C18	Agua - Acetonitrilo 30:70	UV	SDME	OMIM PF <sub>6</sub>
Pena <i>et al.</i> 2009	C18	Agua - Acetonitrilo (Gradiente)	FD	DLLME	OMIM PF <sub>6</sub>
Pena-Pereira <i>et al.</i> 2009	C18	0.1% Ac. Acético/Acetato de sodio pH 4 + 50 $\mu$ M EDTA – Metanol – Tetrahidrofurano 32:32:36	UV	SDME	HMIM PF <sub>6</sub>
Peng <i>et al.</i> 2005	C18	Agua – Acetonitrilo 50:70	UV	SDME	BMIM PF <sub>6</sub>
Ravelo-Pérez <i>et al.</i> 2009	C18	Agua - Acetonitrilo (Gradiente)	UV	DLLME	HMIM PF <sub>6</sub>
Vidal <i>et al.</i> 2007	C18	Agua - Acetonitrilo 35:65	UV	SDME	BMIM PF <sub>6</sub>
Vidal <i>et al.</i> , 2007.	C18	Agua – Metanol 40:60	UV	SDME	HMIM PF <sub>6</sub>
Vidal <i>et al.</i> , 2010.	C18	1% Ac. Acético – Etanol 30:70	UV	SDME	HMIM PF <sub>6</sub> BMIM PF <sub>6</sub>
Ye <i>et al.</i> 2007.	C18	Agua – Metanol 10:90	UV	SDME	BMIM PF <sub>6</sub>
Zhou <i>et al.</i> , 2008.	C18	Agua – Metanol 20:80	UV	DLLME	HMIM PF <sub>6</sub>
Yao <i>et al.</i> , 2009.	C18	Agua - Acetonitrilo (Gradiente)	UV – FD	SDME	HMIM FAP, PH <sub>3</sub> T FAP, BMPyrrol FAP, HNH <sub>2</sub> MPL FAP
Mrozik <i>et al.</i> , 2008.	CN	Buffer de citratos 0.01 M pH 6 – Metanol 45:55	UV		PMIM BF <sub>4</sub> , AMIM BF <sub>4</sub> ,

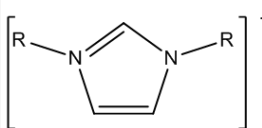
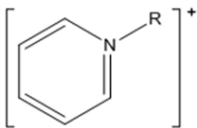
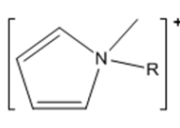
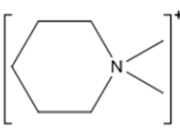
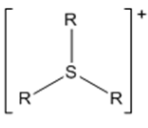

					BMIM Cl, HMIM Cl, OMIM Cl, BEIM BF <sub>4</sub> , EEIM Br
Flieger, 2011.	C18	Agua – Metanol 90:10	UV		BMIM Cl, BF <sub>4</sub> , PF <sub>6</sub>
Flieger, 2011.	C18	Cloruro de sodio 0.01 M - Acetonitrilo 70:30	UV		OMIM, BMIM, HMIM, EMIM BF <sub>4</sub>
Stepnowski <i>et al.</i> , 2006.	C18	Buffer de fosfatos 5 mM pH 3 - Metanol 98 – 80 : 2 – 20	UV		EMIM, PMIM, BMIM, MBPyr, BzMIM, EBzMIM, HMIM Cl
Stepnowski <i>et al.</i> , 2006.	C6	0.5% Ac. Trifluoroacético – Metanol 95:5	UV		EMIM, EEIM, PMIM Cl
SIELC 2012	Mixto FI-CI	Acetato de amonio 40mM 40 mM – Acetonitrilo 80:20	ELSD		PMIM Br
Markowska y Stepnowski 2008..	Tándem Intercambio aniónico fuerte- intercambio catiónico fuerte	Ftalato ácido de potasio 5mM/ Ac. ftálico 15mM pH 3.05 – Acetonitrilo 45:55	Ohm		BMIM Cl, Br, BF <sub>4</sub> , NTfO <sub>2</sub> , PF <sub>6</sub> ; AMIM Cl; PMIM Cl; HMIM Cl, NTfO <sub>2</sub> ; OMIM Cl, BF <sub>4</sub> ; DMIM Cl; NMIM Cl, PF <sub>6</sub> .

\*HMIM: 1-hexil-3-metilimidazolio; PF<sub>6</sub>: Hexafluorofosfato; BMIM: 1-butil-3-metilimidazolio; E<sub>3</sub>N: trietilamonio; OMIM: 1-metil-3-octilimidazolio; FAP: tris(pentafluoroetil)trifluorofosfato; PH<sub>3</sub>T: trihexil(tetradecil)fosfonio; BMPyrrol: 1-butil-1-metilpirrolidinio; HNH<sub>2</sub>MPL: 1-(6-amino-hexil)-1-metilpirrolidinio; PMIM: 1-metil-3-propilimidazolio; BF<sub>4</sub>: Tetrafluorborato; AMIM: 1-amil-3-metilimidazolio; Cl: Cloruro; BEIM: 1-butil-3-etilimidazolio; EEIM: 1,3-dietilimidazolio; Br: Bromuro; EMIM: 1-etil-3-metilimidazolio; MBPyr: 4-metil-N-butilpiridinio; BzMIM: 1-benzil-3-metilimidazolio; EBzMIM: 1-etilbenzil-3-metilimidazolio; NTfO<sub>2</sub>: bis(trifluorometilsulfonil)imida; DMIM: 1-decil-3-metilimidazolio; NMIM: 1-metil-3-nonilimidazolio.


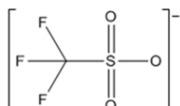
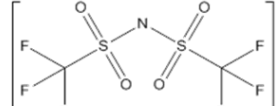

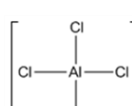
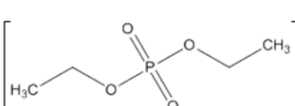
La mayoría de los líquidos iónicos están formados por cationes orgánicos (imidazolio, piridinio, pirrolidinio, fosfonio, amonio). Los aniones pueden ser inorgánicos incluyendo halógenos, PF<sub>6</sub><sup>-</sup>, BF<sub>4</sub><sup>-</sup> y actualmente se encuentra un mayor número de aniones orgánicos, como el trifluorometilsulfonato [CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, bis(trifluorometil)sulfonilimida [(CF<sub>3</sub>SO<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N]<sup>-</sup>, metano sulfonato [CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]<sup>-</sup>, entre



otros. En la Figura 3 se muestran las estructuras de algunos cationes y aniones que están presentes comúnmente en los líquidos iónicos. Una importante característica de los líquidos iónicos es que la variación del catión o el anión puede afectar significativamente las propiedades físicas y químicas. De tal forma que, la gran variedad de cationes y aniones originan un alto número de líquidos iónicos y hacen posible el diseño de solventes específicos para diferentes aplicaciones (Nageshwar *et al.*, 2010). Se estima que puede haber hasta más de  $10^{18}$  líquidos iónicos disponibles. Esto provee una gran cantidad de líquidos iónicos para seleccionar en aplicaciones específicas (Sun y Armstrong, 2010).

Cationes			
Estructura			
Nombre	Imidazolio	Piridinio	Pirrolidinio
Estructura			
Nombre	Piperidinio	Sulfonio	Amonio

Aniones			
Estructura			
Nombre	Tetrafluoroborato	Trifluorometilsulfonato	Bis (trifluorometilsulfonyl) imida
Estructura			
Nombre	Hexafluorofosfato	Tetracloroaluminato	Diethylfosfato

**Figura 3.** Estructura de algunos cationes y aniones que integran a los líquidos iónicos.

Los líquidos iónicos se pueden comportar marcadamente diferente de los líquidos moleculares cuando son usados como solventes (Sun y Armstrong, 2010).

La naturaleza del proceso de solvatación y la relación estructura-polaridad de los líquidos iónicos todavía no se conoce completamente, a pesar de las múltiples aplicaciones que se le han dado a los líquidos iónicos como solvente. Usualmente, los solventes moleculares están clasificados de acuerdo a su polaridad y constante dieléctrica, en el caso de los líquidos iónicos tratar de racionalizar su comportamiento de solvente de acuerdo a lo establecido para los solventes moleculares no es acertado (Weingartner *et al.*, 2007; Chiappe *et al.*, 2009).

Los líquidos iónicos forman una red polimérica tridimensional altamente ordenada de cationes y aniones enlazados por interacciones Coulómbicas, dipolares y/o puentes de hidrógeno. La estructura de los componentes individuales (anión y/o catión) afecta notoriamente la habilidad de los líquidos iónicos para interactuar con especies disueltas. Se ha publicado que algunos líquidos iónicos son solventes con polaridad semejante a algunos alcoholes de cadena corta, siendo más polares que solventes como acetona o dimetilsulfóxido, pero menos polares que el agua (Lohse *et al.*, 2008; Nageshwar *et al.*, 2010). Además dentro del medio iónico de los líquidos iónicos emergen estructuras a nanoescala como las cadenas alifáticas sustituyentes, de esta manera los solutos pueden distribuirse preferentemente dentro de uno u otro dominio, sugiriéndose que existen regiones con diferentes polaridades (Chiappe *et al.*, 2009; Luczak *et al.*, 2008).

No solo la estructura de los componentes de los líquidos iónicos determinan las propiedades fisicoquímicas, sino también la temperatura, mezclas con otros líquidos iónicos o solventes moleculares pueden afectar su solubilidad, densidad, capacidad de solubilizar algunas moléculas y polaridad (Nageshwar *et al.*, 2010).

## **CAPÍTULO II**

### **JUSTIFICACIÓN**

Debido a que los métodos actuales para el análisis de acrilamida incluyen procesos de preparación de muestra largos, costosos y poco eficientes es necesario buscar nuevas alternativas para su cuantificación.

Las virtudes de las técnicas de microextracción fusionadas con la versatilidad de las aplicaciones de los líquidos iónicos permiten suponer que las dificultades en la extracción de acrilamida pueden ser superadas al usar líquidos iónicos como fase extractante, optimizando recursos y cuidando el medio ambiente.

## **CAPÍTULO III**

### **OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

Desarrollar un método de análisis de acrilamida usando microextracción en gota (SDME) y líquidos iónicos para aplicarlo en muestras de tortillas tostadas de maíz.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Desarrollar el método cromatográfico para la separación de acrilamida de los líquidos iónicos.

2. Seleccionar los líquidos iónicos para su utilización en microextracción en gota (SDME).
3. Desarrollar y validar un procedimiento de SDME para el análisis de acrilamida.
4. Aplicar el método desarrollado para el análisis de acrilamida en muestras de tortillas tostadas.

## CAPÍTULO IV

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### 4.1 Reactivos

En el desarrollo de este trabajo se utilizaron los siguientes reactivos:

- Acetonitrilo, TEDIA, Grado HPLC
- Acido fórmico, Merck, ACS 98 -100 %
- Ácido trifluoroacético, Sigma Aldrich  $\geq 98$  %
- Agua bidestilada plus, Laboratorios Monterrey.
- Formiato de Amonio, Riedel de Haën, 98%.
- Metanol, TEDIA, grado HPLC.
- Solución de hidróxido de amonio, 25 %, Sigma-Aldrich.
- Acrilamida, Sigma,  $\geq 99\%$

Se utilizaron los siguientes líquidos iónicos:

- 1-butil-3-metilimidazolio hexafluorofosfato (BMIM PF<sub>6</sub>), Aldrich
- 1-etil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida (EMIM NTfO<sub>2</sub>), Ionic Liquid Technologies (IO-LI-TEC).
- 1-hexil-3-metilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida (HMIM NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC.
- 1-hexil-3-metilimidazolio trifluorometilsulfonato (HMIM TfO), IO-LI-TEC
- 1-metil-3-octilimidazolio hexafluorofosfato (OMIM PF<sub>6</sub>), Aldrich.
- 1,2- dimetil-3-propilimidazolio bis(trifluorometilsulfonil)imida (MMPIM NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC
- 3-metil-1-propilpiridinio bis(trifluorometilsulfonil)imida (MPPyt NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC
- Butiltrimetilamonio bis(trifluorometilsulfonil)imida (BTMA NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC
- Metiltrioctilamonio bis(trifluorometilsulfonil)imida (MTOA NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC
- 1-metil-1-propilpirrolidinio bis(trifluorometilsulfonil)imida (MPPyrr NTfO<sub>2</sub>), Tokio Chemical Industry (TCI)
- 1-metil-1-propilpiperidinio bis(trifluorometilsulfonil)imida (MPPipe NTfO<sub>2</sub>), IO-LI-TEC
- Trietilsulfonio bis(trifluorometilsulfonil)imida (TES NTfO<sub>2</sub>), Fluka



- 1-decil-3-metilimidazolio tetrafluorborato (DMIM BF<sub>4</sub>), Aldrich
- 1-butil-3-metilimidazolio trifluorometilsulfonato (BMIM TfO), Fluka
- Bromuro de 1-decil-3-metilimidazolio (DMIM Br), IO-LI.TEC
- 1-etil-3-metilimidazolio metanosulfonato (EMIM Ms), Fluka
- 1-etil-3-metilimidazolio tetrafluorborato (EMIM BF<sub>4</sub>), TCI
- 1-butil-2,3-dimetilimidazolio tetrafluorborato (MMBIM BF<sub>4</sub>), Aldrich
- 1-butilpiridinio tetrafluorborato (BPyr BF<sub>4</sub>), TCI
- Nitrato de etilamonio (EA NO<sub>3</sub>), IO-LI-TEC
- 1-etil-3-metilimidazolio dietilfosfato (EMIM DEFosf), Aldrich
- 1-etil-3-metilimidazolio tetracloroaluminato (EMIM AlCl<sub>4</sub>), Aldrich

#### 4.1.1 Preparación de reactivos

- Fases Móviles:

*Ácido trifluoroacético (TFA) 50 mM, pH 4:*

En un matraz volumétrico de 500 mL se diluyeron 2 mL de ácido fórmico concentrado y 2 mL de TFA concentrado con agua desionizada. El pH se ajustó con potenciómetro, adicionando NH<sub>4</sub>OH en solución.

*Solución de formiato de amonio 40 mM a pH 4 y 5.*

Se pesaron 1.2612 g de formiato de amonio en un vidrio de reloj, se disolvió en poco de agua y se transfirió a un matraz volumétrico de 500 mL. El pH se ajustó con potenciómetro, adicionando ácido fórmico concentrado.

### *Ácido fórmico 0.1 %.*

En un matraz volumétrico de 500 mL se diluyeron 0.5 mL de ácido fórmico concentrado y se aforó con agua desionizada.

- Estándares:

### *Solución stock de acrilamida.*

Se pesaron 10 mg de acrilamida y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10 mL, aforando con el solvente adecuado (agua, metanol o acetonitrilo).

### *Solución de 20 ppm para las pruebas cromatográficas.*

Se diluyeron 30  $\mu$ L de la solución stock de acrilamida hasta 1.5 mL.

## **4.2 Material**

Para el desarrollo del método cromatográfico se utilizaron las siguientes columnas.

- Atlantis dC 18 (150 x 2.1 mm, 3  $\mu$ m; Waters Corporation, USA)
- Guarda columna Atlantis dC 18 (20 x 2.1 mm, 3  $\mu$ m; Waters Corporation, USA)
- Discovery Cyano (150 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m; Supelco, Sigma-Aldrich Co, USA)
- Atlantis HILIC silica (100 mm x 2.1 mm, 3  $\mu$ m; Waters Corporation. USA)
- Obelisc R (150 x 4.6 mm, 5 $\mu$ m, SIELC Technolgies, USA)
- Guarda Columna Obelisc R(10 x 4.6 mm, 5  $\mu$ m, SIELC Technolgies, IL, USA)

- Luna CN (150 x 2.0 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA)
- Guarda Columna CN (4.0 x 2.0 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA)
- Hypercarb (100 x 2.1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Thermo, USA)
- Guarda columna Hypercarb (10 x 2.1 mm, 3  $\mu\text{m}$ , Thermo, USA)

Para filtrar las muestras se utilizaron:

- Filtros para centrifuga Ultrafree-CL, tamaño de poro 0.45  $\mu\text{m}$ , membrana Durapore PVDF con capacidad de 2 mL, Millipore (USA).
- Unidad filtrante descartable Millex GV, membrana durapore PVDF poro 0.22  $\mu\text{m}$ , 13 mm diámetro, Millex (Brasil).

Para filtrar las fases móviles se utilizó:

- Membranas de nylon de 0.45  $\mu\text{m}$ , Pall (USA).

Para la SDME se utilizó:

- Jeringas Hamilton Gastight de 25  $\mu\text{L}$ , aguja de punta roma 22 ga, serie 1700 (USA).

### 4.3 Equipos

Se utilizaron los siguientes equipos:

- Cromatógrafo de líquidos HP 1100 Hewlett-Packard (USA). Equipado con desgasificador, sistema de bombeo cuaternario, inyector automático, detector de UV variable.
- Espectrofotómetro DU 7500, arreglo de diodos UV-Vis, Beckman Coulter (USA).
- Balanza analítica GR-120, AND, (Japón).
- Balanza semianalítica GX-200, AND (Japón).
- Potenciómetro pH 30', Hanna Instruments (USA).
- Equipo de purificación de agua Purelab UHQ-II MK3, Elga (UK).
- Baño de ultrasonido, Branson 3510, Branson (USA).
- Centrifuga IEC Centra CL3, Thermo Scientific (USA).
- Plancha de calentamiento Cimarec, Barnstead Internacional (USA).
- Vórtex Thermolyne Tipo 37600, Barnstead Internacional, (USA).
- Incubadora, combi-SV12DX, FINE PCR, Digger (USA).
- Agitador de plataforma, Nutating Mixer, VWR International (USA).
- Equipo de filtración rápida, matraz de 2 L y embudo portafiltros, Millipore (USA).

#### **4.4 Características de la muestra**

Se utilizaron muestras de tortillas tostadas horneadas de maíz disponibles comercialmente de 2 marcas distintas: HEB y Sanissimo. El muestreo se realizó al azar.

#### **4.5 Espectro UV**

Una alícuota de una solución de acrilamida de 20 ppm se colocó en una celda de cuarzo de 1 cm de trayecto óptico y se determinó su espectro UV con un barrido desde 190 hasta 400 nm.

#### **4.6 Miscibilidad de los líquidos iónicos**

La miscibilidad de los líquidos iónicos (IL) se determinó de acuerdo al método estándar de prueba para miscibilidad en agua de solventes solubles en agua de la ASTM (ASTM, 2009). Se preparó una mezcla de IL-solvente al 10% en viales de 2 mL. Los solventes que se usaron fueron agua bidestilada, metanol y acetonitrilo. Una vez preparada la mezcla de 10 % IL, se tapó con una tapa de rosca con septa, se colocó en un agitador de plataforma dentro de la incubadora precalentada a 25°C, se dejó agitar por 30 minutos junto con un control (solamente el solvente). Una vez transcurrido el tiempo

de agitación, se dejó reposar durante 30 minutos a 25°C. Se comparó el aspecto de la solución con el control del solvente, si se observa turbidez los solventes son inmiscibles.

#### **4.7 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción**

Para determinar el máximo volumen de IL que puede suspenderse en punta de la jeringa de forma estable, se realizaron pruebas de exposición con diferentes volúmenes. Para ello, el IL se tomó con una microjeringa de 25  $\mu\text{L}$  y la gota se expuso a 3 mL de agua bidestilada a una temperatura de 30°C y agitando a 300 rpm. Se evaluaron agujas con punta biselada y roma. Además se evaluó el uso de un tubo de PTFE.

El tiempo máximo de exposición de la gota fue determinado para los IL que tuvieron la capacidad de formarla. Las pruebas se realizaron de la misma forma que las de volumen de gota. Se tomó el volumen máximo de gota y se midió el tiempo que se mantenía sin desprenderse de la punta de la aguja. Se trabajó a una velocidad de agitación de 600 rpm y a una temperatura de 50°C. Se fijó como máximo un tiempo de 60 minutos.

## 4.8 Método cromatográfico

### 4.8.1 Optimización de las condiciones de separación

Para optimizar las condiciones de separación, se partió del método cromatográfico reportado por Granados-Guzmán (2008), que se muestra en la tabla 4.

**Tabla 4.** Condiciones iniciales del método HPLC.

Columna	Fase Móvil	Temperatura (°C)	Detección Uv (nm)	Flujo (mL/min)	Vol. inyección (µL)
Atlantis dC18	Agua: MeOH (99:1)	Ambiente	210	0.3	20

Se evaluaron distintas columnas con diferentes fases móviles. Todas las fases se mantuvieron en refrigeración en botellas de vidrio de 500 mL con tapa de rosca almacenándose máximo 7 días. Antes de usarse en el HPLC fueron atemperadas, filtradas con un equipo de filtración rápida Millipore con membranas de nylon de 0.45 µm de tamaño de poro y desgasificadas en baño de ultrasonido por 5 minutos.

Las pruebas realizadas se resumen en la Tabla 5. En todos los ensayos el volumen de inyección fue de 5 µL y la detección se realizó a 210 nm. Para su análisis por HPLC, los IL se diluyeron mezclando 20 µL con 80 µL de solvente orgánico.

**Tabla 5.** Condiciones cromatográficas evaluadas.

<b>Fase móvil</b> <b>Columna</b>	<b>TFA 50 mM, pH</b>	<b>Formiato de amonio</b> <b>40 mM</b>	<b>Ácido Fórmico</b> <b>0.1 %.</b>	<b>Agua Desionizada</b>
<b>Atlantis</b> <b>dC18</b>	40°C, 0.15 mL/min, 99:1 metanol	pH 5, 0.15 mL/min, 99:1 acetonitrilo.		40°C, 0.20 mL/min, 99:1 metanol.
				30°C, 0.15 mL/min, 99:1 metanol (gradiente)
				0.15 mL/min, 99:1 metanol.
<b>Cyano</b> <b>Discovery</b>			pH 3.5, 40°C, 1 mL/min, 1:99 acetonitrilo.	
			pH sin ajustar, 40°C, 1 mL/min, 99:1 metanol.	
			pH sin ajustar, 30°C, 1 mL/min, 99:1 metanol.	
<b>Atlantis</b> <b>HILIC</b> <b>Silica</b>				40°C, 0.2 mL/min, 5:95 acetonitrilo
<b>Luna</b> <b>CN</b>			30°C, 0.15 mL/min, 99:1 metanol	
			30°C, 0.15 mL/min, 99:1 acetonitrilo	
<b>Obelisc</b> <b>R</b>		30°C, pH 4, 0.2 mL/min, 80:20 acetonitrilo		
		pH 5, 30°C, 0.3 mL/min, 99:1 acetonitrilo		
		pH 5, 0.15 mL/min, 99:1 acetonitrilo		
<b>Hypercarb</b>		pH 5, 0.15 mL/min, 99:1 acetonitrilo		0.15 mL/min, 30°C, 99:1 acetonitrilo
		pH 5, 0.15 mL/min, 95:5 acetonitrilo		0.15 mL/min, 99:1 metanol



## **4.8.2 Validación del sistema cromatográfico**

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

### **4.8.2.1 Linealidad**

Se construyó una curva de calibración con 5 estándares metanólicos de acrilamida por triplicado en concentraciones entre 2 y 32 ppm. Utilizando el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para el área en función de la concentración y se verificó la linealidad considerando el coeficiente de correlación (Secretaría de Salud, 2011).

### **4.8.2.2 Precisión.**

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

### **4.8.2.3 Exactitud**

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

### **4.8.2.4 Límite de detección (LD) y cuantificación (LC)**

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

## **4.9 Pruebas de solubilidad y coeficiente de partición**

### **4.9.1 Solubilidad**

La solubilidad se determinó de acuerdo al protocolo de la OECD con algunas modificaciones (OECD, 1995). En viales Micro-V de encapsulado transparentes de 1.2 mL se depositaron 100  $\mu$ L de IL y se determinó su peso. Se adicionaron 10 mg de estándar de acrilamida, se agitó en vórtex por 5 minutos. Se inspeccionó el contenido del vial para comprobar si la acrilamida se disolvió por completo, en caso de no haber sólido

disuelto, se adicionó acrilamida de 10 mg en 10 mg, hasta confirmar la presencia de acrilamida no disuelta. El vial sellado se incubó a 25°C en agitación constante durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se retiraron los viales de la incubadora y se centrifugaron por 3 minutos a 1500 rpm y 25°C para separar el sólido no disuelto de la solución saturada. Se tomaron 20 µL de la solución saturada y se diluyeron con 100 µL de metanol, colocándolo en un inserto de fondo cónico. De esta solución se tomaron 5 µL y se diluyeron en 1 mL de metanol. El contenido de acrilamida en esta última solución se cuantificó por HPLC. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración de acrilamida en metanol en concentraciones de 12.5, 25, 62.5, 125 y 250 ppm. Todas las pruebas se realizaron por duplicado.

#### **4.9.2 Coeficiente de partición**

Para determinar el coeficiente de partición se siguió el protocolo de la OECD con algunas modificaciones (OECD, 1995). En viales Micro-V de encapsulado transparentes se mezclaron 500 µL de agua desionizada con 500 µL de líquido iónico. El vial sellado se incubó a 25°C en agitación constante durante 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, los viales se dejaron reposar por 24 horas a 25°C para después separar las fases. Con la fase acuosa saturada de IL se preparó una solución 0.01 M de acrilamida. Posteriormente, en viales Micro-V de encapsulado transparentes se mezclaron 100 µL de esta solución de acrilamida con 100 µL del líquido iónico saturado con agua. Esta mezcla se agitó durante 5 minutos usando vórtex y después se centrifugó por 3 minutos a 4000 rpm y 25°C para separar las fases. Se tomaron 20 µL del líquido

iónico y se diluyeron con 100  $\mu\text{L}$  de metanol. El contenido de acrilamida en esta solución se cuantificó por HPLC. Para la cuantificación se construyó una curva de calibración de acrilamida en metanol en concentraciones de 1, 5, 10, 20 y 40 ppm. La fase acuosa restante se transfirió a un vial con inserto de fondo cónico de 200  $\mu\text{L}$  para cuantificar el contenido de acrilamida. Para ello, se construyó una curva de calibración de acrilamida en agua a concentraciones de 0.002, 0.004, 0.006, 0.008 y 0.01 M. Además como control, se analizó la solución de acrilamida 0.01 M preparada con la fase acuosa saturada de líquido iónico. Todas las pruebas se realizaron por triplicado.

El coeficiente de partición se determinó con la siguiente ecuación (Ec. 2):

$$\log P_{\frac{\text{líquido iónico}}{\text{agua}}} = \log \frac{[\text{acrilamida}]_{\text{L.iónico}}}{[\text{acrilamida}]_{\text{agua}}} \quad (\text{Ec. 2})$$

#### 4.10 Método de Microextracción en gota (SDME)

##### 4.10.1 Selección del solvente de extracción

Para seleccionar el solvente óptimo para la extracción, se realizaron extracciones de una solución acuosa de acrilamida y se comparó la eficiencia de extracción. Para ello, se tomaron 7  $\mu\text{L}$  de líquido iónico con una microjeringa de 25  $\mu\text{L}$  con tubo de PTFE en la punta. La extracción se realizó con 3 mL de una solución de acrilamida de 50 ppm, contenidos en un vial de 5 mL transparente y en baño de agua a 50  $^{\circ}\text{C}$ . La agitación se realizó con una barra magnética de 7 x 2 mm a una velocidad de 600 rpm. Durante la

extracción se cuidó que la aguja no tuviera contacto con la barra magnética. La gota de IL se expuso por 10 minutos y se recuperó retrayendo el émbolo. El IL recuperado se disolvió en metanol en una proporción 1:5 en un inserto cónico de 200  $\mu\text{L}$ . Esta mezcla se inyectó en el HPLC para determinar la acrilamida.

#### **4.10.2 Optimización de las condiciones de extracción**

Para establecer las condiciones óptimas de extracción se evaluaron los siguientes parámetros: velocidad de agitación, temperatura de extracción y tiempo de extracción. Se expuso una gota de 7  $\mu\text{L}$  a 3 mL de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm. Los experimentos iniciales se realizaron con un tiempo de extracción de 10 minutos, una velocidad de agitación de 600 rpm y una temperatura de 50 °C. Para la optimización, se mantuvieron dos variables constantes mientras la otra se variaba. La temperatura se evaluó entre 35 y 50 °C, la velocidad de agitación entre 300 y 600 rpm y el tiempo de exposición de 5 a 30 min. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

#### **4.10.3 Comparación de la eficiencia de extracción de TES NTfO<sub>2</sub> y MPPipe NTfO<sub>2</sub>**

Para comparar la eficiencia de extracción del TES NTfO<sub>2</sub> y MPPipe NTfO<sub>2</sub>, se realizó la extracción de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm.

Para el TES NTfO<sub>2</sub> la extracción se realizó con una velocidad de agitación de 500 rpm, durante 10 minutos a una temperatura de 50 °C. Mientras que para el MPPipe

NTfO<sub>2</sub> las condiciones fueron 600 rpm, por 20 minutos a 50 °C. Todos los ensayos se realizaron por quintuplicado.

La gota recuperada se diluyó en 5 volúmenes de metanol y se cuantificó el contenido de acrilamida con una curva de calibración. La eficiencia de extracción se calculó empleando la ecuación 3:

$$\text{Eficiencia de extracción} = \frac{\text{Concentración de acrilamida en el líquido iónico}}{\text{Concentración inicial de acrilamida en la solución}} \quad (\text{Ec. 3})$$

#### **4.10.4 Validación del método de SDME**

Para la validación del método desarrollado, se evaluaron la linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación de acuerdo a las recomendaciones de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para la Validación de Métodos Fisicoquímicos de la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2011) para el contenido de contaminantes en alimentos. Debido a dificultades atribuidas al efecto de la matriz, para la validación del método el tamaño de gota de IL expuesto fue de 4.5 µL en vez de 7 µL.

##### **4.10.4.1 Linealidad**

Para evaluar la linealidad del método, se construyó una curva de calibración extrayendo estándares acuosos de acrilamida a 5 niveles de concentración, entre 2 y 32

ppm, por triplicado. Utilizando el método de mínimos cuadrados se obtuvo la ecuación de la recta para el área en función de la concentración y se verificó la linealidad considerando el coeficiente de correlación (Secretaría de Salud, 2011).

#### 4.10.4.2 Exactitud y precisión

La exactitud del método desarrollado se evaluó determinando el porcentaje de recuperación de acrilamida adicionada a muestras de tortillas tostadas exentas de acrilamida. Las muestras adicionadas se prepararon de acuerdo al siguiente procedimiento: aproximadamente 200 g de tortillas tostadas se trituraron en un mortero de porcelana. Del polvo obtenido se pesaron 10 g y se adicionó estándar de acrilamida a dos niveles de concentración (10 y 40 ppm). Posteriormente, se adicionaron 50 mL de agua desionizada y la mezcla se sonicó en baño de ultrasonido por una hora. La suspensión obtenida fue centrifugada a 4000 rpm y 15 °C por una hora. El sobrenadante se separó y se centrifugó nuevamente por 5 minutos a 4000 rpm en filtro para centrifuga de 0.45 µm de tamaño de poro. Finalmente, el filtrado se pasó a través de filtros de disco de 0.22 µm de tamaño de poro. Se tomaron 3 mL del filtrado y se realizó la extracción con el método de SDME desarrollado.

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

4.

$$\text{Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración adicionada}} \times 100 \quad (\text{Ec. 4})$$

Para evaluar la precisión se calculó la %DER de los porcentajes de recuperación obtenidos.

#### **4.10.4.3 Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)**

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

#### **4.11 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.**

El método desarrollado se empleó en el análisis de acrilamida presente en muestras comerciales de tortillas tostadas. Se analizaron 8 muestras de 2 marcas y lotes diferentes. Las muestras se prepararon siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 4.10.4.2, pero en este caso no se adicionó acrilamida. La cuantificación se realizó con una curva de calibración construida mediante la extracción de estándares acuosos de acrilamida.

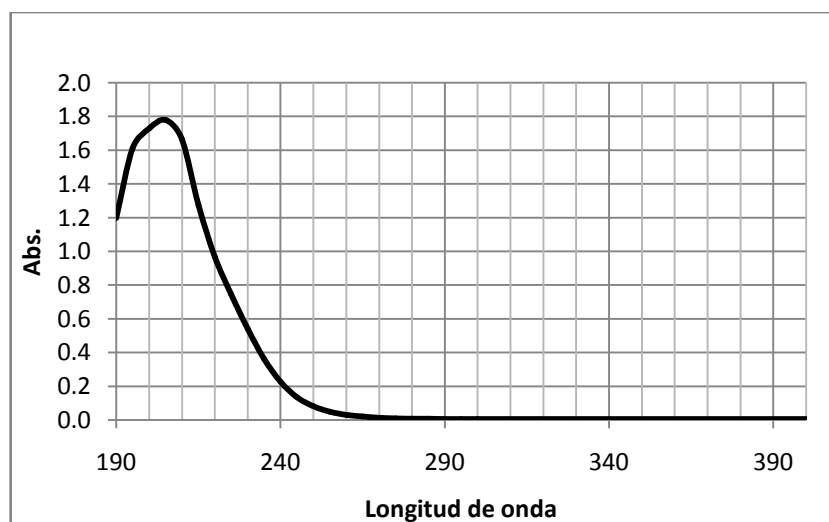


## CAPITULO V

### RESULTADOS

#### 5.1 Espectro UV – Visible.

El espectro UV de la acrilamida se muestra en la Figura 4.



**Figura 4** Espectro UV de la acrilamida.

## 5.2 Miscibilidad de los líquidos iónicos

Los resultados de la determinación de miscibilidad se presentan en la Tabla 6. Para los IL inmiscibles con agua se evaluó la miscibilidad con metanol, acetonitrilo y mezclas 90:10 y 50:50 de agua-metanol.

**Tabla 6.** Resultados de las pruebas de miscibilidad.

Líquido Iónico	Solvente				
	Agua	Agua: Metanol 50:50		Metanol	Acetonitrilo
		50:50	90:10		
EMIM NTfO <sub>2</sub>	No	Si	No	Si	Si
HMIM NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
MMPMIM NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
TES NTfO <sub>2</sub>	No	Si	Si	Si	Si
BPyr BF <sub>4</sub>	Si				
EMIM BF <sub>4</sub>	Si				
BMMIM BF <sub>4</sub>	Si				
DMIM BF <sub>4</sub>	No	Si	Si	Si	Si
BMIM PF <sub>6</sub>	No	No	No	Si	Si
OMIM PF <sub>6</sub>	No	No	No	Si	Si
HMIM TfO	No	Si	Si	Si	Si
BMIM TfO	Si				
EMIM DEFosf	Si				
EMIM AlCl <sub>4</sub>	Si				
DMIM Br	Si				
EMIM Ms	Si				
EA NO <sub>3</sub>	Si				
BTMA NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si
MTOA NTfO <sub>2</sub>	No	No	No	Si	Si

### 5.3 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción

Los resultados del volumen de gota y tiempo máximo de extracción se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7:** Resultados de volumen de gota y tiempo de exposición.

Líquido Iónico	Tamaño de gota ( $\mu\text{L}$ )			Tiempo máximo de extracción (min)**
	Aguja de punta roma*	Aguja con tubo de PTFE*	Aguja con tubo de PTFE**	
BMIM PF <sub>6</sub>	3.0	7.4	3.8	12.4
EMIM NTfO <sub>2</sub>	1.5	6.0	4.0	24.1
HMIM NTfO <sub>2</sub>	4.0	8.5	8.5	60.0
HMIM TfO	0.1	NP		
OMIM PF <sub>6</sub>	8.0		12.5	60.0
MMPMIM NTfO <sub>2</sub>	2.3	9.0	6.0	60.0
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	3.0	9.0	5.0	60.0
BTMA NTfO <sub>2</sub>	2.0	8.0	5.5	42.1
MTOA NTfO <sub>2</sub>	15.0		25.0	18.5
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	3.2	9.5	7.0	20.5
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	3.5	9.5	7.5	49.1
TES NTfO <sub>2</sub>	2.0	7.0	7.0	14.5
DMIM BF <sub>4</sub>	NP	NP		

\*300 rpm, 30°C, \*\*600 rpm, 50°C

## 5.4 Método cromatográfico

### 5.4.1 Optimización de las condiciones de separación

Se evaluó la separación de la acrilamida de los IL trabajando con diferentes mecanismos de separación: cromatografía de interacciones hidrofílicas (HILIC), fase inversa, par iónico, modo mixto fase inversa-intercambio catiónico.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 8. En el Apéndice A se presentan detalladamente los resultados obtenidos para cada columna.

**Tabla 8.** Resultados obtenidos para la separación de acrilamida de los IL empleando diferentes columnas cromatográficas.

Columna	Fase móvil	Líquidos Iónicos					
		HMIM NTfO <sub>2</sub>	OMIM PF <sub>6</sub>	MTOA NTfO <sub>2</sub>	MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	MPPiper NTfO <sub>2</sub>	TES NTfO <sub>2</sub>
<b>Interacciones hidrofílicas</b>							
HILIC	95% AcN : 5% Agua	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Discovery Cyano	99 % AcN : 1% ácido fórmico 0.1% pH 3.5	NO	NO	NO	NO	NO	NO
<b>Par Iónico</b>							
Atlantis dC18	99% TFA 50mM (B. de formiatos 100 mM pH 4): 1% MeOH	SI	NO	SI	SI	SI	SI
<b>Mixto: Fase inversa – intercambio catiónico</b>							
Obelisc R	80 % formiato de amonio 40 mM pH 4 : 20% AcN	NO	NO	NO	NO	NO	NO
	99% formiato de amonio 40 mM pH 5 : 1% AcN	SI	SI	SI	NO	NO	NO
<b>Fase Inversa</b>							
Discovery Cyano	99 % ácido fórmico 0.1% : 1% MeOH	NO	NO	NO	NO	NO	NO
Atlantis dC18	99% Agua: 1% MeOH	SI	SI	SI	SI	SI	SI

La única columna capaz de separar a la acrilamida de todos los IL fue la Atlantis dC18 y fue la empleada en el resto del trabajo. En la Tabla 9 se presentan las condiciones finales de análisis.

**Tabla 9.** Condiciones óptimas para la separación cromatográfica.

Columna	Fase Móvil	Temperatura (°C)	Detección UV (nm)	Flujo (mL/min)	Vol. inyección (µL)
Atlantis dC18	Agua : metanol (gradiente) min – % metanol 0 – 1 3.6 – 1 3.7 – 40 60 – 40 65 – 1 90 – 1	30	210	0.15	5

#### 5.4.2 Validación del sistema cromatográfico.

En la Tabla 10 se muestran los resultados obtenidos para la validación del sistema cromatográfico.

**Tabla 10.** Validación del sistema cromatográfico

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación (Secretaría de Salud 2011)
<ul style="list-style-type: none"> <li>Linealidad: Ecuación de la recta: Coeficiente de correlación (r):</li> </ul>	$y = 189.37x - 27.64$ 0.999	$\geq 0.99$
<ul style="list-style-type: none"> <li>Precisión % DER de los factores de respuesta</li> </ul>	3.22	< 20 %
<ul style="list-style-type: none"> <li>Límite de detección (ppm)</li> </ul>	0.66	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Límite de cuantificación (ppm)</li> </ul>	2.10	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Exactitud Pendiente de la curva de valor calculado vs. valor real Coeficiente de correlación (r):</li> </ul>	1 > 0.99	1 > 0.99

## 5.5 Solubilidad y coeficiente de partición

### 5.5.1 Solubilidad

La solubilidad de la acrilamida en los líquidos iónicos evaluados se muestra en la Tabla 11.

**Tabla 11:** Solubilidad de los líquidos iónicos.

Líquido Iónico	Solubilidad (g/mL)	% DER
HMIM NTfO <sub>2</sub>	0.11	10.78
OMIM PF <sub>6</sub>	0.15	11.22
MTOA NTfO <sub>2</sub>	0.02	2.69
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	0.11	8.15
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	0.13	8.06
TES NTfO <sub>2</sub>	0.13	10.57

n = 2

### 5.5.2 Coeficiente de partición

Los coeficientes de partición líquido iónico/agua de la acrilamida obtenidos se presentan en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Coeficientes de partición líquido iónico/agua de la acrilamida.

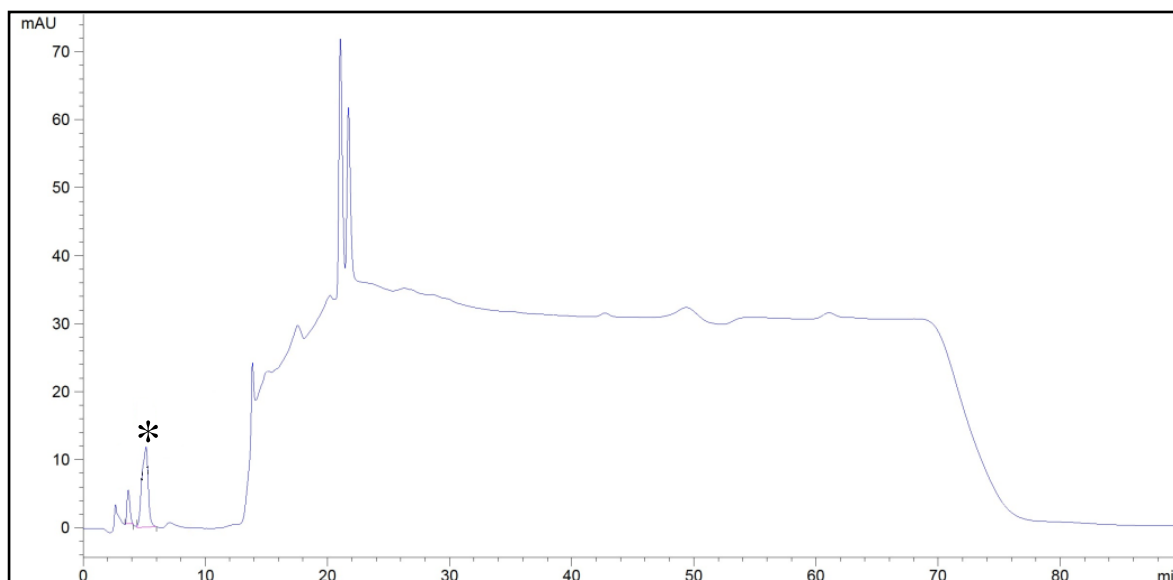
Líquido Iónico	Log p <sub>IL/Agua</sub>	%DER
HMIM NTfO <sub>2</sub>	-0.75	5.30
OMIM PF <sub>6</sub>	-0.74	6.21
MTOA NTfO <sub>2</sub>	-1.43	6.63
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	-0.79	9.22
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	-0.72	6.48
TES NTfO <sub>2</sub>	-0.64	0.22

n = 3

## 5.6 Método de Microextracción en gota (SDME)

### 5.6.1 Selección del solvente de extracción

Para evaluar la eficiencia de extracción de los líquidos iónicos OMIM PF<sub>6</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>, se compararon las áreas de los picos correspondientes a la acrilamida en los cromatogramas de las extracciones con los diferentes líquidos iónicos para ver cual presentaba la mejor señal. En la Figura 5 se muestra la señal analítica de la acrilamida cuando se usó el líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> como solvente para la SDME de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm.



**Figura 5.** Cromatograma del líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> usado como solvente de extracción de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm. (\*) Acrilamida.



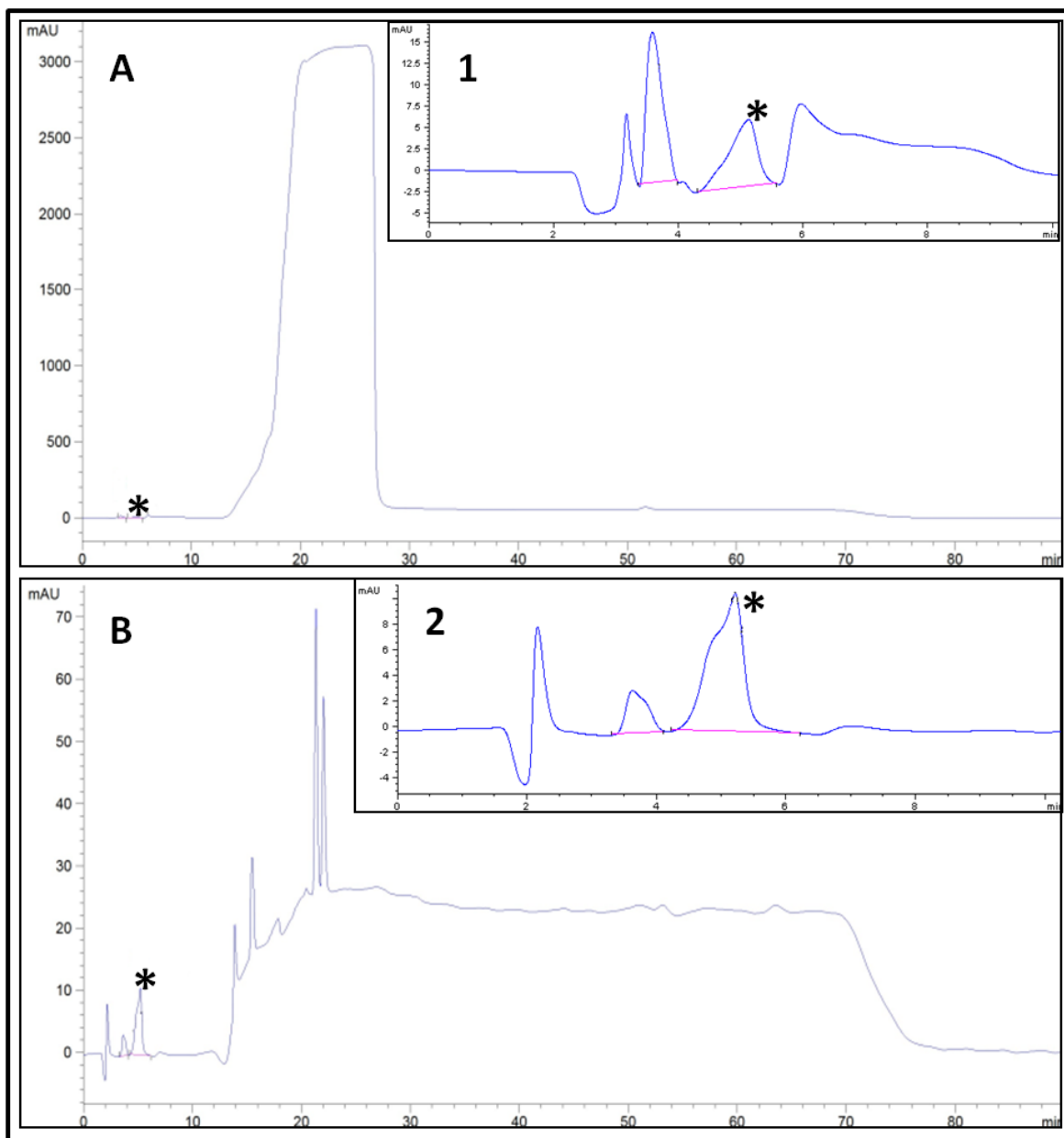
Los resultados de las pruebas para determinar el mejor solvente se muestran en la Tabla 13, en la cual se indica los líquidos iónicos que se usaron como solvente en la SDME, el área de la señal correspondiente a la acrilamida y la desviación estándar relativa.

**Tabla 13.** Respuesta analítica al aplicar la SDME a una solución de acrilamida con diferentes líquidos iónicos.

Líquido Iónico	Área	% DER
OMIM PF <sub>6</sub>	212.93	8.25
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	387.66	2.05
TES NTfO <sub>2</sub>	365.99	22.17

n = 2

De acuerdo a los resultados obtenidos se planteó un experimento para ayudar a seleccionar el líquido iónico con mayor posibilidad de tener una buena recuperación al usarse como solvente de extracción en una SDME para cuantificar acrilamida. El experimento consistió en analizar el área del pico de la señal de acrilamida al llevar a cabo la SDME cuando se utiliza el líquido iónico OMIM PF<sub>6</sub> con el mayor volumen que pueda suspenderse (12.5 µL) y compararlo con el área obtenida al llevar a cabo la extracción con el líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> exponiendo una gota de 7 µL. Las condiciones son las mismas que el experimento anterior: la fase donadora es 3 mL de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm, agitación a velocidad 600 rpm, temperatura de 50 °C y tiempo de exposición de 10 minutos. Los 2 cromatogramas de la Figura 6 corresponden a las SDME usando los líquidos iónicos OMIM PF<sub>6</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>.



**Figura 6.** Cromatogramas de la SDME usando líquidos iónicos como solventes. Cromatograma A: Usando OMIM PF<sub>6</sub> exponiendo una gota de 12.5  $\mu$ L. 1: ampliación de los primeros 10 minutos del cromatograma A. Cromatograma B: Usando TES NTfO<sub>2</sub> exponiendo una gota de 7  $\mu$ L. 2: ampliación de los primeros 10 minutos del cromatograma B. (\*) Indica el pico que corresponde a la acrilamida.

Las áreas de los picos correspondientes a la acrilamida de las SDME usando los líquidos iónicos OMIM PF<sub>6</sub> y TES NTfO<sub>2</sub> se muestran en la Tabla 14.

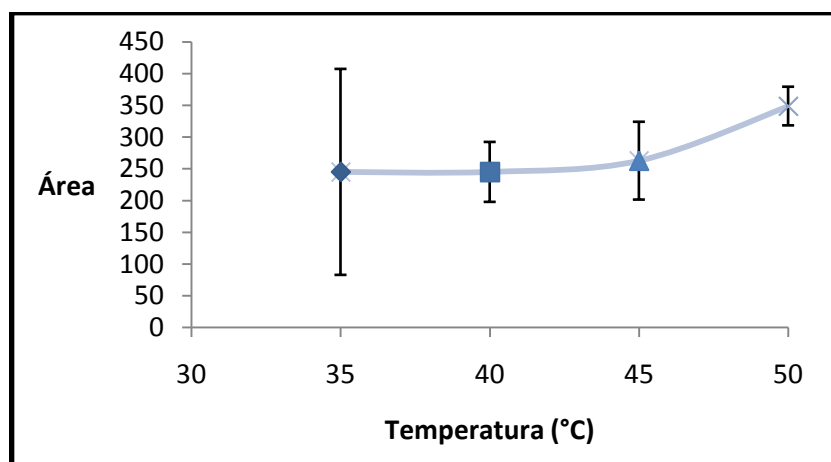
**Tabla 14.** Respuestas analíticas al realizar la SDME.

Líquido Iónico	Respuesta (área)	%DER
OMIM PF <sub>6</sub>	217.20	20.93
TES NTfO <sub>2</sub>	347.08	12.34

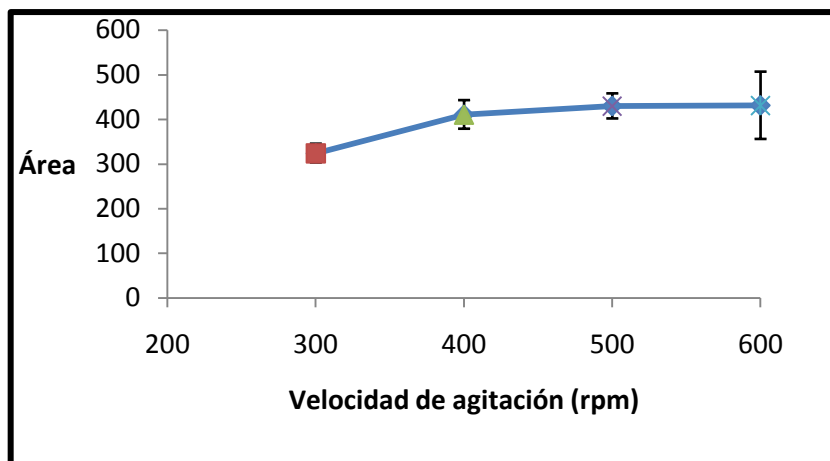
n = 2

### 5.6.2 Optimización de las condiciones de extracción

La Figura 7 muestra los resultados de la optimización de la temperatura para el TES NTfO<sub>2</sub>. La velocidad de agitación fue de 600 rpm y el tiempo de extracción de 10 minutos.

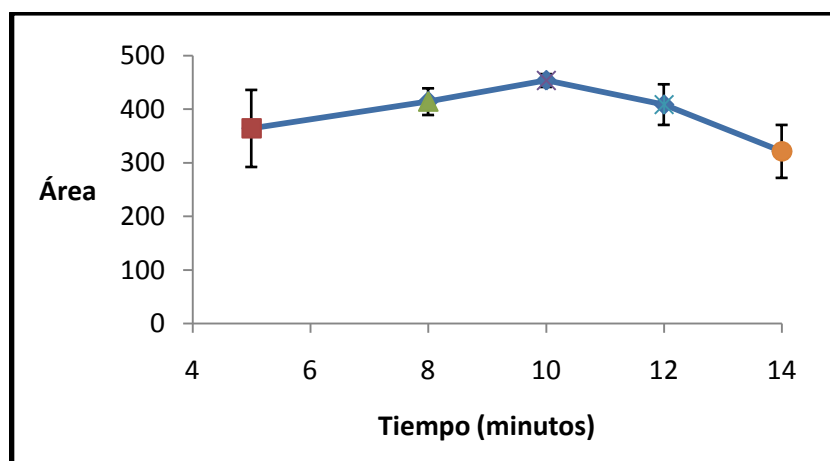
**Figura 7.** Optimización de la temperatura para el TES NTfO<sub>2</sub>.

La Figura 8 muestra los resultados de la optimización de la velocidad de agitación para el TES NTfO<sub>2</sub>. La temperatura fue de 50°C y el tiempo de extracción de 10 minutos.



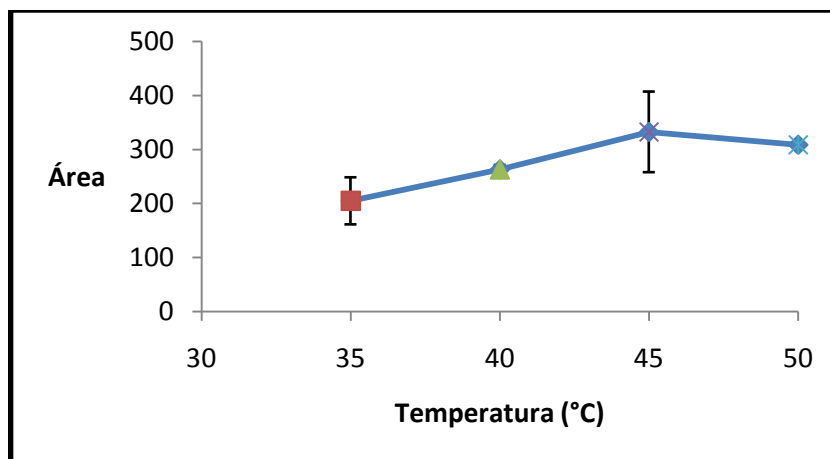
**Figura 8.** Optimización de la velocidad de agitación para el TES NTfO<sub>2</sub>.

La Figura 9 muestra los resultados de la optimización del tiempo de extracción para el TES NTfO<sub>2</sub>. La temperatura fue de 50°C y la velocidad de agitación de 500 rpm.



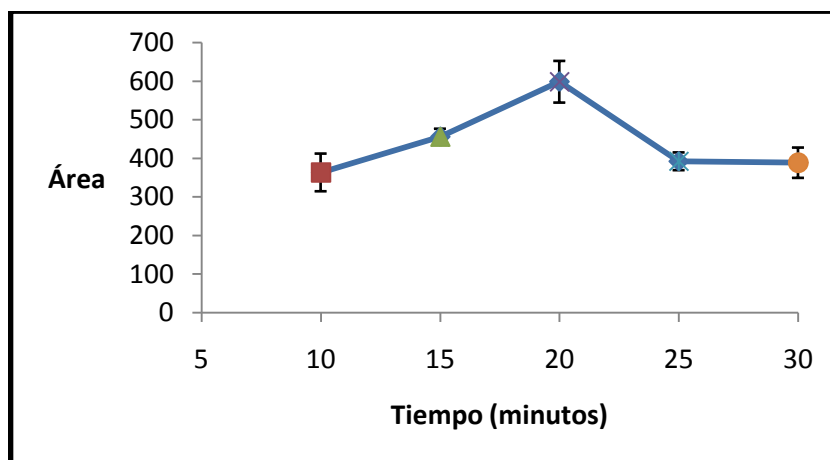
**Figura 9.** Optimización del tiempo de extracción para el TES NTfO<sub>2</sub>.

La Figura 10 muestra los resultados de la optimización de la temperatura para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>. La velocidad de agitación fue de 600 rpm y el tiempo de extracción de 10 minutos.



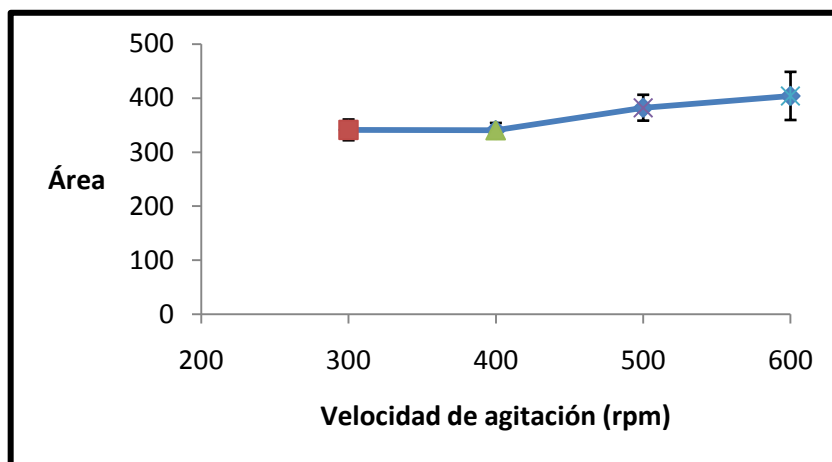
**Figura 10.** Optimización de la temperatura para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>.

La Figura 11 muestra los resultados de la optimización del tiempo de extracción para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>, La temperatura fue de 50°C y la velocidad de agitación de 600 rpm.



**Figura 11.** Optimización del tiempo de extracción para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>

La Figura 12 muestra los resultados de la optimización de la velocidad de agitación para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>. La temperatura fue de 50°C y el tiempo de extracción de 20 minutos.



**Figura 12:** Optimización de la velocidad de agitación para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>.

La tabla 15 resume las condiciones de extracción óptimas para cada IL.

**Tabla 15.** Condiciones óptimas de extracción.

Líquido iónico	Velocidad de agitación (rpm)	Temperatura (°C)	Tiempo de extracción (min)
TES NTfO <sub>2</sub>	500	50	10
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	600	50	20

### 5.6.3 Comparación de la eficiencia de extracción de TES NTfO<sub>2</sub> y MPPipe NTfO<sub>2</sub>

En la Tabla 16 se muestra los resultados de la eficiencia de extracción de los líquidos iónicos MPPipe NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla 16.** Eficiencia de extracción de los líquidos iónicos MPPipe NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>

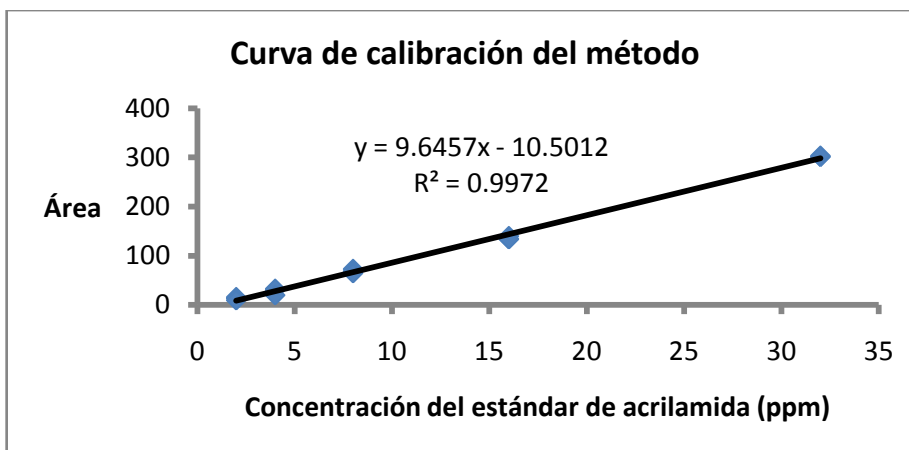
Líquido Iónico	Concentración (ppm)	Eficiencia de extracción	% DER
MPPipe NTfO <sub>2</sub>	1.68	0.20	4.50
TES NTfO <sub>2</sub>	2.07	0.25	7.03

n = 5

### 5.6.4 Validación del método de SDME

En la Figura 13 se muestra la curva de calibración del método de SDME.

En la Tabla 17 se muestran los resultados de los parámetros de validación.



**Figura 13.** Curva de calibración del método.

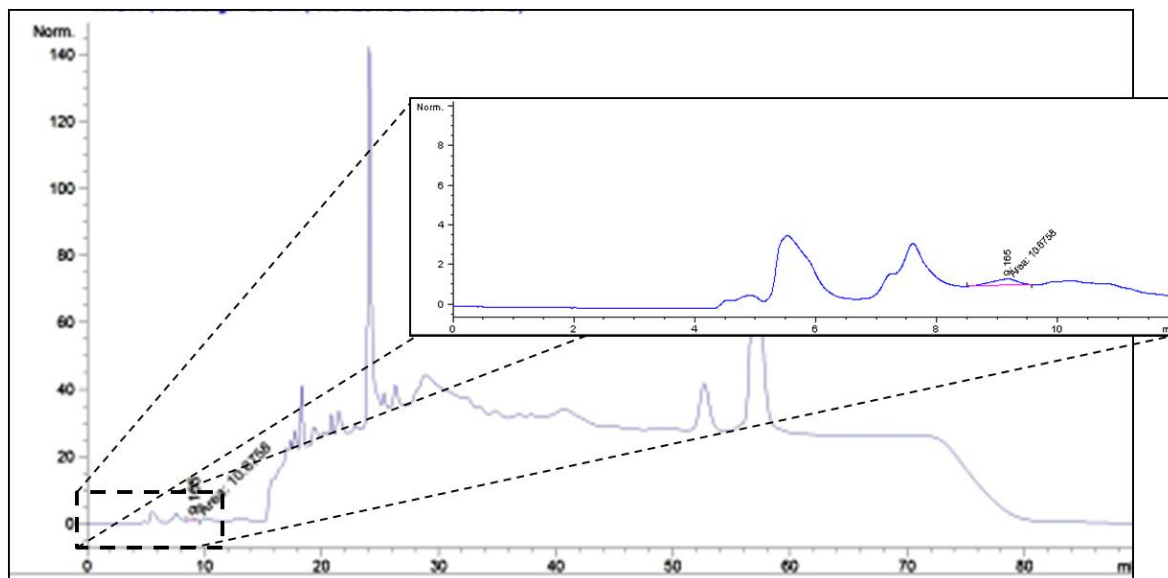
**Tabla 17:** Parámetros de validación de la SDME.

Parámetro	Resultado	Criterio de aceptación (Secretaría de Salud 2011) <sup>1</sup>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Linealidad: Ecuación de la recta: Coeficiente de correlación (r):</li> </ul>	$y = 9.64x - 10.50$ 0.998	≥0.99
<ul style="list-style-type: none"> <li>Límite de detección (ppm)</li> </ul>	10	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Límite de cuantificación (ppm)</li> </ul>	30	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Exactitud % Recuperación: Adición de 40 ppm Adición de 10 ppm</li> </ul>	85.24 109.77	70-120
<ul style="list-style-type: none"> <li>Precisión % DER</li> </ul>	21	< 20

En la Figura 14 se muestra un cromatograma de una muestra adicionada con 10 ppm del estándar de acrilamida y una ampliación de los primeros minutos en los que



aparece la señal de la acrilamida. En la muestra que se usó para el análisis de recuperación de acrilamida, previo a la adición no se detectó este analito.



**Figura 14.** Cromatograma de una muestra adicionada con 10 ppm de estándar de acrilamida.

### 5.7 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.

El método de SDME desarrollado se aplicó en muestras comerciales de tortillas tostadas de maíz. Se analizaron 8 muestras cuyo resultado se muestra en la Tabla 18.

**Tabla 18.** Resultado del análisis de acrilamida en tortillas tostadas comerciales.

Muestra	Concentración de acrilamida (ppm)
1	N/D
2	< LC
3	N/D
4	N/D
5	N/D
6	N/D
7	N/D
8	N/D

## **CAPÍTULO VI**

### **DISCUSIÓN**

En el desarrollo de este trabajo se evaluaron 22 IL. La selección de los mismos, se realizó en base a su punto de fusión y a su disponibilidad comercial.

#### **6.1 Espectro UV.**

El espectro de absorción UV de la acrilamida fue obtenido con el fin de determinar la longitud de onda de trabajo. Como puede verse en la figura 4, la absorción en este rango del espectro es limitada y el máximo de absorción se encuentra a 210 nm, longitud de onda que se empleó en todos los experimentos.

## 6.2 Miscibilidad de los líquidos iónicos

La técnica de SDME por inmersión requiere el uso de solventes extractantes inmiscibles con el agua. Por ello, fue necesario descartar aquellos que fueran miscibles con agua. Por otro lado, una vez realizada la microextracción es necesario miscibilizar la gota de solvente recuperada con la fase móvil para realizar el análisis por HPLC. Los solventes orgánicos que se evaluaron fueron metanol y acetonitrilo.

Como puede verse en la Tabla 6, de los 22 líquidos evaluados solo 13 fueron inmiscibles con el agua. A estos 13 IL se les evaluó la miscibilidad con metanol y acetonitrilo. La evaluación de la miscibilidad de los IL con mezclas de metanol:agua se realizó con el fin de tener opciones de solventes de muestra durante el desarrollo del método cromatográfico. La continuación de este trabajo se realizó con los 13 IL inmiscibles.

La literatura indica que un IL puede ser miscible en agua cuando hay una fuerte interacción entre el momento dipolar O-H del agua con los iones del IL para poder vencer las fuerzas electrostáticas que los mantienen unidos. Dos cualidades de los líquidos iónicos que determinan la fuerza de la interacción son la carga superficial y el volumen de los iones (Klähn *et al.*, 2010). La influencia del tamaño del ión con la miscibilidad en agua se explica porque la interacción electrostática entre un ión y una

molécula de agua es débil cuando la distancia entre el dipolo del agua y la carga del ion aumenta, siendo los iones voluminosos los menos solubles en agua. La influencia de la carga superficial se explica porque las cargas puntualmente localizadas en los iones de los IL permiten una interacción más fuerte con otras moléculas que las cargas distribuidas en diferentes puntos de una molécula (Freire *et al.*, 2007. La literatura también reporta que la influencia de los aniones en la miscibilidad en agua es más grande que la de los cationes (Jahangiria *et al.*, 2008)

Nuestros resultados indicaron que todos los IL con los aniones NTfO<sub>2</sub> y PF<sub>6</sub> fueron inmiscibles, por lo que no importó el catión para determinar la interacción con el agua. Sin embargo, en otros casos como en BMIM TfO y HMIM TfO solo el segundo fue inmiscible indicando que la longitud de la cadena alquil sustituyente del catión es importante también para definir la miscibilidad en agua. Otro ejemplo, se observa al comparar los 3 IL, EMIM BF<sub>4</sub>, DMIM BF<sub>4</sub> y DMIM Br. El IL inmiscible DMIM BF<sub>4</sub> indicó que una cadena alquil sustituyente de 10 carbonos hizo que el líquido iónico fuera inmiscible en comparación con EMIM BF<sub>4</sub>. Pero al comparar DMIM BF<sub>4</sub> y DMIM Br, el IL con un anión pequeño como el Br fue miscible. Esto indica la importancia de la combinación catión-anión en las propiedades del líquido iónico.

Los 13 líquidos iónicos inmiscibles en agua con los que se trabajó fueron miscibles en metanol y acetonitrilo. El grupo metilo del metanol le da la posibilidad, a diferencia del agua, además de su capacidad de formar puentes de hidrogeno e

interacciones polares por el grupo hidroxilo, de tener interacciones no polares de Van der Waals (Chokradjaroen *et al.*, 2011). En cuanto a la solvatación de los líquidos iónicos en acetonitrilo se ha demostrado que las moléculas de acetonitrilo se encuentran interactuando tanto con los dominios polares como con los no polares de los líquidos iónicos permitiendo su miscibilidad (García *et al.*, 2010). Tanto metanol como acetonitrilo interactúan fuertemente con el anión, el metanol por interacciones de puente de hidrógeno, el acetonitrilo con el grupo metilo orientado hacia el anión. De acuerdo a la interacción con el catión, el acetonitrilo actúa como aceptor de hidrógenos más fuerte que el metanol (Kirchner y Clare, 2009). Los líquidos iónicos pudieron ser miscibilizados en metanol y acetonitrilo, por lo que pueden ser usados como cosolventes para inyectarlos en el sistema cromatográfico.

En el caso de las especies de tetralquilamonio la carga positiva está situada alrededor del átomo de nitrógeno en los diferentes enlaces con los sustituyentes alquílicos originando una interacción más débil con el agua en comparación con el catión TES en el que la carga está localizada en el par de electrones no enlazados del átomo de azufre (Lohse *et al.*, 2008). El IL TES NTfO<sub>2</sub> fue miscible en una mezcla de metanol:agua 50:50 a diferencia de los IL de amonio que no fueron miscibles en mezclas metanol:agua, esto se debe a que la carga localizada en el átomo de azufre del catión TES promueva interacciones de mayor fuerza con el agua.

### 6.3 Volumen de gota y tiempo máximo de extracción

Con el fin de disminuir los tiempos de experimentación, una vez definidos los IL inmiscibles con agua, se decidió realizar una preselección, para ello se evaluó la capacidad de cada uno de ellos de formar la gota, así como el volumen y tiempo máximo de extracción. Con los IL seleccionados en esta etapa se procedió al desarrollo del método cromatográfico. Los criterios para la selección de los líquidos iónicos fueron el volumen de gota y el tiempo máximo de exposición.

Debido a que una amplia interfase facilita la difusión del analito desde la solución acuosa hacia la fase extractante, es necesario buscar la formación de gotas grandes (Gioti *et al.*, 2005). En la literatura se ha descrito que existe una relación entre la forma, la adherencia, la estabilidad de la gota y por lo tanto la eficiencia de extracción (Pakade y Tewary, 2010; Ye *et al.*, 2007). Las gotas obtenidas en este experimento fueron redondas tanto con la jeringa de punta roma como con la biselada. En la literatura hay reportes contradictorios acerca de la influencia de la forma de la punta de la aguja en la estabilidad de la gota. En nuestro caso, encontramos que la aguja con punta roma generó gotas con mayor tamaño y estabilidad por lo que fue la empleada para los experimentos subsiguientes.

De los 13 IL inmiscibles, solo 2, DMIM BF<sub>4</sub> y HMIM TfO, fueron incapaces de formar gota. En ambos casos se observó que a medida que se bajaba el émbolo de la

microjeringa se formaba una delgada hebra de líquido iónico en dirección a la barra magnética de agitación, mostrando que la inmiscibilidad no es el único parámetro que influye en la formación de la gota.

Como puede verse en la tabla 7, el volumen máximo de gota varió de 2  $\mu\text{L}$  para BTMA NTfO<sub>2</sub> a 15  $\mu\text{L}$  para MTOA NTfO<sub>2</sub>.

Además, se encontró que con el uso de un tubo de PTFE en la aguja para aumentar el área de contacto con la gota, el volumen máximo que puede suspenderse aumenta al doble o al triple (tabla 7). Por ello, el resto de los experimentos se realizaron con el tubo de PTFE.

Es importante mencionar que gotas grandes necesitan mayor tiempo para que se alcance el equilibrio termodinámico entre la velocidad de migración del analito desde la muestra hacia la gota (Li *et al.*, 2007). Para evitar el inconveniente de necesitar tiempos largos de extracción, se puede trabajar a mayores temperaturas y mayores velocidades de agitación para así acelerar el equilibrio del sistema. La agitación altera el grosor de la capa interfacial que rodea la gota del líquido iónico, esto facilita la transferencia del analito desde la muestra hacia el solvente (Manzoori *et al.*, 2009), sin embargo tiene el inconveniente de acelerar la disgregación del líquido iónico en la muestra y además aumenta la inestabilidad de la gota (Pena-Pereira *et al.*, 2009). Los resultados obtenidos



en la determinación del tiempo máximo de extracción se presentan en la tabla 7. El tiempo máximo de extracción encontrado para los diferentes IL varió de 12.4 hasta 60 min.

Considerando los resultados obtenidos en estas pruebas, se decidió continuar el estudio con los siguientes IL: HMIM NTfO<sub>2</sub>, OMIM PF<sub>6</sub>, MTOA NTfO<sub>2</sub>, MPpyrrol NTfO<sub>2</sub>, MPPiper NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>.

## **6.4 Método cromatográfico**

### **6.4.1 Optimización de las condiciones de separación**

El método cromatográfico se desarrolló con el objetivo de cuantificar acrilamida en mezclas que contuvieran además líquido iónico y matriz de la muestra. Para su desarrollo se consideró un método cromatográfico desarrollado previamente en el Departamento de Química Analítica, tabla 4 (Granados-Guzmán, 2008). Como se puede observar en la tabla 8 el empleo de este método permitió separar la acrilamida de los IL. Sin embargo, se decidió evaluar otras alternativas debido a que en estas condiciones la retención de la acrilamida es baja y esto puede generar problemas por interferencias de la matriz.

Como muestra la tabla 8, ninguna de las alternativas evaluadas permitió la separación de la acrilamida de todos los líquidos iónicos por lo que se decidió continuar el trabajo con el método inicial. Sin embargo, dado que los IL requerían un tiempo muy largo para eluir completamente, se decidió incluir una etapa de gradiente después de la elución de la acrilamida con el fin de disminuir el tiempo de análisis. En la tabla 9 se presentan las condiciones finales del método cromatográfico desarrollado.

Aunque los IL utilizados como solventes de extracción para la SDME no son compatibles con el alto contenido acuoso de la fase móvil del método desarrollado, la dilución de la gota recuperada con metanol permitió el análisis por HPLC.

#### **6.4.2 Validación del sistema cromatográfico**

El método cromatográfico desarrollado fue validado de acuerdo a los Criterios para Residuos y Contaminantes en Alimentos y Agua establecidos en la Guía de la Comisión de Control Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2011). Los resultados obtenidos se presentan en la tabla 10.

La linealidad del método se evaluó a partir de una curva de calibración construida con estándares metanólicos de acrilamida. El método fue lineal en un intervalo de concentraciones de 2 a 32 ppm ( $r > 0.99$ ). Para evaluar la precisión se

evaluó con los factores de respuesta de los estándares de calibración y la % DER obtenida fue de 3.2 %. El criterio de aceptación para la precisión es una %DER  $\leq$  20%, por lo que el método es preciso a estos niveles de concentración. La exactitud del método se evaluó calculando la concentración de los estándares utilizando la ecuación obtenida para la curva de calibración y se encontró una buena correlación entre la concentración teórica y la calculada ( $m = 1$ ,  $r > 0.99$ ). Los límites de detección y cuantificación calculados considerando una relación señal/ruido de 3 y de 10, respectivamente fueron de 0.66 y 2.1 ppm.

### **6.5 Solubilidad y Coeficiente de Partición**

Los estudios previos realizados en este trabajo permitieron hacer una preselección de IL con cualidades adecuadas para el análisis de acrilamida por SDME-HPLC, es decir, con buen comportamiento cromatográfico y capacidad para formar una gota adecuada. La determinación de la solubilidad y el coeficiente de partición IL/agua de la acrilamida en los diferentes IL, permitió realizar una selección más fina del solvente de extracción. Entre mayores sean la solubilidad y el coeficiente de partición del analito en el solvente de extracción mayor será la eficiencia en cualquier técnica de extracción en fase líquida y por lo tanto en la SDME (Shrivastava y Patel, 2010; Liu *et al.*, 2004).

Los resultados obtenidos se presentan en las tablas 11 y 12. Como puede observarse, los IL que tienen la mayor capacidad de solubilizar acrilamida son en orden decreciente: OMIM PF<sub>6</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub>, TES NTfO<sub>2</sub>, MPpyrrol NTfO<sub>2</sub>, HMIM NTfO<sub>2</sub> y MTOA NTfO<sub>2</sub>. Por otro lado, los IL que presentan la mayor capacidad de extracción de acrilamida a partir de una solución acuosa de acuerdo al coeficiente de partición IL/agua de la acrilamida son en orden decreciente: TES NTfO<sub>2</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub>, OMIM PF<sub>6</sub>, HMIM NTfO<sub>2</sub>, MPPyrrol NTfO<sub>2</sub> y MTOA NTfO<sub>2</sub>.

A partir de estos resultados, se decidió continuar el trabajo con los tres IL que dieron los mejores resultados en las dos pruebas: TES NTfO<sub>2</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub> y OMIM PF<sub>6</sub>.

Aunque para establecer relaciones confiables entre la estructura química de los IL y su afinidad por la acrilamida es necesario realizar estudios más amplios, es posible hacer algunas inferencias al respecto. Como se mencionó antes, los IL pueden tener diferentes tipos de interacciones con otras moléculas dependiendo de su estructura. Así por ejemplo, los hidrógenos del imidazolio en el IL OMIM PF<sub>6</sub> pueden tener interacciones tipo puente de hidrógeno con los átomos de nitrógeno o de oxígeno de la acrilamida, además los átomos de flúor del PF<sub>6</sub> pueden presentar interacciones del mismo tipo con los hidrógenos del grupo amida de la acrilamida. La acrilamida es una molécula polar, por lo que los IL que pueden solubilizarla tienen grupos funcionales que permiten interacciones polares. Entre los IL que se probaron, el anión PF<sub>6</sub> es el más

pequeño por lo que su carga está más disponible para la interacción con moléculas polares, esto explicaría por qué este IL tuvo mayor capacidad de solubilizar a la acrilamida que el anión NTfO<sub>2</sub>. Por el contrario, el IL MTOA NTfO<sub>2</sub> presenta un catión con sustituyentes alquílicos que promueven interacciones no polares, lo que puede explicar porque este líquido iónico tuvo menor capacidad de solubilizar acrilamida.

En la determinación del coeficiente de partición, el agua es un tercer componente que puede funcionar como cosolvente para facilitar la solubilidad de acrilamida en los IL. Según lo señalado en la sección de miscibilidad, el catión TES NTfO<sub>2</sub> es el que tiene la carga más localizada (Lohse *et al.*, 2008) entre los distintos cationes evaluados en esta prueba, lo que permite que las moléculas de agua formen nanoestructuras alrededor de esta carga y sean estas moléculas de agua asociadas al catión (Chiappe *et al.*, 2009; Luczak *et al.*, 2008) en donde reside la capacidad del líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> para extraer acrilamida, esto se hace evidente en el mayor valor del coeficiente de partición líquido iónico/agua de la acrilamida.

## **6.6 Método de microextracción en gota (SDME)**

### **6.6.1 Selección del solvente de extracción**

La selección de un solvente apropiado es de gran importancia para el método de extracción seleccionado, el solvente debe tener cualidades que lo hagan adecuado para la aplicación de la SDME y mostrar, además, selectividad por el analito (Shrivastava y Patel, 2010; Liu *et al.*, 2004).

Una vez que se definió cuales líquidos iónicos eran los más adecuados para usarlos como solvente de extracción de acrilamida en una SDME, se procedió a evaluar la eficiencia de extracción de los líquidos iónicos: OMIM PF<sub>6</sub>, MPPipe NTfO<sub>2</sub> y TES NTfO<sub>2</sub>.

Debido a que el máximo tamaño de gota fue diferente para los tres IL evaluados, la comparación de su eficiencia se llevó a cabo exponiendo una gota de 7.0 µL. Los experimentos se realizaron con 3 mL de una solución de acrilamida de 50 ppm, con velocidad de agitación de 600 rpm y a 50°C durante 10 minutos. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 13 y como puede observarse la mejor respuesta se obtuvo con el TES NTfO<sub>2</sub>, seguido por el MPPipe NTfO<sub>2</sub> y al final el OMIM PF<sub>6</sub>. Estos resultados concuerdan con los obtenidos para el coeficiente de partición de la acrilamida entre el IL y el agua.

Debido a que el OMIM PF<sub>6</sub> presenta un tamaño de gota superior (12.5 µL) al tamaño de gota establecido para la comparación (7 µL), se realizó la extracción de acrilamida empleando el máximo volumen del OMIM PF<sub>6</sub>. Sin embargo la respuesta siguió siendo menor que la del TES NTfO<sub>2</sub>. Aunado a la eficiencia de extracción, se tomaron en cuenta otros aspectos, como la forma del cromatograma (Figura 6), y de esta forma se descartó el OMIM PF<sub>6</sub>.

El TES NTfO<sub>2</sub> y el MPPipe NTfO<sub>2</sub> tuvieron respuestas analíticas muy similares por lo que se optó por optimizar las condiciones de extracción con ambos líquidos iónicos y finalmente comparar cual presenta una mayor eficiencia bajo condiciones óptimas.

### 6.6.2 Optimización de las condiciones de extracción

El propósito de la optimización de las condiciones experimentales de la SDME es obtener la mayor eficiencia de extracción. Las variables incluidas en la optimización fueron: tiempo de extracción, velocidad de agitación y temperatura, ya que son las que afectan mayormente la migración del analito desde la solución acuosa hacia la gota (Pena-Pereira *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2010, 2003; Gioti *et al.*, 2005; Bagheri *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2008; Vidal *et al.*, 2007)

Los resultados obtenidos durante la optimización del proceso de SDME para el TES NTfO<sub>2</sub> se muestran en las figuras 7 a 9. Durante la optimización se presentaron problemas con este líquido iónico, ya que se observó una pérdida importante del volumen de la gota y después de 10 minutos solo se recuperaban 2.5 µL. Para resolver este problema fue necesario disminuir la velocidad de agitación de 600 a 500 rpm. Por otro lado, se observó que al aumentar el tiempo de extracción disminuía el tamaño de gota lo que se vio reflejado en el área de la señal analítica. La temperatura tuvo poca influencia en el proceso de extracción. Las condiciones óptimas para el TES NTfO<sub>2</sub>

fueron: temperatura de extracción de 50 °C, velocidad de agitación de 500 rpm y tiempo de extracción de 10 minutos (tabla 15).

Las figuras 10 a 12 muestran los resultados obtenidos durante la optimización del método para el MPPipe NTfO<sub>2</sub>. Las condiciones óptimas para el MPPipe NTfO<sub>2</sub> fueron: temperatura de extracción de 50 °C, tiempo de extracción de 20 minutos y una velocidad de agitación de 600 rpm (tabla 15).

### **6.6.3 Comparación de la eficiencia de extracción de TES NTfO<sub>2</sub> y MPPipe NTfO<sub>2</sub>**

Una vez establecidas las condiciones óptimas de extracción para cada IL, se procedió a comparar su eficiencia de extracción. Para ello, se realizaron extracciones de una solución acuosa de acrilamida de 50 ppm. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 16. Como puede observarse, el TES NTfO<sub>2</sub> presentó el mejor desempeño como solvente de extracción para la SDME por tener la mayor eficiencia de extracción (25%), por lo que fue el solvente de extracción seleccionado.

### **6.6.4 Validación del método de SDME**

El método desarrollado fue validado considerando los Criterios para Residuos y Contaminantes en Alimentos y Agua establecidos en la Guía de la Comisión de Control



Analítico y Ampliación de Cobertura: Criterios para la Validación de Métodos Físicoquímicos de la Secretaría de Salud (Secretaría de Salud, 2011). Los parámetros evaluados fueron linealidad, precisión, exactitud y límites de detección y cuantificación, como se muestra en la tabla 17.

Los experimentos realizados para la optimización del método se llevaron a cabo con soluciones acuosas de acrilamida. Al realizar los ensayos con extracto acuosos de tortillas tostada se encontró un efecto importante de la matriz sobre la estabilidad de la gota, razón por el cual fue necesario disminuir el tamaño de gota de 7.0  $\mu\text{L}$  a 4.5  $\mu\text{L}$  para validar el método.

La evaluación de la linealidad del método se realizó a través de una curva de calibración de estándares acuosos de acrilamida, a niveles de concentración entre 2 y 32 ppm, sometidos al método completo de extracción. Se encontró una buena correlación entre el área y la concentración ( $r > 0.99$ ).

La exactitud y la precisión se evaluaron con muestras de tortilla tostada adicionadas con acrilamida. El porcentaje de recuperación obtenido fue 85.24 % y la %DER fue de 21 %, Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron de 10 y 30 ppm, respectivamente. Comparado con los resultados obtenidos previamente por Granados-Guzmán (2008), estos valores son altos y se requiere realizar ajustes al método para disminuirlos. Sin embargo, cabe señalar que el uso de líquidos iónicos y la

microextracción en gota disminuyen el tiempo de análisis así como el uso de solventes orgánicos. Esto último permite el cuidado del medio ambiente.

### **6.7 Aplicación del método desarrollado en muestras comerciales de tortillas tostadas.**

El método de la SDME desarrollado y validado se empleó en la determinación de acrilamida en tortillas tostadas comerciales. Como puede verse en la tabla 18, que presenta los resultados obtenidos, solo en una de las ocho muestras analizadas se detectó acrilamida a un nivel por debajo del límite de cuantificación.

## CAPÍTULO VII

### CONCLUSIONES

1. El líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub> tuvo el mejor desempeño en la extracción de acrilamida empleando la SDME.
2. Se desarrolló un método por SDME para la cuantificación de acrilamida en muestras de tortillas tostadas que aunque reduce el costo, tiempo y uso de solventes orgánicos, presentó alto límite de detección y límite de cuantificación.
3. El método desarrollado se aplicó a muestras de tortillas tostadas. De las muestras analizadas, en una se detectó acrilamida a un nivel por debajo del límite de cuantificación, lo que muestra la importancia de la realización de un estudio exhaustivo de los niveles de acrilamida en este tipo de muestras.

## **CAPÍTULO VIII**

### **PERSPECTIVAS**

1. Realizar ajustes al método para disminuir el límite de detección y el límite de cuantificación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Acero G. 2000. Tesis de Maestría. Uso del cerdo como modelo biológico para evaluar la calidad de la tortilla por dos procesos de nixtamalización y la fortificación con vitaminas y pasta de soya. Universidad de Colima, México,
- Amany M. M., Dalia M. M., Shaker A. M. 2009. Relationship between chemical composition and sensory evaluation of potato chips made from six potato varieties with emphasis on the duality of fried sunflower oil. *World Journal of Dairy & Food Sciences* 4: 193-200.
- American Standard Test Methods. 2009. Designation: D1722 – 09. Water Miscibility of Water-Soluble Solvents.
- Andrzejewski, D., Roach, J. A. G., Gay, M. L., Musser, S. M. 2004. Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LCMS/MS. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52: 1996–2002.
- Armenta S., Garrigues S., Guardia M. 2008. Green Analytical Chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*, 27: 497 – 511.
- Bagheri H., Ghambarian M., Salemi A., Es-Haghi A. 2009. Trace determination of free formaldehyde in DTP and DT vaccines and diphtheria–tetanus antigen by single drop microextraction and gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 50: 287–292.
- Bai H., Zhou Q., Xie G, Xiao J. 2009. Enrichment and sensitive determination of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites with temperature controlled ionic liquid dispersive liquid phase microextraction prior to high performance liquid phase chromatography. *Analytica Chimica Acta* 651: 64–68.
- Barutcu I., Sahin S., Sumnu G. 2009. Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *Food Science and Technology* 42: 17–22.
- Becalski A., Lau B. P. Y., Lewis D., Seaman S. W. 2003. Acrylamide in foods: Occurrence, sources, and modelling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 802–808.
- Berthod A., Ruiz-Ángel M. J., Carda-Broch S. 2008. Ionic liquids in separation techniques. *Journal of Chromatography A*. 1184: 6–18.
- B'Hymer C., Cheever K. L. 2007. Evaluation of extraction conditions and use of HPLC-MS for the simultaneous determination of acrylamide and its primary metabolite,

- N-Acetyl-S-(2-carbamoylethyl)cysteine, in human urine. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30: 1303 — 1316.
- Boroushaki M. T., Nikkhah E., Kazemi A., Oskooei M., Raters M. 2010. Determination of acrylamide level in popular iranian brands of potato and brands of potato and corn products. *Food and Chemical Toxicology*. 48: 2581 – 2584.
- Brandl F., Demiani S., Ewender J., Franz R., Gmeiner M., Gruber, L. 2002. A rapid and convenient procedure for the determination of acrylamide in foodstuffs. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 1: 137–144.
- Brown T. L., LeMay H. E. J., Bursten B. E., Burdge J. R. 2004. *Química. La ciencia central*. Novena Edición. Pearson Educación. México Capitulo 8.
- Casañas R., González, M., Rodríguez, E., Marrero, A., Diaz, C. 2002. Chemometric studies of chemical compounds in five cultivars of potatoes from Tenerife. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*. 50: 2076 – 2082.
- Castle L., Eriksson, S. 2005. Analytical methods used to measure acrylamide concentrations in foods. *Journal of AOAC international*. 88: 274 – 284.
- Chang Y. F., Liang H., Chen M, L., Tu C. S., Zhu Y.. 2008. Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction of aromatic amines in water samples. *Chinese Chemical Letters* 19: 985–987.
- Chiappe C., Malvaldi M., Pomelli C. S. 2009. Ionic liquids: Solvation ability and polarity. *Pure Applied Chemistry*. 81: 767–776.
- Chiappe C., Pieraccini D. 2005. Review Commentary. Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *Journal of Physical Organic Chemistry* 18: 275–297.
- Chokradjaroen Ch., Li X, Tamura K. 2011. Mutual solubility measurements and correlations of imidazolium-based ionic liquid mixtures with alcohols. *Journal of Chemical Thermodynamics*. 46: 72-79.
- Claus A., Carle R., Schieber A. 2008. Acrylamide in cereal products: A review. *Journal of Cereal Science*. 47: 118–133
- Cornejo-Villegas M. A., Linares-Mosqueda M.I., Ramírez- Romero G., Ambriz-García J. J., Gutiérrez-Cortez E. 2011. Análisis microbiológico de la cadena maíz-tortillas: procesamiento, distribución para mejorar su vida de anaquel. Escrito para la presentación del Simposium Internacional sobre Tecnologías Convencionales y Alternativas en el Procesamiento de Maíz. Chihuahua, Chihuahua. México.

- Crosthwaite J. M., Aki S. N., Maginn E., Brennecke J. F. 2004. Liquid phase behavior of imidazolium-based ionic liquids with alcohols. *Journal of Physical Chemistry B*, 108: 5113-5119.
- Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. 2009. One-step in-syringe ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6459-6465.
- Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. 2008. Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: Application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples. *Journal of Chromatography A*, 1202: 1-7.
- Cruz-Vera M., Lucena R., Cárdenas S., Valcárcel M. 2009. Determination of phenothiazine derivatives in human urine by using ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, 877: 37-42.
- Dunovska L., Cajka T., Hajslova J., Holadova K. 2006. Direct determination of acrylamide in food by gas chromatography-high-resolution time-of-flight mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 578: 234-240.
- El-Ziney M. G., Al-Turki A. A., Tawfik M. S. 2009. Acrylamide status in selected traditional saudi foods and infant milk and foods with estimation of daily exposure. *American Journal of Food Technology*. 4: 177 - 191.
- Fernandes J., Soares C. 2007. Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips. *Journal of Chromatography A*. 1175: 1 - 6.
- Flieger J. 2011. Application of ionic liquids in liquid chromatography, ionic liquids: applications and perspectives, Alexander Kokorin (Ed.), ISBN: 978-953-307-248-7. <http://www.intechopen.com/articles/show/title/application-of-ionic-liquids-in-liquid-chromatography>. Fecha de consulta; enero 8, 2012.
- Food and Drug Administration. 2009. Detection and quantitation of acrylamide in Foods. Ultima actualización 05/14/2009. <http://www.fda.gov/Food/FoodSafety/FoodContaminantsAdulteration/ChemicalContaminants/Acrylamide/ucm053537.htm>. Fecha de consulta enero 6 2012,
- Freire M. G., Santos L. Fernandes A.M. Coutinho J. A. P. Marrucho I. M. 2007. An overview of the mutual solubilities of water-imidazolium-based ionic liquids systems. *Fluid Phase Equilibria*. 261: 449-454.
- Friedman, M. 2005. Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 51: 4504 - 4526.

- García H. C., Oliveira L. F. C., Nicolau B. G. Ribeiro M.C.C. 2010. Raman spectra of acetonitrile in imidazolium ionic liquids. *Journal of Raman Spectroscopy*. 41: 1720–1724.
- García-López A., Alfaro-Macedo M. P. 2007. Acrilamida en alimentos para consumo humano. *Revista de Sanidad Militar Mexicana*; 61: 384 – 388.
- Genga Z., Jiang R., Chena M. 2008. Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 21: 178–182.
- Gioti D. C., Fiamegos Y. C., Stalikas C. D. 2005. Single-drop liquid-phase microextraction for the determination of hypericin, pseudohypericin and hyperforin in biological fluids by high performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1093: 1–10.
- Girma K. B. 2006. Coordination chemistry of acrylamide and n-pyrazolylpropanamide: syntheses and structures. *Universitat Magdeburg, Alemania*, 1 – 22.
- Girma K.B., Lorenz V., Blaurock S., Edelmann F. T. 2005. Coordination chemistry of acrylamide. *Coordination Chemistry Reviews*. 249: 1283–1293.
- Gökmen V., Senyuva H. Z., Acar J., Sarioglu, K. 2005. Determination of acrylamide in potato chips and crisps by highperformance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 1088: 193–199.
- Gökmen V., Senyuva H. Z. 2007. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry*. 103: 196–203.
- Granados-Guzmán, G. 2008. Desarrollo y evaluación de un método analítico para la determinación de acrilamida en tortillas tostadas de maíz. Tesis de Maestría. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Nuevo León. Julio 2008.
- Hamlet C. G., Jayaratne S. M., Sadd P. A. 2004. Rapid, sensitive and selective analysis of acrylamide in cereal products using bromination and GC/MS/MS. *Czech Journal of Food Sciences*, 22: 290–293.
- Hasegawa K., Miwa S., Tajima T., Tsutsumiuchi K., Taniguchi H., Miwa J. A 2007. Rapid and inexpensive method to screen for common foods that reduce the action of acrylamide a harmful substance in food. *Toxicology Letters*. 175: 82 – 88.
- He L., Luo X., Jiang X., Qu L. 2010. A new 1,3-dibutylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction to determine organophosphorus pesticides in water and fruit samples by high-



- performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1217: 5013–5020.
- He L., Luo X., Xie H., Wang C., Jiang X., Lu K. 2009. Ionic liquid-based dispersive liquid–liquid microextraction followed high-performance liquid chromatography for the determination of organophosphorus pesticides in water simple. *Analytica Chimica Acta*. 655: 52–59.
- Kaplan O., Kaya G., Ozcan C., Ince M., Yaman M. 2009. Acrylamide concentrations in grilled foodstuffs of Turkish kitchen by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal*. 93: 173–179.
- Keramat J., LeBail A., Prost C., Soltanizadeh N. 2011. Acrylamide in foods: chemistry and analysis. A review. *Food Bioprocess Technology*. 4: 340–363.
- Kim C. T., Hwang E. S., Lee, H. J. 2007. An improved LC-MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. *Food Chemistry*. 101: 401–409.
- Kirchner B., Clare B. 2009. Topics in current chemistry. *Ionic Liquids*. Springer Heidelberg Dordrecht. Pagina 48.
- Klähn M., Stüber C., Seduraman A., Wu P. 2010. What determines the miscibility of ionic liquids with water? identification of the underlying factors to enable a straightforward prediction. *Journal of Physical Chemistry. B*, 114: 2856–2868.
- Küttinga, B., Schettgen, T., Schweglerc, U., Frommec, H., Uterd, W., Angerera, J., Drexlera, H. 2009. Acrylamide as environmental noxious agent a health risk assessment for the general population based on the internal acrylamide burden. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*. 212: 470–480.
- Lee, M. R., Chang, L. Y., Dou, J. 2007. Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography–positive chemical ionization tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 582: 19–23.
- Li Y., Guohui W., Wang X. 2007. Short Communication. Determination of decabromodiphenyl ether in water samples by single-drop microextraction and RP-HPLC. *Journal of Separation Science*. 30: 2698 – 2702.
- Lin C. K., Chen S. Y., Lien M. H. 1995. Site of protonation and proton affinity of acrylamide, a theoretical study. *Journal of Physical Chemistry*. 99: 1454 – 1461.
- Liu J., Jiang G., Chi Y., Cai Y., Zhou Q., Hu J. 2003. Use of ionic liquids for liquid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Analytical Chemistry*. 75: 5870-587.

- Liu J., Chi Y., Jiang G., Tai C., Peng J., Hu J. 2004. Ionic liquid-based liquid-phase microextraction, a new sample enrichment procedure for liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1026 : 143–147.
- Liu J., Peng J., Chi Y., Jiang G. 2005. Determination of formaldehyde in shiitake mushroom by ionic liquid-based liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography. *Talanta* 65: 705–709.
- Liu J., Zhao G., Yuan Y., Chen F., Hu X. 2008. Quantitative analysis of acrylamide in tea by liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 108: 760–767.
- Liu Q., Liu Y., Chen S., Liu Q., 2010. Short Communication. Ionic liquid for single-drop microextraction followed by high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection to determine carbonyl compounds in environmental waters. *Journal of Separation Science*. 33: 2376–2382.
- Lohse P, W., Bürsing, R. Lenzer, T., Oum.K. 2008. Exploring 12'-apo-beta-carotenoic-12'-acid as an ultrafast polarity probe for ionic liquids. *Journal of physical chemistry B*, 112: 3048-3057.
- Luczak J., Hupka J., Thöming J., Jungnickel C. 2008. Self-organization of imidazolium ionic liquids in aqueous solution. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical Engineering Aspects* 329: 125–133.
- Manson J., Brabec M. J., Buelke-Sam J., Carlson G.P., Chapin R. E., Favor J. B., Fischer L. J., Hattis D., Lees P. S. I., Perreault-Darney S., Rutledge J., Smith T. J., Tice R. R., Working, P. 2005. NTP-CERHR Expert panel report on the reproductive and developmental toxicity of acrylamide. *Birth Defects Research, Part B*. 74: 17–113.
- Manzoori J. L., Amjadi M., Abulhassani J. 2009. Ionic liquid-based single drop microextraction combined with electrothermal atomic absorption spectrometry for the determination of manganese in water samples. *Talanta* 77: 1539–1544.
- Marin J. L., Pozo, O. J., Sancho, J. V., Pitarch, E., Lopez, F. J., Hernandez, F. 2006. Study of different atmospheric-pressure interfaces for LC-MS/MS determination of acrylamide in water at sub-ppb levels. *Journal of Mass Spectrometry*. 41: 1041 – 1048.
- Markowska A., Stepnowski P. 2008. Simultaneous determination of ionic liquid cations and anions using ion chromatography with tandem ion exchange columns: a preliminary assessment. *Analytical Sciences*. 24: 1359 -1361.

- Mestdagh F., De Meulenaer B., Poucke C. V., Detavernier C., Cromphout C., Peteghem, C. V. 2005. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in french fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6170 – 6174.
- Mestdagh F., De Meulenaer B., Van Peteghem C., Cromphout C., Thas O. 2004. Towards a better understanding in acrylamide formation, degradation and reduction in model systems (and foodstuffs). *Czech Journal of Food Sciences*, 22: 11–14.
- Miller J. N., Miller J. C. 2002. *Estadística y quimiometría para química analítica*. Ed. Pearson Prentice Hall, España.
- Mrozik W., Nichthauser J., Stepnowski P. 2008. Prediction of the adsorption coefficients for imidazolium ionic liquids in soils using cyanopropyl stationary phase. *Polish Journal of Environmental Studies*, 17: 383-388.
- Nageshwar D. K., Kumar A. 2010. Contrasting thermosolvatochromic trends in pyridinium-, pyrrolidinium-, and phosphonium-based ionic liquids. *Journal of Physical Chemistry B*, 114: 376–381.
- Niaz A., Sirajuddin-Shah, A., Bhangar M. I., Saeed M., Jamali M. K., Arain M. B. 2008. A new simple sensitive differential pulse polarographic method for the determination of acrylamide in aqueous solution. *Talanta*, 78: 1608 – 1614.
- OECD. 1995. Guideline for the testing of chemicals. Water Solubility.
- OECD. 1995. Guideline for the testing of chemicals. Partition coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method.
- Ono H., Chuda Y., Ohnishi-Kameyama M., Yada H., Ishizaka M., Kobayashi H. 2003. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, 20: 215–220.
- Padwa A. Brodney M. A. 2002. Intramolecular cyclizations of N-acyliminium ions with pyridine rings. *ARKIVOC* 6: 35-48.
- Pakade Y. B., Tewary. D, K. 2010. Development and applications of single-drop microextraction for pesticide residue analysis: A review. *Journal of Separation Science*. 33: 1–9.
- Pena M.T., Casais M.C., Mejuto M.C., Cela R. 2009. Development of an ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction method for the analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1216: 6356–6364.

- Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C. 2010. Liquid-phase microextraction techniques within the framework of green chemistry. *Trends in Analytical Chemistry*. 29: 617 – 628.
- Pena-Pereira F., Lavilla I., Bendicho C., Vidal L., Canals A. 2009. Speciation of mercury by ionic liquid-based single-drop microextraction combined with high-performance liquid chromatography-photodiode array detection. *Talanta* 78: 537–541.
- Peng J, Liu J, Jiang G, Tai C., Huang M. 2005. Ionic liquid for high temperature headspace liquid-phase microextraction of chlorinated anilines in environmental water samples. *Journal of Chromatography A*, 1072: 3–6.
- Pittet A., Périsset A., Oberson J. M. 2004. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035: 123–130.
- Ravelo-Pérez L. M., Hernández-Borges J., Asensio-Ramos M., Rodríguez-Delgado M. A., 2009. Ionic liquid based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of pesticides from bananas. *Journal of Chromatography A*, 1216: 7336–7345.
- Riediker S., Stadler R. H. 2003. Analysis of acrylamide in food by isotope-dilution liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1020: 121–130.
- Roach J. A. G., Andrzejewski D., Gay M. L., Nortrup D., Musser S. M. 2003. Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 51: 7547–7554.
- Rosén J., Hellenäs K. E. 2002. Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *The Analyst*, 17: 880–882.
- Sánchez F. C., Salinas M. Y., Vázquez C. M. G., Velázquez C. G. A., Aguilar G. N. 2007. Efecto de las prolaminas del grano de maíz (*Zea mays* L.) sobre la textura de la tortilla. *Archivos latinoamericanos de nutrición. Órgano oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición*. 57: 295 – 301.
- Sarafraz-Yazdi A., Mofazzeli F. 2010. Ionic Liquid-Based Submerged Single Drop Microextraction: a New Method for the Determination of Aromatic Amines in Environmental Water Samples *Chromatographia*, 72: 867 – 873.

- Secretaria de Salud. 2011. Comisión de control analítico y ampliación de cobertura criterios para la validación de métodos fisicoquímicos de la secretaria de salud. CLAVE: CCAYAC-P-058. FECHA: 2011-02-16.
- Serpen A., Gokmen V. 2007. Modelling of acrylamide formation and browning ratio in potato chips by artificial neural network. *Molecular Nutrition & Food Research*, 51: 383–389.
- Shrivastava K., Patel, D. K. 2010. Liquid-phase microextraction combined with gas chromatography mass spectrometry for rapid determination of nicotine in one-drop of ightshades vegetables and commercial food products. *Food Chemistry* 122: 314–318.
- SIELC Technologies 2012. HPLC Application of HPLC Analysis of components of ionic liquids by mixed-mode chromatography. <http://www.sielc.com/Application-HPLC-Analysis-of-Components-of-Ionic-Liquids-By-Mixed-Mode-Chromatography.html>. Fecha de consulta: enero 3, 2012.
- Stepnowski P., Nischthäuser J., Mroziński W., Buszewski B. 2006. Usefulness of  $\pi$ - $\pi$  aromatic interactions in the selective separation and analysis of imidazolium and pyridinium ionic liquid cations. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 385: 1483–1491.
- Sun P., Armstrong D. W. 2010. Ionic liquids in analytical chemistry. *Analytica Chimica Acta* 661: 1–16.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M. 2000. Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*. 13: 517–522.
- Tareke E., Rydberg P., Karlsson P., Eriksson S., Törnqvist M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 50: 4998–5006.
- Tobiszewski M, Mechlinska A, Zygmunt B, Namiesnik J. 2009. Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *Trends in Analytical Chemistry*. 28: 943–951.
- Vidal L., Chisvert A., Canals A., Salvador A. 2010. Ionic liquid-based single-drop microextraction followed by liquid chromatography-ultraviolet spectrophotometry detection to determine typical UV filters in surface water samples. *Talanta* 81: 549–555.

- Vidal L., Chisvert A., Canals A., Salvador A. 2007. Sensitive determination of free benzophenone-3 in human Urine samples based on an ionic liquid as extractant phase in single-drop microextraction prior to liquid chromatography analysis. *Journal of Chromatography A*, 1174: 95–103.
- Vidal L., Psillakis E., Domini C.E., Grané N., Marken F., Canals A. 2007. An ionic liquid as a solvent for headspace single drop microextraction of chlorobenzenes from water samples *Analytica Chimica Acta* 584: 189–195.
- Wang H., Lee A. W. M., Shuang S., Choi M. M. F. 2008. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchemical Journal* 89: 90–97.
- Wang X., Porco J. A. 2001. Modification of c-terminal peptides to form peptide enamides: synthesis of chondriamidas A y C. *Journal of Organic Chemistry*. 66: 8215 – 8221.
- Weingartner H., Sasisanker P., Daguene C., Dyson P.J. Krossing. M. Schubert. T. 2007. The dielectric response of room-temperature ionic liquids: effect of cation variation. *Journal of Physical Chemistry B*, 111: 4775-4780.
- Wenzi T., Lachenmeier D. W., Gükmen V. 2007. Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 389: 119 – 137.
- Xu H., Pan W., Song D., Yang G. 2007. Development of an improved liquid phase microextraction technique and its application in the analysis of flumetsulam and its analogous herbicides in soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55:9351–9356.
- Yao C., Pitner W. R., Anderson J. L. 2009. Ionic liquids containing the tris(pentafluoroethyl)trifluorophosphate anion: a new class of highly selective and ultra hydrophobic solvents for the extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons using single drop microextraction. *Analytical Chemistry*. 81: 5054–5063.
- Ye C., Zhou Q., Wang X. 2006. Headspace liquid-phase microextraction using ionic liquid as extractant for the preconcentration of dichlorodiphenyltrichloroethane and its metabolites at trace levels in water samples. *Analytica Chimica Acta* 572:165–171.
- Ye, C., Zhou, Q., Wang X. 2007. Improved single-drop microextraction for high sensitive analysis. *Journal of Chromatography A*, 1139: 7–13.

- Yuan Y., Chen F., Zhao G. H., Liu J., Zhang H. X., Hu S. S. 2007. A comparative study of acrylamide formation induced by microwave and conventional heating methods. *Journal of Food Science*. 72: 212 – 216.
- Zhang H., Shi Y. 2010. Temperature-assisted ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction combined with high performance liquid chromatography for the determination of anthraquinones in Radix et Rhizoma Rhei samples. *Talanta*, 82: 1010 - 1016.
- Zhou Q., Bai H., Xie G, Xiao J. 2008. Trace determination of organophosphorus pesticides in environmental samples by temperature-controlled ionic liquid dispersive liquid-phase microextraction. *Journal of Chromatography A*, 1188: 148–153.
- Zhu F., Cai Y. S., Ke J., Corke H. 2009. Evaluation of the effect of plant extracts and phenolic compounds on reduction of acrylamide in an asparagine/glucose model system by RP-HPLC-DAD. *Journal of the Science of Food and Agriculture* . 89: 1674–1681.

## APÉNDICE

### **Resultados del desarrollo del método cromatográfico**

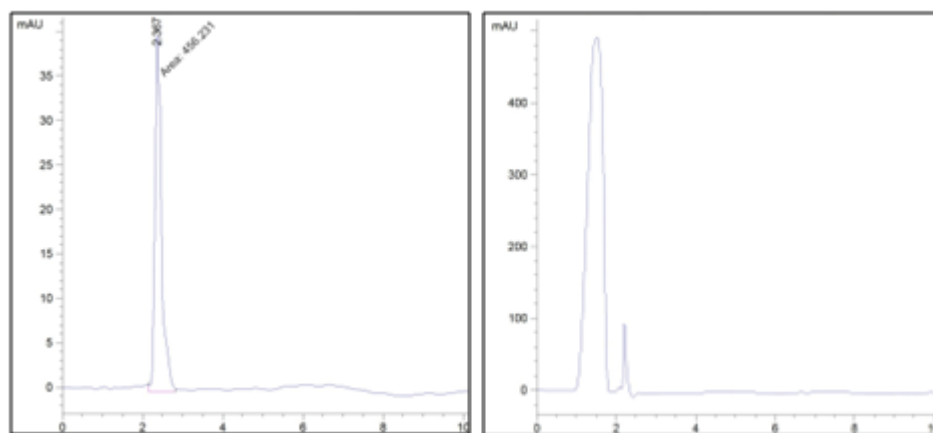
Los resultados del desarrollo del método cromatográfico se ordenaron de acuerdo al mecanismo de separación por el que se trató de separar la señal de la acrilamida de la de los líquidos iónicos. Se usaron los mecanismos de separación cromatografía de interacciones hidrofílicas, fase inversa, par iónico, modo mixto fase inversa-cromatografía iónica.



## A.1 Interacciones hidrofílicas

Para este mecanismo de separación se utilizaron las columnas Discovey Cyano y Atlantis HILIC con diferentes fases móviles.

Usando la columna Discovery Cyano con una fase móvil acetonitrilo: ácido fórmico 0.1% a pH 3.5 en proporciones 99:1 a un flujo de 1 ml/min con una temperatura de columna de 40°C e inyectando 5  $\mu$ L de una solución acuosa de acrilamida de 20 ppm y de líquidos iónicos disueltos en metanol en una relación 1:10 se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la Figura A.1. Los resultados se resumen en la Tabla A.1.

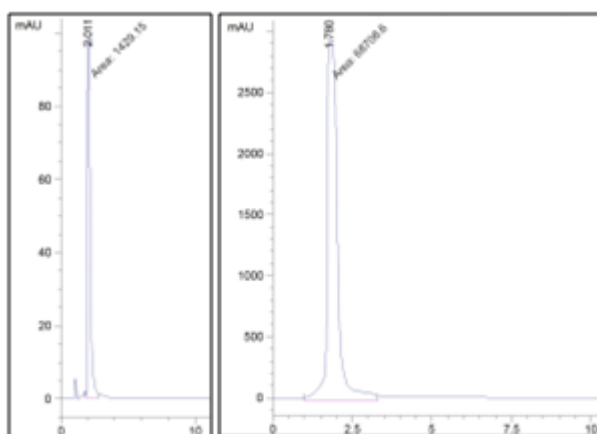


**Figura A.1.** Izquierda Señal de la acrilamida, derecha: señal del líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla A.119.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Discovery Cyano con Fase Movil 99 % AcN : 1% ácido fórmico 0.1% pH 3.5 con flujo 1.0 mL/min y temperatura de 40°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	0.95 - 1.98.; 2.21 - 2.55.
EMIM NTfO <sub>2</sub>	0.94 - 1.99.; 2.11 - 2.43.
HMIM NTfO <sub>2</sub>	0.91 - 1.82.; 2.14 - 2.49.
HMIM TfO	1.04 - 2.42
OMIM PF <sub>6</sub>	1.01 - 2.54
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	1.09 - 1.93 ; 2.11 - 2.48.
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	1.02 - 1.96 ; 2.17- 2.43.
BTMA NTfO <sub>2</sub>	0.90 - 1.81 ; 2.18 - 2.42.
MTOA NTfO <sub>2</sub>	1.03 - 1.89 ; 2.01 - 2.44.
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	0.95 - 1.81 ; 2.19 -2.45.
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	1.03 - 1.96 ; 2.14 - 2.49.
TES NTfO <sub>2</sub>	1.01 - 1.91 ; 2.14 - 2.46.
DMIM BF <sub>4</sub>	1.01 - 2.45.
BCO. AGUA	2.02 - 2.46
BCO. METANOL	2.10 - 2.49
ACRILAMIDA	2.22 - 2.98

Usando la columna Atlantis HILIC Sillica con una fase móvil de acetonitrilo : agua 95:5 a flujo de 0.2 mL/min con temperatura de 40 °C e inyectando 5 µL de una solución de acrilamida en acetonitrilo a 20 ppm y una solución de líquido iónico en metanol 1:10 se obtuvieron los cromatogramas que se muestran en la Figura A.2. Los resultados se resumen en la Tabla A.2.



**Figura A.215.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha: señal del líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>.

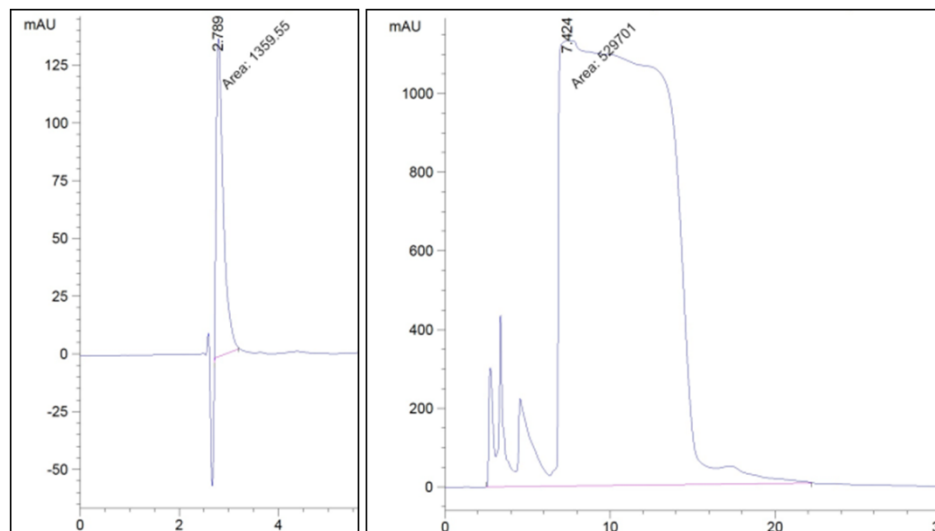
**Tabla A.2.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Atlantis HILIC con Fase Movil 95 % AcN : 5% agua con flujo 0.2 mL/min y temperatura de 40°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	1.59 - 3.84 ; 5.10 - 5.98
EMIM NTfO <sub>2</sub>	1.03 - 3.43
HMIM NTfO <sub>2</sub>	0.99 - 3.29
HMIM TfO	0.99 - 4.36
OMIM PF <sub>6</sub>	0.96 - 3.21
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	0.96 - 3.47
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	0.96 - 4.02
BTMA NTfO <sub>2</sub>	0.99 - 2.44
MTOA NTfO <sub>2</sub>	0.96 . 2.88
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	1.36 - 2.55
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	1.62 - 2.47
TES NTfO <sub>2</sub>	1.59 - 2.47 ; 3.06 - 3.80
DMIM BF <sub>4</sub>	1.55 - 3.54
BCO ACETONITRILO	0.70 - 2.83
BCO. METANOL	1.51 - 2.50
ACRILAMIDA	1.79 - 2.84

## A.2 Modo mixto: Fase inversa – intercambio catiónico

Para esta modalidad de separación se utilizó la columna Sielc Obelisc R. Se probaron 2 diferentes condiciones cromatográficas.

Las primeras pruebas se hicieron con una fase móvil que contiene acetonitrilo y formiato de amonio 40 mM a un pH de 4 con una proporción de 80 % del solvente acuoso, con un flujo de 0.2 mL/min, una temperatura de 30°C y detección a 210 nm. Se inyectaron 5  $\mu$ L de una solución de acrilamida en acetonitrilo de 20 ppm y una mezcla de 20  $\mu$ L de líquido iónico en 80  $\mu$ L de acetonitrilo. En la Figura A.3 se muestra un cromatograma correspondiente a la acrilamida y al líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>. El resumen de los tiempos en que aparecen las señales de los líquidos iónicos, acrilamida, así como los blancos se muestra en la Tabla A.3.

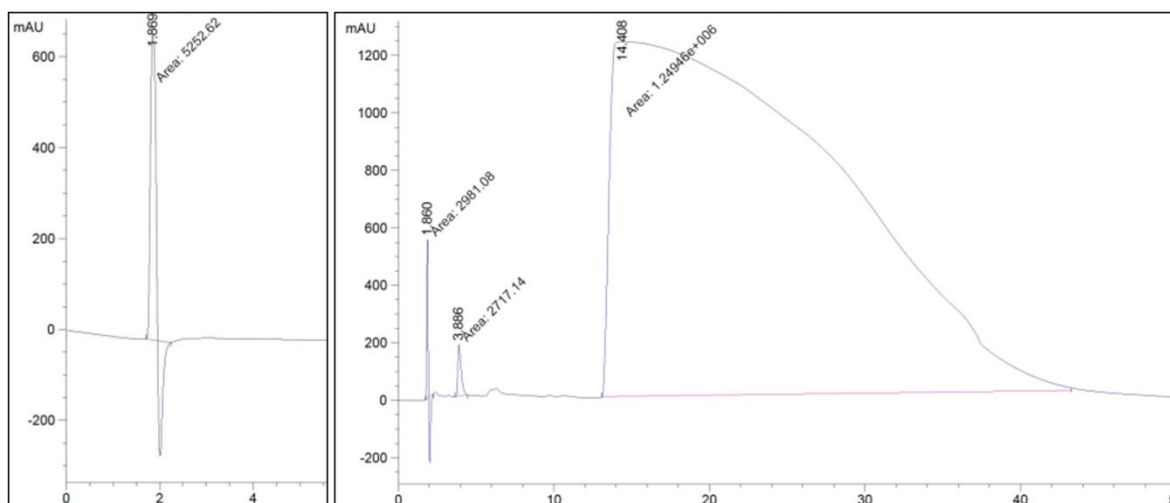


**Figura A.3.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha: señal del líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla A.3.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Obelisc R con Fase Movil 20 % AcN : 80% formiato de amonio 40 mM pH 4 con flujo 0.2 mL/min y temperatura de 30°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	2.45 - 8.05
EMIM NTfO <sub>2</sub>	2.44-- 7.74
HMIM NTfO <sub>2</sub>	2.41 - 22.27
HMIM TfO	2.46 - 13.82
OMIM PF <sub>6</sub>	2.61 - 5.85 ; 8.32 - 9.73 , 13.90 - 38.81
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	2.43 - 9.26 ; 10.91 - 12.11
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	2.49 - 9.30
BTMA NTfO <sub>2</sub>	2.44 - 7.98
MTOA NTfO <sub>2</sub>	2.52 - 6.33 ; 9.56 - 10.73
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	2.40 - 7.78
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	2.45 - 7.82
TES NTfO <sub>2</sub>	2.48 - 7.78
DMIM BF <sub>4</sub>	2.40 - 13.00 ; 28.50 - + de 60.
BCO. ACETONITRILLO	2.40 - 3.20
ACRILAMIDA	2.50 - 3.25

La segunda prueba con este tipo de cromatografía se hizo con una fase móvil de acetonitrilo y formiato de amonio 40 mM a un pH de 5 con una proporción de 99 % del solvente acuoso, con un flujo de 0.3 mL/min, una temperatura de 30°C y detección a 210 nm. Se inyectaron 5  $\mu$ L de una solución de acrilamida en acetonitrilo de 20 ppm y una mezcla de 20  $\mu$ L de líquido iónico en 80  $\mu$ L de acetonitrilo. En la Figura A.4 se muestra el cromatograma correspondiente a la acrilamida y al líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>. El resumen de los tiempos en que aparecen las señales de los líquidos iónicos, acrilamida, así como los blancos se muestra en la Tabla A.4.



**Figura A.4.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha: señales del líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>.

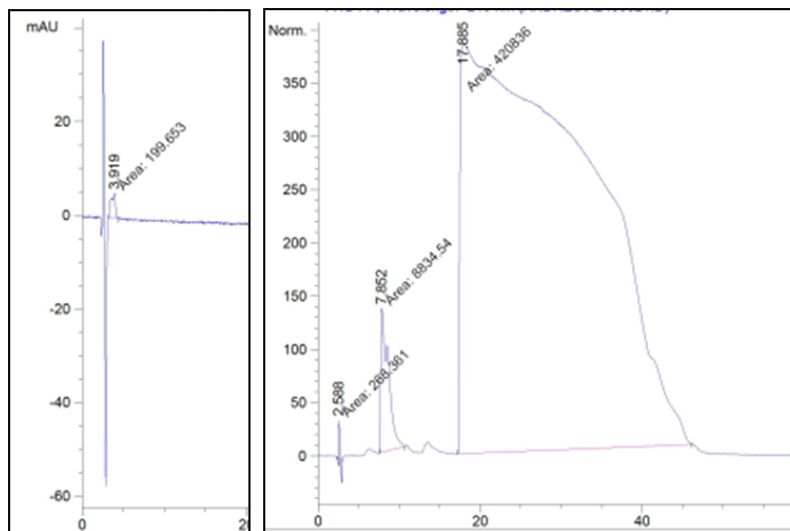
**Tabla A.4:** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Obelisc R con Fase Movel 1 % AcN : 99 % formiato de amonio 40 mM pH 5 con flujo 0.3 mL/min y temperatura de 30°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	1.68 - 17.28
EMIM NTfO <sub>2</sub>	1.72 - 16.26
HMIM NTfO <sub>2</sub>	1.73 - 2.25 ; 3.67 - 4.41 ; 13.06 - 43.30
HMIM TfO	1.70 - 2.03 ; 3.45 - 4.25 ; 7.29 - 29.52
OMIM PF <sub>6</sub>	1.74 - 2.18 ; 34.44 - 59.81
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	1.71 - 2.10 ; 3.56 - 14.88
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	1.72 - 2.13 ; 3.64 - 16.97
BTMA NTfO <sub>2</sub>	1.70 - 7.64
MTOA NTfO <sub>2</sub>	1.75 - 2.31
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	1.68 - 7.36
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	1.89 - 7.16
TES NTfO <sub>2</sub>	1.69 - 5.82
DMIM BF <sub>4</sub>	1.70 - 6.59
BCO. ACETONITRILO	1.76 - 2.30
ACRILAMIDA	1.73 - 2.18



### A.3 Cromatografía de par iónico

Para llevar a cabo esta modalidad se utilizó la columna Atlantis dC18 usando como reactivo de par iónico el TFA en una concentración de 50 mM contenido en un buffer de formiatos 100 mM a pH 4. Las condiciones cromatográficas fueron una fase móvil 99 % buffer de formiatos con TFA : 1% metanol, temperatura de 40°C, flujo de 0.2 mL/min, y detección de 210 nm. Se inyectaron 5 µL de una solución metanólica de 20 ppm de acrilamida y de una mezcla de 20 µL de líquido iónico con 80 µL de metanol. En la Figura A.5 se muestra el cromatograma correspondiente a la acrilamida y al líquido iónico MPPyr NTfO<sub>2</sub>. El resumen de los tiempos en que aparecen las señales de los líquidos iónicos, acrilamida, así como los blancos se muestran en la Tabla A.5.



**Figura A.5.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha: señales del líquido iónico MPPyr NTfO<sub>2</sub>.

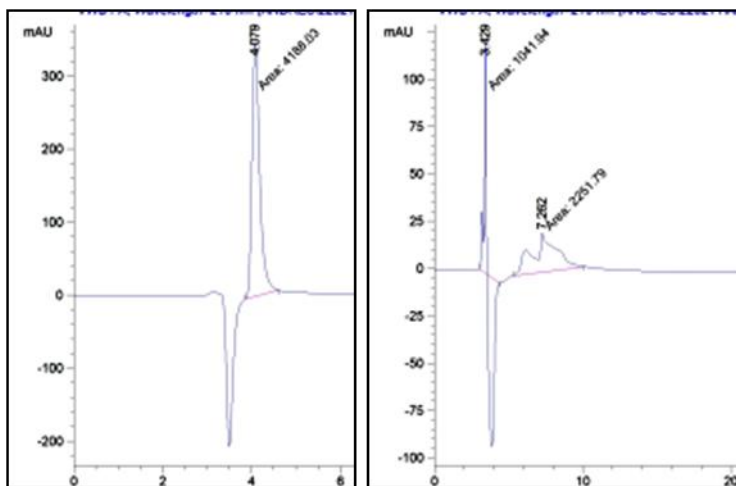
**Tabla A.5.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Atlantis dC18 con Fase Móvil 1 % Metanol : 99 % TFA 50 mM (buffer de formiatos 100 mM pH 4) con flujo 0.2 mL/min y temperatura de 40°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	2.46 - 3.19; 11.82 - 49.63
EMIM NTfO <sub>2</sub>	2.49 - 3.04; 3.93 - 4.61; 5.99 - 27.57
HMIM NTfO <sub>2</sub>	2.42 - 3.11
HMIM TfO	2.25 - 2.91; 3.13 - 6.80; 102.25 - 120 (+)
OMIM PF <sub>6</sub>	2.21 - 2.98; 3.13 - 3.68
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	2.37 - 3.04; 13.18 - 33.55
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	2.45 - 3.02; 7.56 - 10.59; 17.36 - 47.08
BTMA NTfO <sub>2</sub>	2.38 - 3.11
MTOA NTfO <sub>2</sub>	2.31 - 3.25; 74.04 - 88.68
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	2.33 - 3.07
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	2.28 - 3.13; 49.52 - 50.59
TES NTfO <sub>2</sub>	2.23 - 3.13; 5.08 - 7.04; 26.53 - 27.33;
DMIM BF <sub>4</sub>	2.23 - 5.16
BCO METANOL	2.48 - 3.38
ACRILAMIDA	2.45 - 3.23 ; 3.26- 4.31

#### A.4 Cromatografía de fase inversa

Para llevar a cabo la separación por medio de esta modalidad se utilizaron las columnas Luna CN, Atlantis dC 18 y Discovery Cyano.

La columna Luna CN se usó con 2 fases móviles diferentes. En ambas fases se mantuvo la proporción de 99:1 de ácido fórmico 0.1% y solvente orgánico. El solvente orgánico para una fase móvil fue metanol y para la otra acetonitrilo. El flujo fue a 0.15 mL/min, una temperatura de 30°C y la detección a 210 nm. Cuando se usó metanol como solvente orgánico se inyectaron 5 µL de una solución de acrilamida de 20 ppm y una mezcla de 20 µL de líquido iónico con 80 µL de metanol. En la Figura A.6 se muestra el cromatograma de la acrilamida y del líquido iónico BTMA NTfO<sub>2</sub>. En la Tabla A.6 se muestran los tiempos en que aparecen las señales de los líquidos iónicos, la acrilamida y el blanco de metanol.

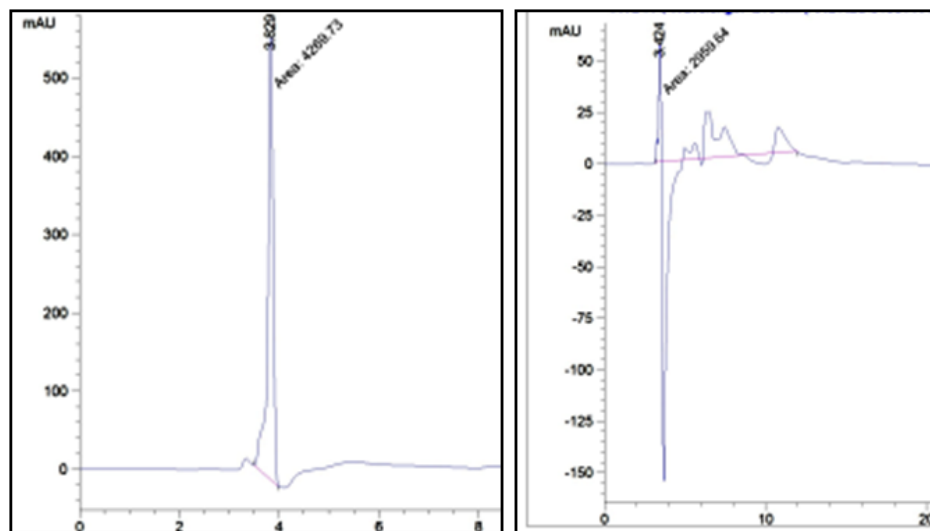


**Figura A.6.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha señales del BTMA NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla A.6.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Luna CN con Fase Móvil 1 % Metanol : 99 % ácido fórmico 0.1 % con flujo 0.15 mL/min y temperatura de 30°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	3.04 - 4.75 ; 5.70 - 28.27
EMIM NTfO <sub>2</sub>	3.01 - 17.21
HMIM NTfO <sub>2</sub>	2.94 - 6.64 ; 15.43 - 58.03
HMIM TfO	3.07 - 4.68 ; 5.76 - 30.08
OMIM PF <sub>6</sub>	3.03 - 4.69 ; 14.02 - 59.63
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	3.10 - 4.11 ; 8.07 - 31.41
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	3.32 - 4.05 ; 4.99 - 6.16 ; 7.10 - 26.09
BTMA NTfO <sub>2</sub>	3.07 - 4.41 ; 5.32 - 10.04.
MTOA NTfO <sub>2</sub>	3.06 - 4.40
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	3.00 - 10.57
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	3.22 - 11.47
TES NTfO <sub>2</sub>	2.96 - 4.00 ; 6.35 - 9.35 ; 9.76 - 12.48
DMIM BF <sub>4</sub>	2.99 - 5.53 ; 11.91 - 44.26
BCO METANOL	3.21 - 4.65
ACRILAMIDA	3.88 - 4.53

Los resultados de las pruebas empleando acetonitrilo como solvente orgánico se muestran en la Figura A.7 y en la Tabla A.7.

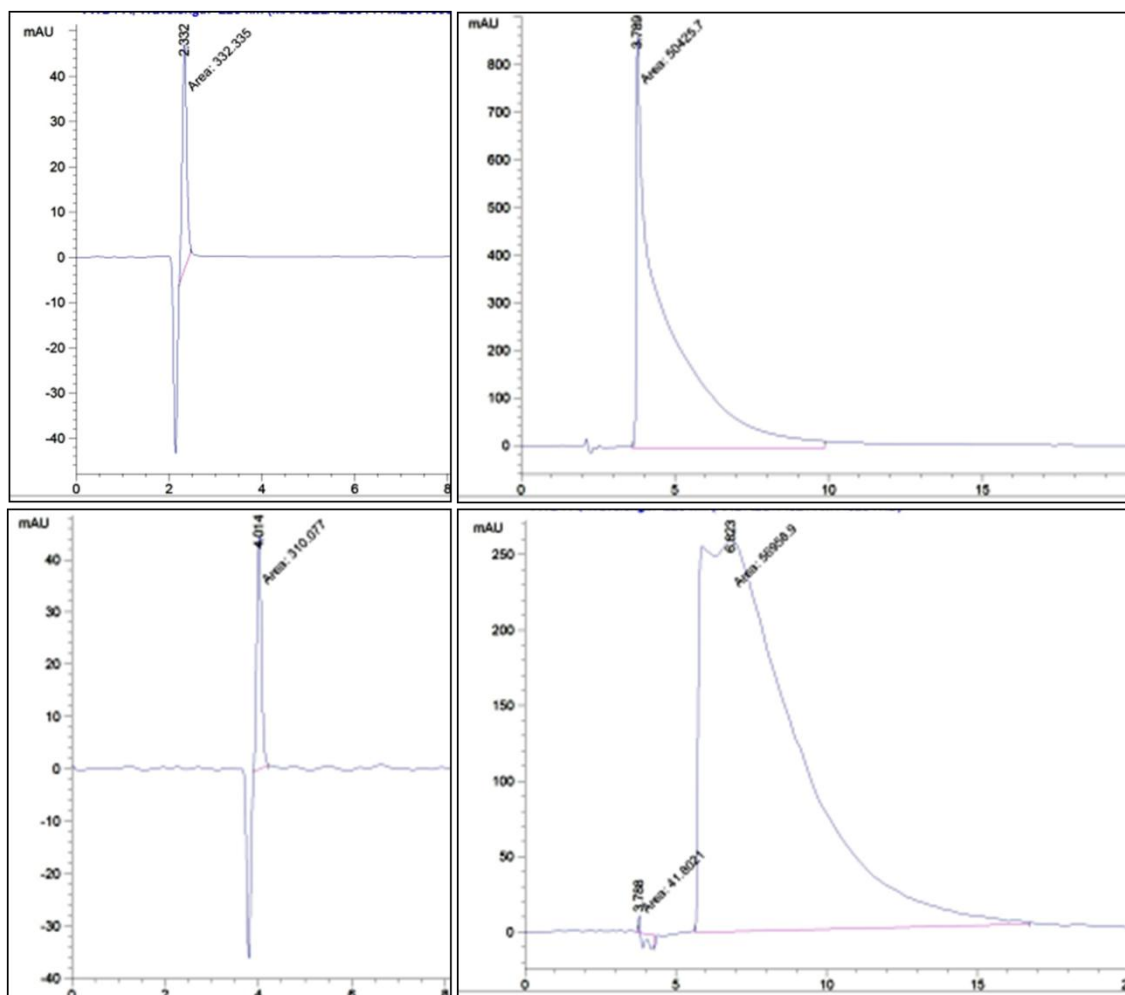


**Figura A.7.** Izquierda señal de la acrilamida, derecha señales del BTMA NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla A.7.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Luna CN con Fase Móvil 1 % acetonitrilo : 99 % ácido fórmico 0.1 % con flujo 0.15 mL/min y temperatura de 30°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	3.20 - 4.10 ; 5.17 - 24.52
EMIM NTfO <sub>2</sub>	3.17 - 17.55
HMIM NTfO <sub>2</sub>	3.13 - 4.08 ; 11.71 - 35.46
HMIM TfO	3.18 - 3.73 ; 5.26 - 23.75
OMIM PF <sub>6</sub>	3.16 - 3.61 ; 10.94 - 47.42
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	3.25 - 3.88 ; 6.02 - 20.78
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	3.31 - 3.85 ; 6.10 - 20.95
BTMA NTfO <sub>2</sub>	3.08 - 12.15
MTOA NTfO <sub>2</sub>	3.11 - 4.33
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	3.10 - 8.41
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	3.03 - 9.89
TES NTfO <sub>2</sub>	3.08 - 7.60
DMIM BF <sub>4</sub>	2.99 - 4.21 ; 10.86 - 60
BCO ACETONITRILLO	3.22- 4.94
ACRILAMIDA	3.50 - 3.98

Usando la columna Discovery Cyano se probaron 2 diferentes condiciones cromatográficas. Tanto la primera como la segunda serie de pruebas se trabajó con una fase móvil de ácido fórmico 0.1% y metanol 99:1, el flujo fue de 1 mL/min y la detección fue a 210 nm. La diferencia entre ambas pruebas consistió en la temperatura del sistema, una se mantuvo en 30°C y la segunda en 40°C. Se inyectaron 5 µL de una solución de acrilamida de 20 ppm así como de la mezcla de 20 µL de líquido iónico con 80 µL de metanol. En la Figura A.8 se muestra el cromatograma de la acrilamida y del líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>. Los tiempos en que aparecen las señales de la acrilamida y los líquidos iónicos se muestran en la Tabla A.8.



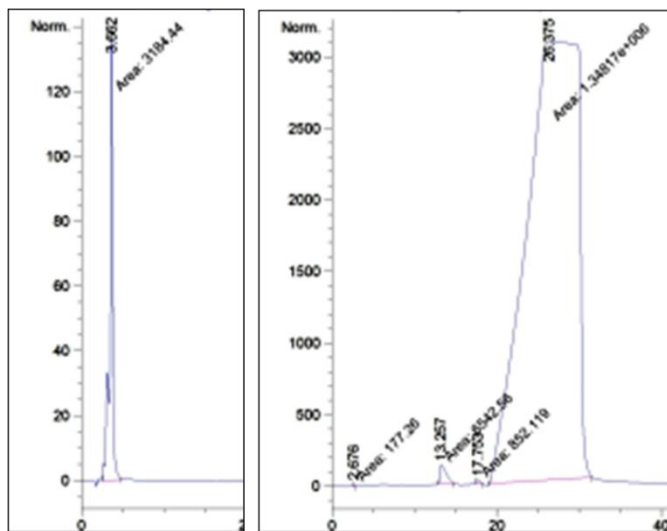
**Figura A.8.** Los cromatogramas del lado izquierdo corresponden a la acrilamida y los de la derecha al líquido iónico HMIM NTfO<sub>2</sub>, los de la parte superior corresponden a las pruebas realizadas a 40°C y los de la parte inferior a 30°C.

**Tabla A.8.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Discovery Cyano con Fase Móvil 1 % metanol : 99 % ácido fórmico 0.1 % con flujo 1.0 mL/min, la temperatura está indicada en la parte superior.

	40° C	30° C
	Tiempo en que aparecen las señales (min)	
BMIM PF <sub>6</sub>	1.99 - 8.05	3.83 - 13.66
EMIM NTfO <sub>2</sub>	2.10 – 2.70 ; 2.84 - 4.98	4.71 - 7.97
HMIM NTfO <sub>2</sub>	2.00 – 2.65 ; 3.62 - 9.86	3.72 - 4.30 ; 5.63 - 15.72
HMIM TfO	2.00 - 10.43	3.56 - 4.31 ; 4.79 - 15.70
OMIM PF <sub>6</sub>	2.05 - 12.91	3.56 - 4.23 ; 5.19 - 20.45
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	2.05 – 2.50 ; 3.22 - 8.18	3.68 - 4.32 ; 5.14 - 12.55
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	2.05 – 2.55 ; 3.27 - 9.24	3.73 - 4.37 ; 5.14 - 12.35
BTMA NTfO <sub>2</sub>	1.94 - 7.38	3.72 - 5.10 ; 7.71 - 10.20
MTOA NTfO <sub>2</sub>	1.94 - 2.63	3.68 - 4.48 ; 8.34 - 11.40
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	1.99 - 8.05	3.72 - 5.41 ; 8.07 - 9.40
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	1.85 - 7.21	3.54 - 5.54
TES NTfO <sub>2</sub>	1.94 - 7.43	3.72 - 6.83
DMIM BF <sub>4</sub>	2.00 – 3.00 ; 3.98 - 10.04	3.87 - 4.61 ; 6.03 - 25.41
BCO METANOL	1.90 - 2.70	3.45 - 4.34
ACRILAMIDA	1.90 - 2.47	3.89 - 4.22

Utilizando la columna Atlantis dC 18 se hicieron pruebas con una fase móvil de agua y metanol en proporciones 99:1 a un flujo de 0.2 mL/min y una temperatura de 40°C. Se inyectaron 5 µL de una solución metanólica de acrilamida de 20 ppm y de la mezcla de 20 µL de líquido iónico con 80 µL de metanol. La Figura A.9 muestra los cromatogramas de la acrilamida y del líquido iónico EMIM NTfO<sub>2</sub>. La Tabla A.9 muestra los tiempos en que aparecen señales en los cromatogramas de los líquidos iónicos, la acrilamida y el blanco.





**Figura A.9.** Izquierda cromatograma de la acrilamida, derecha cromatograma del EMIM NTfO<sub>2</sub>.

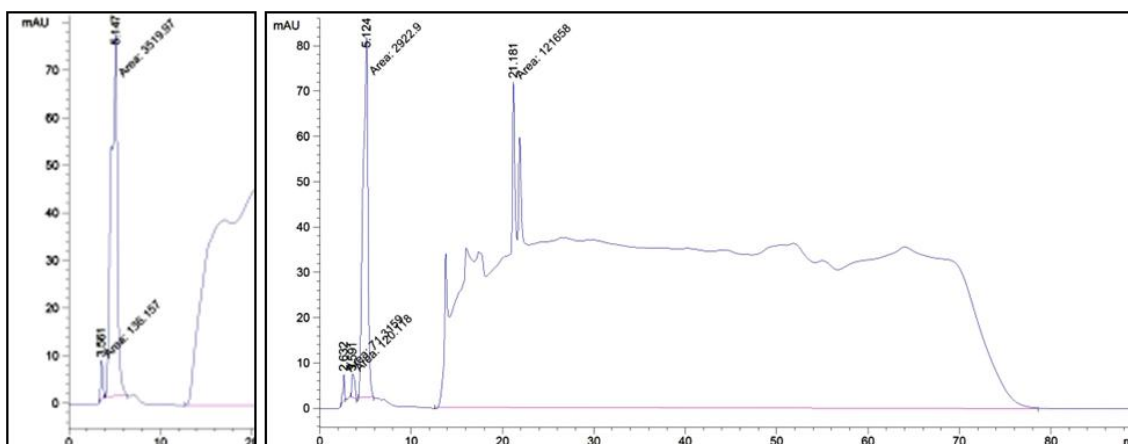
**Tabla A.9.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Atlantis dC18 con Fase Móvil 1 % Metanol : 99 % Agua con flujo 0.2 mL/min y temperatura de 40°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	3.46 - 4.93 ; 6.78 - 16.88
EMIM NTfO <sub>2</sub>	2.47 - 2.94 ; 12.82 - 14.80 ; 17.43 - 18.16 ; 19.00 - 31.62
HMIM NTfO <sub>2</sub>	2.46 - 3.06 ; 4.95 - 13.01 ; 82.30 - 120.00
HMIM TfO	2.47 - 3.12 ; 4.47 - 6.62 ; 9.42 - 36.26
OMIM PF <sub>6</sub>	2.11 - 3.48 ; 5.33 - 32.88
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	2.44 - 3.06 ; 47.39 - 67.26
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	2.44 - 3.06 ; 31.53 - 33.18 ; 49.99 - 70.19
BTMA NTfO <sub>2</sub>	1.97 - 3.06 ; 3.87 - 7.48 ; 17.06 - 22.30 ; 38.56 - 41.00 ; 43.26 - 47.05 ; 50.13 - 54.04
MTOA NTfO <sub>2</sub>	2.34 - 7.34
MPpyrrol NTfO <sub>2</sub>	2.16 - 3.15 ; 3.42 - 7.11 ; 40.88 - 44.44
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	2.22 - 3.13 ; 3.42 - 6.59 ; 61.29 - 63.07
TES NTfO <sub>2</sub>	2.02 - 7.07 ; 7.76 - 16.43 ; 28.97 - 32.70
DMIM BF <sub>4</sub>	2.15 - 3.04 ; 4.01 - 6.01 ; 10.69 - 33.42
BCO METANOL	2.39 - 2.98
ACRILAMIDA	2.46 - 4.57

Utilizando la columna Atlantis dC 18 se hicieron pruebas con una fase móvil de agua y metanol empleando el gradiente indicado en la Tabla A.10, con un flujo de 0.15 mL/min y una temperatura de 30°C. Se inyectaron 5 µL de una solución metanólica de acrilamida de 20 ppm y de una mezcla 20 µL de líquido iónico diluidos en 80 µL de una solución de metanólica de acrilamida de 20 ppm. La Figura A.10 muestra los cromatogramas de la acrilamida y la mezcla del líquidos iónico TES NTfO<sub>2</sub>.con acrilamida, la Tabla A.11 indica los tiempos en que aparecen las señales en los cromatogramas del metanol, la acrilamida y la mezcla líquido iónico-acrilamida.

**Tabla A.10.** Gradiente usado en el método cromatográfico.

Minuto	% Agua	% Metanol
0	99	1
3.6	99	1
3.7	60	40
60	60	40
65	99	1
90	99	1

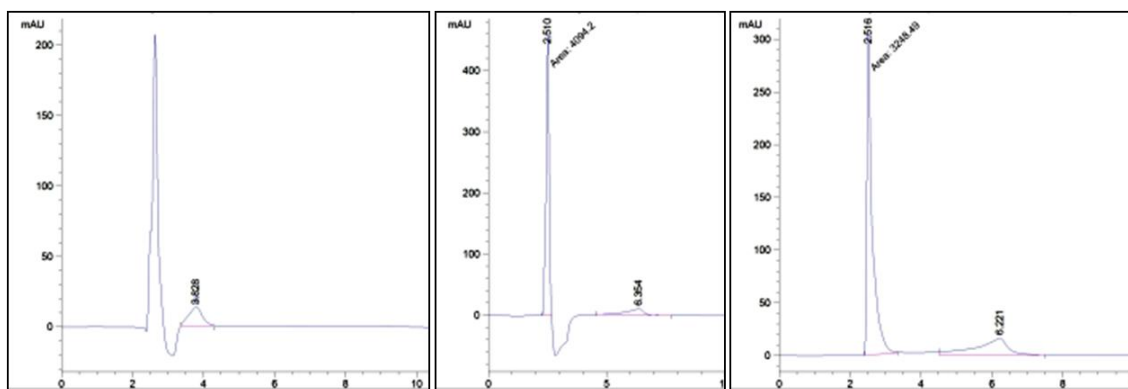


**Figura A.10.** A la izquierda cromatograma de la acrilamida, a la derecha cromatograma de la mezcla de acrilamida con el líquido iónico TES NTfO<sub>2</sub>.

**Tabla A.11.** Tiempo en que aparecen las señales usando la columna Atlantis dC18 con Fase Móvil Metanol :Agua en gradiente con flujo 0.2 mL/min y temperatura de 40°C.

	Tiempo en que aparecen las señales (min)
BMIM PF <sub>6</sub>	4.50 - 6.35 ; 10.25 - 17.29
EMIM NTfO <sub>2</sub>	3.30 - 4.16 ; 4.50 - 6.11 ; 13.15 - 19.37
HMIM NTfO <sub>2</sub>	3.42 - 4.04 ; 4.50 - 5.99 ; 12.91 - 34.43
HMIM TfO	3.42 - 3.84 ; 4.50 - 6.16 ; 13.24 - 20.05
OMIM PF <sub>6</sub>	2.64 - 4.10 ; 4.50 - 6.16 ; 12.94 - 30.74
MMPIM NTfO <sub>2</sub>	3.42 - 4.05 ; 4.50 - 6.06 ; 13.07 - 21.87
MPPyr NTfO <sub>2</sub>	3.43 - 4.04 ; 4.50 - 6.25 ; 13.41 - 22.72
BTMA NTfO <sub>2</sub>	3.37 - 4.09 ; 4.50 - 6.23 ; 12.97 - 20.09
MTOA NTfO <sub>2</sub>	3.37 - 4.09 ; 4.50 - 6.23 ; 12.97 - 20.09
MPPyrrol NTfO <sub>2</sub>	2.13 - 2.88 ; 3.48 - 4.31 ; 4.41 - 6.45 ; 13.06 - 19.65
MPPiper NTfO <sub>2</sub>	2.22 - 3.07 ; 3.12 - 3.94 ; 4.07 - 6.19 ; 12.55 - 20.65
TES NTfO <sub>2</sub>	2.29 - 2.79 ; 3.37 - 4.04 ; 4.23 - 5.90 ; 12.59 - 22.62
DMIM BF <sub>4</sub>	2.13 - 3.08 ; 3.38 - 3.79 ; 4.49 - 5.50 ; 10.20 - 42.12
BCO METANOL	3.22 - 3.88
ACRILAMIDA	3.34 - 3.87 ; 3.99 - 6.41

Usando la columna Hypercarb a un flujo de 0.15 mL/min y a una temperatura de 30°C, se inyectaron 5 µL de una solución de acrilamida de 20 ppm en acetonitrilo. Se probaron 3 fases móviles. Una de ellas consistió en una mezcla de agua y acetonitrilo en proporciones 99:1. Las otras dos eran una mezcla de formiato de amonio 40 mM con pH 5 y acetonitrilo con proporciones de 95:5 y 99:1. En todos los casos se inyectaron 5 µL de una solución de acrilamida en acetonitrilo de 20 ppm. Los resultados se muestran en la Figura A.11.



**Figura A.11.** Los cromatogramas de izquierda a derecha de acuerdo a la fase móvil son: formiato de amonio 95:5, formiato de amonio 99:1, agua 99:1.