

UNIVERSIDAD DE CUENCA



Facultad de Ciencias Químicas

Maestría en Toxicología Industrial y Ambiental

“Evaluación del riesgo toxicológico de la acrilamida del café de las marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.”

Trabajo de titulación previo a la
obtención del título de Magister en
Toxicología Industrial y Ambiental

AUTORA:

Ing. Fabiola Carolina Uday Santacruz
C.I: 0105343891

DIRECTORA:

Dra. Mónica Eulalia Abad Terán MSc.
C.I: 0102135175

Cuenca – Ecuador

28/05/2019



RESUMEN

Uno de los pasos en la elaboración del café granulado o instantáneo es el tostado de las semillas del fruto de los cafetos a altas temperaturas. Dicho procedimiento desemboca en la formación del tóxico *acrilamida*, a través de la reacción de Maillard. A partir de ello, en la presente investigación se evaluó el riesgo toxicológico de la acrilamida del café de las marcas de mayor consumo en la zona urbana de Cuenca. Con base en 384 encuestas a consumidores de café mayores de edad, se encontraron las seis marcas de mayor preferencia, tres de café de infusión (conocido tradicionalmente como *café de pasar*) y tres de café instantáneo. Además, se logró determinar la cantidad de café consumida por los encuestados diariamente. Una vez identificadas las marcas de café más reconocidas en cada categoría, se recolectaron 12 muestras, las mismas que fueron analizadas por duplicado mediante el método EPA8032a modificado de cromatografía de gases con GC/ECD. Las concentraciones de acrilamida encontradas en todas las muestras estuvieron por debajo del límite detectable (<0.02 mg/kg), lo cual no permitió establecer de forma adecuada el riesgo toxicológico para la población consumidora. Asimismo, se obtuvo un Margen de Exposición (MOE) superior a 10.000, lo que permite concluir que el café de las marcas estudiadas no representa ningún riesgo toxicológico para los consumidores.

Palabras claves: Acrilamida. Café. Riesgo toxicológico. Margen de exposición.



ABSTRACT

One of the steps in the production of granulated soluble coffee is the toasting of coffee beans at high temperature. This procedure leads to the formation of the toxic *acrylamide*, through the so-called *Maillard reaction*. Based on this, the search aimed to evaluate the toxicological risk of acrylamide in coffee of the most consumed brands in the urban area of Cuenca. Based on 384 surveys conducted to adult coffee consumers, the six most preferred brands were found, three for granulated coffee –traditionally known as filtered coffee - and three for soluble coffee. In addition, it was possible to determine the daily amount of coffee consumed by the respondents. Once the most recognized coffee brands in each category were identified, twelve samples were collected by the EPA8032a method modified by chromatography gasses with GC/ECD. In all samples the concentration of acrylamide were below the detectable limit (<0.02 mg/kg), which did not allow adequately establishing the toxicological risk for the consuming population. Likewise, a Margin of Exposure (MOE) greater than 10000 was obtained, which means that the coffee of the studied brands did not represent any toxicological risk of consumption.

Keywords: Acrylamide. Coffee. Toxicological risk. Margin of exposure.



TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
LISTA DE TABLAS	6
LISTA DE FIGURAS	7
ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA	9
AGRADECIMIENTO	10
DEDICATORIA	11
INTRODUCCIÓN	13
HIPOTESIS GENERAL	15
HIPÓTESIS ESPECÍFICA	15
OBJETIVO GENERAL	15
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 Café	16
2.2 Componentes químicos del café	17
2.3 Acrilamida: definición	17
2.3.1 Acrilamida en alimentos	19
2.3.2 Formación de la acrilamida en los alimentos	20
2.3.3 Acrilamida en el café	22
2.3.4 Toxicocinética de la Acrilamida	22
2.3.6 Efectos Tóxicos de la Acrilamida	24
2.3.7 Valores de referencia para ingesta de acrilamida	31
2.3.8 Vías de exposición humana a la acrilamida	34
2.4 Evaluación del riesgo toxicológico	35
2.4.1 Identificación del peligro	36
2.4.2 Caracterización del peligro	36
2.4.3 Evaluación de la exposición	37
2.4.4 Caracterización del peligro	37
2.5 Gestión del riesgo	38
2.6 Comunicación del Riesgo	38
2.7 Caracterización del riesgo	38
MATERIALES Y MÉTODOS	40
3.1 Tipo de Estudio	40
3.2 Variable e Indicadores	40
3.2.1 Variables Independientes	40



3.2.2 Variable Dependiente	40
3.2.3 Indicadores	40
3.3 Desarrollo de la investigación	40
3.4 Localización de la zona investigada	41
3.5 Cálculo del tamaño de muestras	41
3.6 Métodos, Técnicas e Instrumentos	42
3.6.3 Evaluación del Riesgo	43
3.7 Análisis Estadístico	45
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
4.1 Caracterización de la población de estudio	47
4.2 Concentración de acrilamida en muestras de café de pasar e instantáneo	48
4.3. Evaluación de riesgo toxicológico	49
4.4 Discusión	50
CONCLUSIONES	51
RECOMENDACIONES	52
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	53
ANEXOS	64



LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Dosis letal 50 (DL50) de acrilamida en modelos animales.

Tabla 2: Ensayos in vitro sobre propiedades mutagénicas, genotóxicas y carcinogénicas de la Acrilamida

Tabla 3: Niveles de Acrilamida en diferentes alimentos.

Tabla 4: Niveles sin efectos observables (NOAEL) de acrilamida basados en estudios experimentales con roedores.

Tabla 5: Niveles de MOE para efectos relacionados al cáncer y neurológicos

Tabla 6: Rango de exposición para diferentes edades de las personas para diferentes tipos de alimentos para acrilamida.

Tabla7: Valores establecidos para el MOE

Tabla 8: Marcas de café de pasar con mayor consumo en la zona urbana de ciudad de Cuenca.

Tabla 9: Marcas de café instantáneo con mayor consumo en la zona urbana de ciudad de Cuenca.

Tabla 10: Cantidad de café de pasar y café instantáneo consumido diariamente



LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fruto del cafeto

Figura 2: Estructura Química de la acrilamida

Figura 3: Formación de Acrilamida

Figura 4: Metabolismo de la acrilamida a glicidamida

Figura 5: Etapas de Evaluación del Riesgo



Cláusula de licencia y autorización para publicación en el Repositorio
Institucional

Fabiola Carolina Uday Santacruz en calidad de autora y titular de los derechos morales y patrimoniales del trabajo de titulación "Evaluación del riesgo toxicológico de la acrilamida del café de las marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca", de conformidad con el Art. 114 del CÓDIGO ORGÁNICO DE LA ECONOMÍA SOCIAL DE LOS CONOCIMIENTOS, CREATIVIDAD E INNOVACIÓN reconozco a favor de la Universidad de Cuenca una licencia gratuita, intrasferible y no exclusiva para el uso no comercial de la obra, con fines estrictamente académicos.

Asimismo, autorizo a la Universidad de Cuenca para que realice la publicación de este trabajo de titulación en el repositorio institucional, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Cuenca, 28 de mayo de 2019

Fabiola Carolina Uday Santacruz

C.I: 0105343891



Cláusula de Propiedad Intelectual

Fabiola Carolina Uday Santacruz autora del trabajo de titulación "Evaluación del riesgo toxicológico de la acrilamida del café de las marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca", certifico que todas las ideas, opiniones y contenidos expuestos en la presente investigación son de exclusiva responsabilidad de su autora.

Cuenca, 28 de mayo de 2019

Fabiola Carolina Uday Santacruz

C.I: 0105343891



AGRADECIMIENTO

A Dios por permitirme haber llegado a culminar una meta más.

A la Dra. Mónica Abad que, con su perseverancia, dedicación y conocimientos, me permitió terminar esta investigación.

A cada una de las personas que de una u otra forma me motivaron, ayudaron para cumplir esta investigación.



DEDICATORIA

Este trabajo dedico a mis padres Manuel y Carmen, mis hermanos Juan, Vinicio y Pilar por su gran ejemplo y valioso apoyo que me han permitido salir adelante y cumplir esta meta.



ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

BMDL₁₀: Benchmark Dose Modelling

DE: Dosis de Exposición

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

EPIC: European Prospective Investigation Into Cancer and Nutrition (Investigación Prospectiva Europea sobre Cáncer y Nutrición)

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

FE: Factor de Exposición

GC/ECD: Cromatografía de gases con detector de captura de electrones

HAP: Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos

IARC: International Agency for Research on Cancer (Agencia Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer)

IDT: Ingesta Diaria Tolerable

IPCS: International Programme on Chemical Safety (Programa Internacional de Seguridad Química)

JECFA: Jointly Expert Committee on Food Additives (Comité Conjunto de Expertos en Aditivos Alimentarios)

MOE: Margin of Exposure (Margen de Exposición)

NOAEL: No Observed Adverse Effect Level (Nivel de Efecto Adverso No Observado)

OMS: Organización Mundial de la Salud

PRM: Productos de la Reacción de Maillard



INTRODUCCIÓN

El café es sin duda una de las bebidas más populares a nivel mundial, no sólo por su aroma y sabor, sino además por sus efectos energizantes y estimulantes. Ecuador es un país productor y consumidor de café. Se cultiva y se cosechan café en 20 provincias del país tanto para consumo propio como para la exportación (Delgado y otros, 2002). Esta bebida se prepara a partir de cafetos (grano de la planta de café) que deben ser tostados y molidos. Como resultado final se obtiene café en sus dos presentaciones, granulado o pulverizado, listo para ser consumido.

El proceso de tostado del café requiere de altas temperaturas, lo óptimo está entre los 200°C a 250°C a fin de intensificar sus propiedades organolépticas. Dicha práctica, aunque pueda parecer inofensiva, puede derivar en la formación de un tóxico llamado *acrilamida*. La acrilamida se forma cuando un aminoácido (asparagina) con azúcares reductores (particularmente glucosa y fructosa) es expuesto a temperaturas elevadas, entre 120°C y 180°C (Molina, 2015). Específicamente en el café, la acrilamida se produce cuando el grano de café es tostado, dando paso a la reacción química de Maillard.

La presencia de este tóxico en los alimentos se comienza a estudiar en el año 2002 (Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición [AECOSAN], 2018). La Agencia Nacional para la Alimentación Sueca publicó un primer informe acerca de la presencia, en niveles considerables, de acrilamida en alimentos fritos, asados, tostados y horneados (Ortiz-Barredo, 2004). En este contexto, recién en 2007 se da inicio a los estudios de las metodologías de análisis para la cuantificación de acrilamida en el café (Calderón, 2015). A partir de ello, se han publicado algunos artículos sobre el tema en algunos países de Europa; sin embargo, en Latinoamérica y específicamente en Ecuador, el tema no ha sido investigado a profundidad.

Hoy en día la acrilamida se clasifica como “probablemente cancerígeno para humanos”, Grupo 2A (Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer [IARC], 1994).



Con una serie de marcas de café en el mercado, y una larga tradición en el consumo de esta bebida por parte de la población ecuatoriana, el presente trabajo propone evaluar el riesgo toxicológico de la acrilamida del café de pasar e instantáneo, de las marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca, partiendo de la hipótesis que la concentración de acrilamida en el café tendría un alto riesgo toxicológico en la población local.



HIPOTESIS GENERAL

- La concentración de acrilamida en el café de las tres marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca, tendrían un alto riesgo toxicológico en la población.

HIPÓTESIS ESPECÍFICA

- Los niveles de acrilamida encontrados en el café de pasar y café instantáneo sobrepasa los niveles máximos establecidos internacionalmente.
- El margen de exposición a la acrilamida tendría un alto riesgo toxicológico para los consumidores.

OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el riesgo toxicológico de la acrilamida del café de las marcas más consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar las marcas de café más consumido en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.
- Determinar la concentración de acrilamida en el café instantáneo y de pasar de tres marcas expendido en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.
- Calcular el margen de exposición de la acrilamida en la población consumidora de café de la zona urbana de la ciudad de Cuenca.
- Determinar el riesgo de toxicidad al que se encuentra expuesta la población consumidora de café.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 Café

El cafeto es un arbusto tropical de hojas verdes perteneciente a la familia Rubiaceas y género *Coffea* spp. que crece a 600 a 1.200 metros de altura que sean moderadamente húmedas. Produce frutos carnosos rojos o púrpuras llamados cerezas de café las cuales cuentan con dos núcleos que contienen cada uno, un grano o semilla de café de color verde (Belitz & Grosch, 1999). El cafeto, es originario de África, y su nombre se deriva de la ciudad de Kaffa, en Etiopía (Temis-Pérez, López-Malo Vigil, & Sosa-Morales, 2011).



Figura 1: Fruto del cafeto.

Autor: (Díaz & Vásquez, 2011)

Se denomina café a la bebida preparada por infusión a partir de las semillas del fruto de los cafetos, debidamente procesadas y tostadas, las cuales le aportan aroma y sabor lo que lo hace una bebida muy apetecida por todas las personas en el mundo (Gotteland & Saturnino, 2007). Otra definición de café se puede decir que es la semilla seca de la planta, sin importar que haya sido tostada o molida (Badui, 1993).

El café es una de las bebidas que más se consumen a nivel mundial, no sólo debido a su sabor y aroma, sino también por ser considerada una bebida energizante, ya que puede mantener a los individuos en estado de alerta (Gotteland & Saturnino, 2007).



Al café se procede a tostarlos con la aplicación de temperaturas (200 a 250°C), a esta temperatura los granos cambian su estructura, se deshidratan y liberan aceite, reducen su peso, toman una coloración oscura y desarrollan sus aromas y sabores característicos. Hay diferentes tipos de tostados desde los más claros (cuando se realiza un tueste ligero) hasta los más oscuros (cuando tienen un alto grado de tueste) con los cuales se prepara el café expreso (Gotteland & Saturnino, 2007).

En Ecuador el café se produce en 20 de las 22 provincias y según la Asociación Nacional de Exportadores de Café (ANECAFE). Se estima que en la región Costa es donde se registra la mayor siembra de café, seguido por la Sierra, lo que convierte al Ecuador es uno de los 14 países con mayor producción de café, cultivando las especies comerciales tanto arábica (*Coffea arábica*) y robusta (*Coffea canephora*) (Delgado, y otros, 2002).

2.2 COMPONENTES QUÍMICOS DEL CAFÉ

El café está compuesto por aminoácidos (ácido glutámico, la leucina, la valina, ácido aspártico, prolina, glicina, fenilalanina, alanina, isoleucina y tirosina), compuestos nitrogenados (cafeína), polisacáridos, azúcares, triglicéridos, ácido linoleico, diterpenos (cafestol y kahweol), ácidos volátiles (fórmico y acético) y no volátiles (láctico, tartárico, pirúvico, cítrico), compuestos fenólicos (ácido clorogénico) sustancias volátiles (sobre 800 identificadas de las cuales 60-80 contribuyen al aroma del café), vitaminas y minerales. También contienen melanoidinas que se derivan de las reacciones de pardeamiento no enzimático o de la caramelización de carbohidratos que ocurren durante el tostado (Gotteland & Saturnino, 2007).

2.3 ACRILAMIDA: DEFINICIÓN

La acrilamida es un intermediario químico usado en la síntesis de poli(acrilamidas). Es un monómero, conocido como etilcarboxamida, vinil-amida o 2-propanamida, se presenta en una forma blanca cristalina, su peso molecular es 71,09 y su número de registro CAS es 79-0601. La acrilamida es soluble en agua, etanol,

metanol, dimetiléter y acetona e insoluble en heptano y benceno. Su fórmula molecular es: $\text{CH}_2\text{CHCONH}_2$ (Elika, 2005).

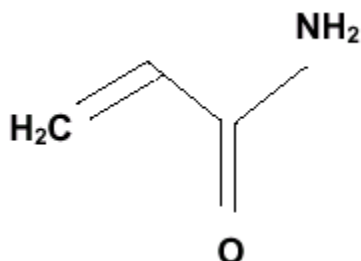


Figura 2: Estructura Química de la acrilamida

Fuente: (Guibert, 2011).

La acrilamida ha sido clasificada como "probable carcinógeno para los humanos" (clase 2A), por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) y como cancerígeno en la categoría 2 de la Unión Europea, en Noruega está clasificada como carcinógeno de alta potencia. La Unión Europea la clasifica como mutágeno en la categoría 2 y tóxico para la reproducción en la categoría 3 (IARC, 1994).

A temperatura ambiente es una molécula estable, también es una sustancia reactiva, volátil (Masson, y otros, 2007), desprende gases tóxicos e irritantes, pero cuando se encuentra en partículas finamente dispersas puede explotar violentamente al exponerse a agentes oxidantes, o a la luz ultravioleta (INSHT, 2018).

Tiene un largo número de aplicaciones industriales como floculante en la clarificación de aguas, eliminar sólidos de aguas residuales industriales, elaboración de pegamentos y colas, como estabilizante de suelos, como aditivo en cosméticos y en la fabricación de papel. También se puede encontrar en el humo del tabaco y en los gases vertidos por los tubos de escape de los coches (Elika, 2005).



El primer caso que se reportó sobre los efectos de la acrilamida en la salud de unos trabajadores fue en 1970, cuando un grupo de trabajadores que realizaban adecuaciones, en un túnel en Francia, los cuales utilizaban lechada (mezcla de cal o cemento con agua). Pero su interés químico se intensificó en septiembre de 1997 al sureste de Suecia, debido a que la biodiversidad de una presa cercana a la construcción de un túnel comenzara a verse afectada, lo que causo que se comenzara a realizar estudios, tanto a trabajadores que fueron expuestos al tóxico, como a personas que no estuvieron expuestas, y todos mostraban cantidades inesperadas de acrilamida (Goffeng, y otros, 2008). Mientras que. Más tarde se añadieron datos donde se incluían también el café como fuente de acrilamida (Ortiz-Barredo, 2004; AECOSAN, 2018).

2.3.1 Acrilamida en alimentos

En los alimentos se puede formar la acrilamida directamente a partir de los aminoácidos (alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina, pueden producir acrilamida bajo las mismas condiciones, pero en menores cantidades que la asparagina) , a través de acroleína o ácido acrílico que puede derivar de la degradación de lípidos, carbohidratos o aminoácidos libres, mediante la descarboxilación de ciertos ácidos orgánicos como el ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico (Muñoz, 2016).

A temperaturas elevadas se da la formación de acrilamida por varias reacciones, dependiendo de las características del alimento y el tiempo que sea expuesto. La mejor vía de síntesis es la reacción de Maillard entre aminoácidos y azúcares reductores, siendo la asparagina, el principal aminoácido precursor presente en papas y cereales (Muñoz, 2016).

La cantidad de acrilamida a la que puede estar expuesta una persona dependerá mucho de algunos factores como el tipo de alimento, la cantidad de acrilamida que se forme y la cantidad consumida, debido a que los alimentos crudos o cocinados en agua no contienen cantidades significativas de acrilamida (Konings, Bears, & Van, 2003).



Las papas fritas fueron los primeros alimentos donde se encontró acrilamida, debido a esto varios investigadores comenzaron a estudiar en que otro tipo de alimentos se puede desarrollar este monómero, entre los cuales están el pan, pastas, arroz, salsas, galletas, cereales, cerveza, café, pizza y productos a base de papas, maíz y harina. Pruebas realizadas han demostrado que la concentración promedio de acrilamida en papas horneadas que es de 1000 µg/kg y en papas fritas de 500 µg/kg (Valenzuela & Ronco, 2007).

2.3.2 Formación de la acrilamida en los alimentos

Solo se da la formación de la acrilamida cuando un alimento sufre una transformación ya sea tecnológica o culinaria es decir sea tostado, horneado o frito, donde se utilicen altas temperaturas, lo que favorece su aparición (Tareke, Per, Sune, & Tornqvist, 2002).

La temperatura óptima de formación de la acrilamida en el alimento esta alrededor de los 180°C, pero favorece su formación desde los 120°C, su formación crece a medida que aumentan la temperatura y el tiempo de tratamiento al que es sometido el alimento (tostado, horneado, fritura) (Flores, 2008).

En varios estudios hechos por varios investigadores se ha evidenciado el origen de la acrilamida, que involucran a la asparagina, por medio de nitrógeno radioactivo y su posterior detección por espectrometría de masa, llegaron a demostrar que los tres carbonos del esqueleto y la amida que forman la acrilamida corresponden a la molécula de la asparagina. (Mottram, Wedzicha, & Dodson, 2002).

La formación de acrilamida a partir de la asparagina está relacionada con la reacción de Maillard, en la que estos aminoácidos reaccionan con compuestos carbonilos durante el calentamiento. La formación de la acrilamida es un fenómeno de superficie, es decir, se da principalmente en la superficie del alimento, donde se alcanzan con mayor rapidez altas temperaturas, mientras que en el interior de los alimentos no alcanza altas temperaturas debido a que el

tiempo de cocción no es suficiente para que se dé la formación de acrilamida (Guibert, 2011).

Esta reacción de Maillard es considerada una reacción de pardeamiento no enzimático donde interviene el grupo amino de un aminoácido (asparagina) y el grupo carbonilo de un azúcar reductor, esto genera color, aroma, sabor en los alimentos, pero también ayuda a generar factores no deseados como mutagénicos o cancerígenos (Valenzuela & Ronco, 2007). Durante este proceso, los aminoácidos libres reaccionan con los azúcares como glucosa, lactosa y fructosa, dando lugar a los Productos de la Reacción de Maillard (PRM), responsables de que los alimentos se colorean a dorado y se potencien los aromas y los sabores apetitosos (Mottram, Wedzicha, & Dodson, 2002). El calentamiento de cantidades equimolares de asparagina y glucosa a 180°C por 30 minutos producen 368 μmol de acrilamida por mol de asparagina (Stadler & Scholz, 2004).

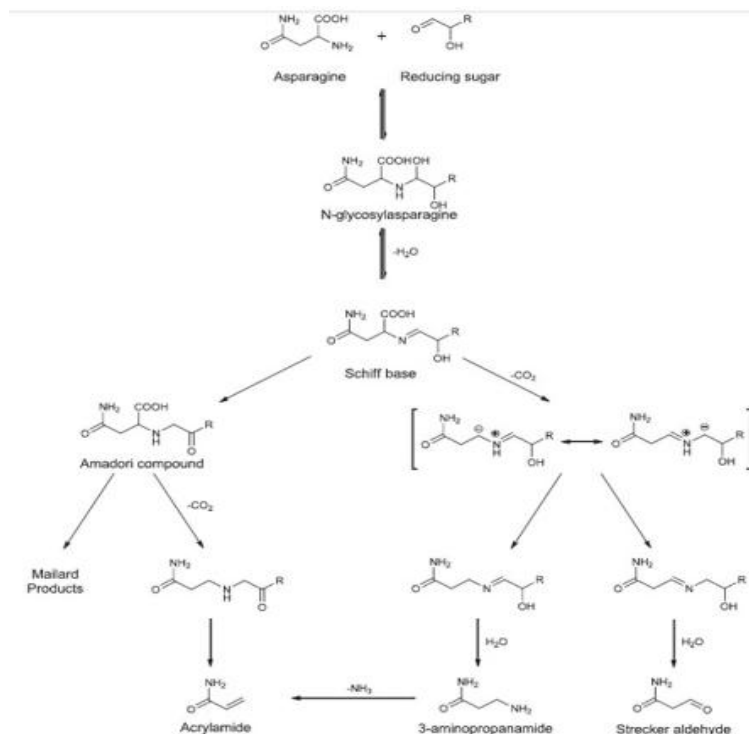


Figura 3: Formación de Acrilamida (Medeiros & Mestdagh, 2012)



2.3.3 Acrilamida en el café

La acrilamida ha sido también encontrada en el café ya que se forma durante el proceso de tostado, que se realiza a temperaturas comprendidas de 220°C a 250°C y a su composición dependiendo de las variedades del café. En los granos de café verde la concentración de asparagina se encuentra en un rango de 30 a 90 mg/100g (Plata, 2015).

La acrilamida en los granos de café tostados se ha encontrado valores comprendidos entre un mínimo de 200 mg/kg y un máximo de 958 mg/kg y en el café instantáneo un valor mínimo de 188 mg/kg y máximo de 1047 mg/kg (EFSA, 2015). La ingesta diaria de acrilamida es bastante significativa en países con una alta tasa de consumo de café. Se ha reportado que una taza de 30 ml de café expreso contiene aproximadamente 0,98 µg de acrilamida. Aún no se ha identificado un método para optimizar el tostado, y así disminuir la formación de acrilamida (Alves, Soares, Casal, Fernandes, & Oliveira, 2010).

2.3.4 Toxicocinética de la Acrilamida

Absorción

La absorción de la acrilamida se da por ingesta, inhalación y vía cutánea. En estudios hechos en animales se han confirmado las tres vías de absorción que tiene el tóxico. Cuando la adsorción es cutánea se produce una absorción rápida debido a la hidrosolubilidad, polaridad y bajo peso molecular de la acrilamida (Erkekoğlu, P; Baydar, T, 2010).

Distribución de la acrilamida

La acrilamida se distribuye en los tejidos, siendo encontrada en concentraciones más altas en los eritrocitos. Según varios estudios se ha encontrado una concentración alta de acrilamida en el corazón, y en menor cantidad en glándula tiroideas, estómago, cerebro, bazo, piel, musculo, riñón, pulmón, hígado, testículos, grasa, intestino grueso e intestino delgado (Kim, y otros, 2015).

Por otra parte, debido a su elevada solubilidad en agua, tanto la acrilamida como su metabolito glicidamida se pueden encontrar en leche materna y placenta (Erkekoğlu, P; Baydar, T, 2010; Schettegen, y otros, 2004).

Metabolismo

La principal vía de metabolización que tiene la acrilamida es la conjugación del glutatión reducido mediante la glutatión-S-transferasa, formando la glicidamida que es epóxido muy reactivo con el ADN (EFSA, 2015).

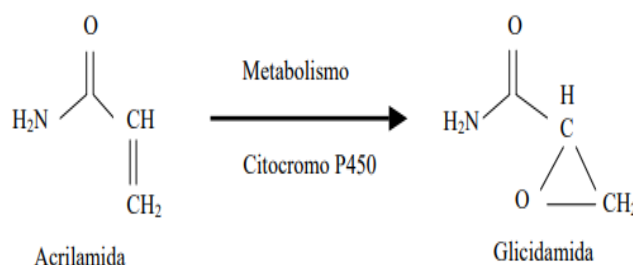


Figura 4: Metabolismo de la acrilamida a glicidamida

Fuente: (Masson L. , y otros, 2007)

A dosis bajas, el 50% de la acrilamida se oxida a su epóxido glicidamida. Al ser una molécula muy reactiva con el ADN, tiene propiedades carcinogénicas y genotóxicas (Moreno Navarro I. , Rubio Armendáriz, Gutiérrez Fernández, Cameán Fernández, & Hardisson de la Torre, 2007).

Estudios hechos en ratones salvajes que carecen del citocromo P450 2E1 (CYP2E1) a los cuales se les administra acrilamida han demostrado que hay una reducción en los niveles en la mutagenicidad, en las células germinales, micro nucleicos y en la formación de aductos del ADN (Beland, y otros, 2013).

Debe destacarse que el metabolismo es mayor en los niños debido a que su hígado es más grande en relación a su peso y que el flujo de sangre a través del hígado es mayor en comparación con los adultos. Puesto que el principal metabolito de acrilamida, glicidamida, se forma mediante biotransformación, es



probable que glicidamida se forme a una tasa superior en niños que en adultos (Erkekoğlu, P; Baydar, T, 2014).

Excreción

Tanto la acrilamida como su metabolito glicidamida tienen una vida media de eliminación extremadamente corta, aunque siempre queda un pequeño porcentaje que permanece en los tejidos durante algunas semanas. En estudios hechos en ratas, se sabe que la vida media de eliminación es de 2 horas aproximadamente en estos animales (Moreno, Rubio, Gutiérrez, Cameán, & Hardisson, 2007). Mientras que sus metabolitos tienen una eliminación bifásica con una vida media inicial de aproximadamente 5 horas y una vida media terminal de 8 días, en los tejidos (Erkekoğlu, P; Baydar, T, 2010).

Los datos farmacocinéticos en humanos son escasos, pero en un estudio realizado tanto a 11 hombres y 11 mujeres, sanas que se les administró acrilamida en la dieta, se obtuvo que la vida media de la acrilamida está entre 2.2 a 7 horas, mientras que, si se administra una dosis oral de acrilamida, a las 24 horas se encontró la eliminación de un 34% en la orina en el grupo de voluntarios. En la orina como conjugados del ácido mercaptúrico se elimina el 2% de acrilamida original (Moreno Navarro, I.M; Rubio Armendáriz, C; Gutiérrez Fernández, A.J; Cameán Fernández, A.M; Hardisson de la Torre, A, 2007)

2.3.6 Efectos Tóxicos de la Acrilamida

En el año 2002 se demostró que la acrilamida está presente en los alimentos, que sean fritos, horneados o tostados a temperaturas superiores a 120°, se comenzó a realizar numerosos estudios en personas para poder encontrar las dosis ingeridas, y poder establecer cuál es la dosis que podría representar un riesgo para la salud, y cuáles serían los efectos agudos y crónicos que causa la acrilamida en el ser humano (Molina P. E., 2015).

La toxicología de acrilamida puede estudiarse en función de los efectos que produce: genotóxico, clastogénico, carcinogénico y neurotóxico, e infertilidad en animales machos de laboratorio (Morales & Rufián, 2004).



Se han realizado diversos estudios toxicológicos en modelos animales como ratas, ratones, monos, cerdos, gatos y perros, administrándoles dosis repetidas de acrilamida siguiendo protocolos de dosificación y distintas vías de exposición. Al final de los estudios se obtuvieron valores de DL50 oral de 150 mg/kg de peso corporal para ratas, 107mg/kg de peso corporal para ratones, y de 150-180mg/kg de peso corporal de conejos y cerdos, lo que les provoco pérdida de peso corporal, y efectos sobre el sistema nervioso, también se evidencio que causa parálisis de la extremidad posterior, cambios hepatológicos en nervios periféricos (Plata, 2015) (EFSA, 2015).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 1985 estableció un valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de 12 µg/kg de peso corporal/día. En 1996 se estableció el límite de acrilamida en agua potable en 0.5 µg/L. Mientras que el nivel sin efecto adverso observable (NOAEL) para neuropatía ha sido fijado en 0.5 mg/Kg peso corporal/día, el NOAEL para cambios en la fertilidad es cuatro veces más elevado (2 mg/kg) (Guibert, 2011).

Tabla 1: Dosis letal 50 (DL50) de acrilamida en modelos animales.

Especie	Vía	DL50 (mg/kg peso corporal)
Conejo	Dérmica	1148
Rata	Dérmica	400
Rata	Intraperitoneal	90-120
Gato	Intravenosa	85
Cerdo de Guinea	Oral	150-180
Rata	Oral	107-251
Rata	Oral	150
Ratón	Oral	107-170
Ratón	Oral	147

Fuente: (Molina Pérez, 2015)



La OMS afirma que la acrilamida pertenece al grupo de sustancias químicas "sin umbral" es decir que es fiable en cuanto a la identificación de sus efectos, por lo que, no existe el riesgo cero para su exposición, aunque se ingiera cantidades siempre pueden mostrar riesgos. Sobre todo con los carcinógenos como acrilamida, el riesgo va aumenta con el aumento de la exposición (Erkekoğlu, P; Baydar, T, 2010).

2.3.6.1 Acrilamida, carcinogénesis y mutagénesis

La IARC ha clasificado la acrilamida como "probable cancerígeno para los seres humanos" (Grupo 2A) sobre la base de la evidencia de estudios en animales ya que la exposición prolongada de acrilamida ha causado tumores en glándulas suprarrenales y testículos de ratas y ratones. Por el contrario, los estudios de trabajadores expuestos a acrilamida a través del aire y el contacto con la piel no han encontrado ninguna evidencia de cáncer. La clasificación de la IARC se basa en que, mientras no se demuestre lo contrario, un carcinógeno animal es potencialmente cancerígeno para los seres humanos (IARC, 1994)

La Acrilamida también ha sido clasificada como cancerígeno en la categoría 2 de la Unión Europea (que puede causar cáncer), también como mutágeno en la categoría 2 (puede causar alteraciones genéticas hereditarias) y toxico para la reproducción o fertilidad en la categoría 3 (posible riesgo de perjudicar la fertilidad) (ECHA, 2009). También se considera un tóxico para células germinales con características carcinógenas en sistemas experimentales in vitro e in vivo. Se estima que la enfermedad genética inducida a través del agua potable puede afectar hasta tres descendencias de ratones (Dearfield, y otros, 1995).

Estudios epidemiológicos con trabajadores expuestos a acrilamida no han demostrado riesgos de cáncer estadísticamente significativos, con la única excepción de cáncer de páncreas para el cual se halló una duplicación del riesgo en los trabajadores más expuestos (Moreno Navarro I. , Rubio Armendáriz, Gutiérrez Fernández, Cameán Fernández, & Hardisson de la Torre, 2007).



Según los autores Pinar Erkekoglu & Terken Baydar (2010) la acrilamida provoca la inducción de los siguientes efectos genotóxicos:

- Mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas en las células germinales de ratones in vivo
- Aberraciones cromosómicas en células germinales de ratas in vivo
- Aberraciones cromosómicas en células somáticas de roedores in vivo
- Mutaciones genéticas y aberraciones cromosómicas en células cultivadas in vitro
- Síntesis de ADN no programada en espermatozoides de ratas in vivo, pero no en hepatocitos de rata. Sin embargo, glicidamida induce la síntesis de ADN no programada en hepatocitos de rata.
- La glicidamida parece ser el responsable de la genotoxicidad

Varios estudios realizados en linfocitos humanos que contienen citocromo P450 el cual es el encargado de la biotransformación de la acrilamida a glicidamida, han demostrado que impiden la reparación del ADN, estos datos fueron confirmados en ensayos realizados en sangre humana que dieron como resultado una mayor genotoxicidad para la glicidamida que para la acrilamida (Moreno, Rubio, Gutiérrez, Cameán, & Hardisson, 2007); (Mei, y otros, 2010).

Estudios hechos en ratas Big Blue F344 tanto machos como hembras, se las expusieron a concentraciones de 4-12 mg/kg pc/día de acrilamida y glicidamida a través del agua de bebida durante 60 días. Los resultados sugieren que acrilamida y glicidamida son genotóxicos sistémicos en ratas bajo condiciones similares a las de los bioensayos de cáncer y que ambos compuestos son más potentes como mutágeno de genes de lo que son como clastógenos (Molina Pérez, 2015).

Los tejidos diana de la acrilamida y su metabolito glicidamida son el intestino grueso, la vejiga y los riñones. El tóxico es soluble en agua por lo que se absorbe rápidamente en el tracto digestivo y es excretado a través de la orina (IARC, 1994).



Los ensayos publicados en modelos animales in vitro muestran que glicidamida induce un aducto con el ADN causando daños en su estructura y es el compuesto responsable de la mutagénesis en cepas de Salmonella y en el linfocito Hprt (Segeberck, Calleman, Schroeder, Costa, & Faustman, 1995); (Molina Pérez, 2015).

Varios estudios in vitro en células de cáncer de ovario y endometrio, demuestran que los efectos dependen mucho de la dosis a la cual es expuesta, ya que a dosis elevadas aumenta el potencial cancerígeno, mientras que a dosis bajas activa los genes para la desintoxicación de acrilamida (Ehlers, y otros, 2013).

Hay varios tipos de tumores causados por acrilamida. En ratones hembra se observan tumores en glándula mamaria, sistema nervioso central, tejidos orales, ovario, útero y glándula del clítoris, cavidad oral, y tumores de la piel, en los machos se observan tumores del mesotelio escrotal y testículos, corazón, páncreas y una incidencia significativamente mayor de tumores en el pre-estómago, mientras que en ambos sexos se observa un aumento significativo en los tumores tiroideos, de pulmón y en glándula de Harder, esta glándula no se encuentra en el ser humano (Molina Pérez, 2015).

El cáncer endometrial de ovario podría ser causado por la glicidamida, debido a que la acrilamida se une a varias proteínas y causa una perturbación en el equilibrio hormonal (globulina). Por lo que no se puede extrapolar los resultados de obtenidos en estudios hechos en ratas debido a que no poseen hormonas (Hogervorst, y otros, 2010).

Tabla 2: Ensayos in vitro sobre propiedades mutagénicas, genotóxicas y carcinogénicas de la Acrilamida

Tipo de estudio	Resultados
Estudios cuantitativos de estructura-actividad de los análogos neurotóxicos de	Acrilamida no fue mutagénica en la prueba de Ames, con la presencia de la fracción S9.



acrilamida	Sin embargo, glicidamida mostro ser mutagénica en algunas cepas de Salmonella
Estudio sobre daños y reparación de ADN inducido por acrilamida en células de ratón de diversos órganos.	Ensayo cometa de pulmon, higado, bazo, rinon, testiculo, medula osea y linfocitos perifericos en raton. Acrilamida causo danos en el ADN de multiples organos de raton.
Efectos moleculares en humano dependientes de la dosis de acrilamida y glicidamida	En lineas celulares, la exposición a dosis altas puede inducir genes con potencial cancerígeno. La exposición a dosis bajas no parece inducir genes con potencial cancerígeno sino activar los genes que participan en la desintoxicación
Toxicidad crnica y estudio de oncogenicidad de acrilamida incorporada en el agua potable de ratas Fischer 344	Se observo degeneracioón de los nervios periféricos, incremento en la incidencia de varios tipos de tumores. En hembras tumores en glándula mamaria, sistema nervioso central, tiroides, tejidos orales, útero y glándula del clítoris. En machos tumores de la glándula tiroides y mesotelio escrotal
Evaluación de la dosis-respuesta de cuatro productos químicos genotóxicos en rata y ratón de micronúcleos combinado (MN) y protocolo de ensayo Cometa	Ensayo de micronucleos y cometa en ratas y ratones. Se hallo que acrilamida induce la micronucleación de reticulocitos en ratas
Genotoxicidad de acrilamida y glicidamida en ratas Big Blue	Ni acrilamida ni glicidamida incrementaron la frecuencia de micronucleación de reticulocitos. En cambio, ambos componentes produjeron pequeños pero significativos incrementos en la frecuencia de mutación del linfocito Hprt

Fuente: (Molina Pérez, 2015)



2.3.6.3 Acrilamida y reproducción, teratógeno y embarazo

La acrilamida afecta la reproducción en ratas debido a que estudios realizados demuestran que produce debilidad en las extremidades traseras de las ratas lo que les impide el agarre suficiente durante la copula lo que ocasiona la penetración disfuncional, atrofia los testículos y disfunción eréctil ya que también afecta los nervios del pene (Molina Pérez, 2015).

En junio de 2002, Food and Agriculture Organization (FAO) y OMS concluyeron que, tomando como base estudios en ratas, un NOAEL de toxicidad reproductiva de 2 mg/kg pc/día era 4 veces superior al de los efectos neurotóxicos crónicos de acrilamida en forma de neuropatía periférica. El Instituto Nacional de Ciencias de la Salud Ambiental (NIEHS) de Estados Unidos planteó una línea de investigación sobre el metabolismo de acrilamida en ratones obesos y delgados. Según Ghanayem et al., (2010), La toxicidad reproductiva inducida mediante el tratamiento de agua con 25 mg de acrilamida durante 5 días aumento la infertilidad masculina en ratones, tanto obesos como delgados (Ghanayem, Bai, Kissling, Travlos, & Hoffler, 2010).

La acrilamida puede atravesar las barreras placentarias por eso causa varias preocupaciones sobre los posibles efectos de la exposición alimentaria en los seres humanos durante el embarazo. Su principal efecto es el desarrollo embrionario y postnatal es menos entendido que sus efectos genotóxicos (Schettegen, y otros, 2004).

Según (Ghanayem, Bai, Kissling, Travlos, & Hoffler, 2010), los embarazos en ratones obesos tratados con acrilamida mostraron una disminución en el porcentaje de fetos vivos, también presentaron mayor mutagenicidad de células germinales y mayor toxicidad reproductiva (Duarte-Salles, 2013); (Pedersen, y otros, 2012a).

Mientras que los efectos en ratas se hallaron que la acrilamida induce un retraso significativo en el desarrollo del peso corporal de los recién nacidos, perdida de



neuronas de Purkinje, e induce cambios estructurales en el desarrollo del cerebelo de rata (Allam, El-Ghareeb, Abdul-Hamid, Baikry, & Sabri, 2011).

2.3.7 Valores de referencia para ingesta de acrilamida

La FAO estimó que las ingestas promedio de la población general está dentro del rango de 0,3 a 0,8 μg de acrilamida/kg pc/día. La ingesta alimentaria crónica promedio estimada en humanos está en el orden de 1 μg /kg pc/día (FAO, 2002).

La OMS estableció un valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de 12 μg /kg de peso corporal/día. El NOAEL para neuropatía ha sido fijado en 0,5 mg/kg peso corporal/día, el NOAEL para cambios en la fertilidad es cuatro veces más elevado (2 mg/kg) entre otros como se muestra en la tabla 3 (Muñoz, 2016). Mientras que la agencia para la Alimentación de Noruega ha llevado a cabo un estudio en el cual ha establecido una ingesta diaria de acrilamida en la población sería de 38 μg por día en hombres y de 29 μg por día en mujeres, la media diaria de consumo de acrilamida para hombres y mujeres de 0.49 y 0.46 μg por kg de peso corporal respectivamente (Dybing & Sanner, 2003).

En el año 2005 Jointly Expert Committee on Food Additives (JECFA) estimó una ingesta de acrilamida entre 0,3 y 2,0 μg /kg pc/día para consumidores medios, considerando datos de 17 países de todas las regiones con excepción de América Latina y África. Los datos disponibles indican que los niños presentan valores de ingesta de acrilamida de 2 a 3 veces mayores que los de consumidores adultos (FAO/WHO, 2005).



Tabla 3: Niveles sin efectos observables (NOAEL) de acrilamida basados en estudios experimentales con roedores.

EFFECTOS	NOAEL mg/Kg pc/día
Alteraciones morfológicas en el sistema nervioso	0.2
Desarrollo de Neurotoxicidad	10
Efectos reproductivos	2

Fuente: (FAO/WHO, 2005)

Luego de realizar varios estudios en mujeres que están en periodo de lactancia se encontró que pasadas las 8 horas de haber ingerido 100g de papas fritas que con 800 µg de acrilamida, una mujer secretó leche con ese tóxico en concentración de 3,17 mg/ml, por ello se recomienda cuidar la dieta de la mujer en periodo de gestación y lactancia (Vega, y otros, 2007).

Se estimaron el rango de la dosis en el que la acrilamida presenta más probabilidad de causar una pequeña pero apreciable incidencia de tumores, el límite mínimo de este rango se denomina Límite mínimo de confianza para la dosis de referencia (BMDL₁₀).

- Para los tumores, los expertos seleccionaron un BMDL₁₀ de 0,17 mg/kg de peso corporal/día.
- Para cambios neurológicos más relevantes que se observaron fueron aquellos con un BMDL₁₀ de 0,43 mg/kg de peso corporal/día.

Los investigadores plantearon un “nivel de peligro sanitario” conocido como margen de exposición (MOE), el proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo. El MOE puede ayudar a definir las posibles acciones necesarias para mantener la exposición tan baja como sea posible (AECOSAN, 2018), (EFSA, 2015).



El margen de exposición (MOE) calculado por JECFA para los efectos cancerígenos fue de 300 para la población general y de 75 para los altos consumidores, márgenes muy bajos, por lo que no se puede descartar el riesgo, en la tabla 4 se muestran valores de MOE para cáncer y neurológicos. El único valor legislado para acrilamida en alimentos es el límite máximo establecido para el agua potable envasada, que es de 0,1 µg/l de agua, según el Real Decreto 1799/2010 en España, mientras que para otros alimentos también se ha determinado un rango de exposición media como se detalla en la tabla 5 (BOE, 2011)

Tabla 4: Niveles de MOE para efectos relacionados al cáncer y neurológicos.

Efectos	Personas	MOE
Cáncer	Bebés	50
	Adultas	425
Neurológicos	Bebés	126
	Adultas	1075

Fuente: (EFSA, 2015)

Tabla 5: Porcentaje de exposición para diferentes edades de las personas para diferentes tipos de alimentos para acrilamida

Edad	Alimentos	Porcentaje de Exposición media
Adultos	Papas fritas y asadas	49%
	Café	34%
	Pan blanco	23%
Niños mayores de una año y adolescentes	Papas fritas	51%
	Pan blanco, cereales, galletas	25%
	Pasteles y productos de confitería	15%



	Papas chips	11%
Bebés hasta 12 meses	Cereales	14%
	Productos derivados de papas	60%

Fuente: (AECOSAN, 2018)

2.3.8 Vías de exposición humana a la acrilamida

Acrilamida es un compuesto tóxico que penetra en el organismo mediante diferentes vías, ya que no hay evidencia científica de producción endógena de acrilamida en el cuerpo humano (INSHT I. N., 2018):

2.3.8.1 Exposición alimentaria

Se habla de exposición alimentaria de acrilamida cuando se consume alimentos que han sido tratados a altas temperaturas para su transformación lo que ayuda a la formación del tóxico y quita la parte nutritiva al alimento (Molina Pérez, 2015).

La determinación de la evaluación de la ingesta de acrilamida es particularmente difícil puesto que los niveles dependen en gran medida de la naturaleza y el alcance del tratamiento térmico de los alimentos y los métodos de preparación varían entre las poblaciones participantes de los estudios, en la tabla 6 se describen los valores de acrilamida presentes en varios tipos de alimentos (Freisling, y otros, 2012)

Tabla 6: Niveles de Acrilamida en diferentes alimentos.

Alimentos	Niveles de Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	<i>Media</i>	<i>Mediana</i>	<i>Máximo</i>	<i>Número de Muestras</i>
Papas fritas Chips	675	450	4533	242
Papas fritas en cocina doméstica	198	115	1155	64
Papas Horneadas	690	410	3955	28



Galletas Infantiles	86	57	470	46
Galletas sin especificar	289	99	5849	100
Pan tostado	249	110	1863	54
Pan	30	18	425	150
Cereales para desayuno	138	91	1290	174
Alimentos Infantiles Basados en Cereales	31	13	578	82
Café Instantáneo	1123	520	8044	15
Café Tostado	256	200	1932	103
Sustitutos del Café	1350	870	4200	24
Café sin especificar	441	300	1800	9

Fuente (EFSA, 2015)

2.4 Evaluación del riesgo toxicológico

La evaluación del riesgo se conoce como la actividad científica para valorar las propiedades tóxicas de una sustancia y las condiciones de exposición humana a dicha sustancia, tanto para cerciorarse de la posibilidad de que los expuestos tengan efectos adversos como para caracterizar la naturaleza de los efectos que puedan experimentar (FAO; WHO; IPCS., &, 2009). También se cómo un proceso cuyo objetivo final es estimar la probabilidad de que una sustancia “x” produzca efectos tóxicos en el organismo. Es una herramienta de predicción cuantitativa de los efectos adversos sobre la salud humana causados por compuestos químicos presentes en el medio ambiente (Rosas, 2015).

La evaluación del riesgo permite dar soporte, con base científica, a la toma de decisiones por los responsables de la gestión de sitios con peligros o contaminantes que afecten la salud de las personas y el medio ambiente, tal como se muestra en la figura 4.

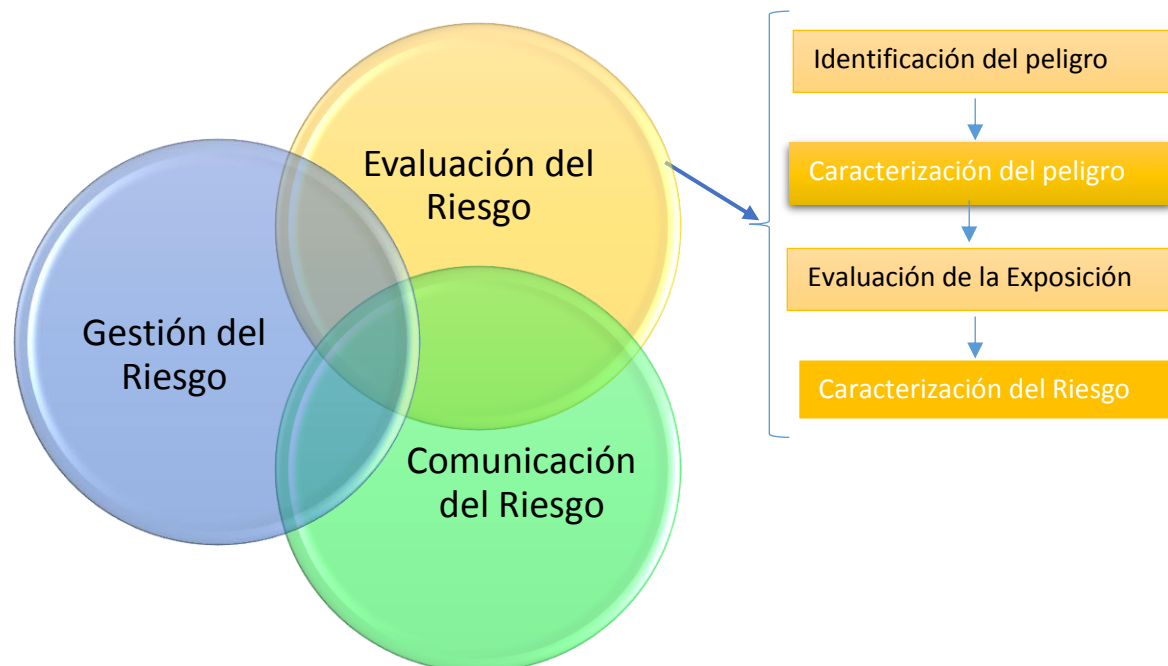


Figura 4: Etapas de Evaluación del Riesgo (Vallejo, 2007)

2.4.1 Identificación del peligro

Identificación de los agentes biológicos, químicos y físicos que pueden causar efectos nocivos para la salud y que pueden estar presentes en un determinado alimento o grupo de alimentos (FAO, 2007). Se trata de determinar si hay suficiente evidencia para considerar a la sustancia la causa del efecto adverso para la salud (Elika, 2005).

2.4.2 Caracterización del peligro

Evaluación cualitativa y/o cuantitativa de la naturaleza de los efectos nocivos para la salud relacionados con agentes biológicos, químicos y físicos que pueden estar presentes en los alimentos (Vélez, 2014).

El propósito de esta etapa es proporcionar una descripción de la gravedad y duración de los efectos adversos que pueden resultar de la ingestión del peligro. Si es posible obtener los datos necesarios, deberá efectuarse una evaluación de la relación dosis-respuesta, determinando la relación entre la magnitud de la



exposición (dosis) a un agente químico, biológico o físico y de la gravedad y/o frecuencia de los efectos nocivos para la salud (respuesta) (Elika, 2005).

2.4.3 Evaluación de la exposición

Es una combinación de los datos de exposición con los datos de consumo, mediante un análisis probabilístico y no probabilístico (FAO, 2007).

Para esto los datos sobre el consumo de alimentos y los datos de exposición puede ser combinado utilizando un enfoque determinista, también llamado punto de estimación, o un enfoque no probabilístico. Que se basa en la selección de un nivel fijo en la distribución del consumo multiplicado por un valor fijo elegido de la distribución de la concentración. El valor de contaminación podría ser el Percentil 95 o los niveles máximos autorizados o un valor medio (media) de los datos de presencia, que se utilizan para evaluar diversos escenarios de riesgo (Dorne, Bordajandi, Amzal, & Ferrari, 2009).

La evaluación puede considerar exposiciones pasadas o actuales, o anticipar exposiciones futuras. En esta fase se determina cuantitativamente la dosis diaria que la población que esta regularmente recibiendo de la sustancia que se está estudiando (FAO, 2007).

2.4.4 Caracterización del peligro

El propósito de esta etapa es proporcionar una descripción cualitativa o cuantitativa de la gravedad y duración de los efectos adversos que pueden resultar de la ingestión de un microorganismo o sus toxinas con los alimentos. Deberá efectuarse una evaluación de la dosis-respuesta (Luna, Signorini, Díaz, & Ordóñez, 2009).

Algunas de las fuentes de información que pueden emplearse para establecer la relación dosis-respuesta incluyen estudios de toxicidad (Voysey & Brown, 2000). Si bien los modelos animales pueden ser de utilidad para determinar esta asociación, deben ser interpretados con cierta precaución debido a la



especificidad por el hospedador que manifiestan muchos peligros (Van der Brandt, y otros, 2002). Por ende, cuando estén disponibles, siempre se preferirá que se realice los estudios clínicos o epidemiológicos para determinar la asociación dosis-respuesta (Anderson & Hilaire, 449-459).

2.5 Gestión del riesgo

Propone políticas de prevención basadas en la evaluación de riesgos con el fin de proteger a la salud de la población, aceptando las recomendaciones y sugerencias (Díaz B. F., 1999)

La función de la Gestión de Riesgo es proteger a la población de probables peligros, tratando de minimizar y controlarlos a través de la selección e implementación de medidas apropiadas. Para la gestión del riesgo se sabe cómo implementar medidas adecuadas para resolver el problema y también la forma de usar los datos de la evaluación (Luna, Signorini, Díaz, & Ordóñez, 2009).

2.6 Comunicación del Riesgo

Hace referencia al intercambio de información y opiniones durante todo el proceso de análisis riesgos con respecto a factores relacionados con los riesgos y percepciones de riesgos entre evaluadores, administradores de riesgos, consumidores, industria, comunidad académica y otras partes interesadas (Dorne, Bordajandi, Amzal, & Ferrari, 2009) (Vélez, 2014).

Este es un proceso interactivo, en donde existe intercambio de información entre todos los sectores involucrados de alguna manera con el peligro bajo análisis (Luna, Signorini, Díaz, & Ordóñez, 2009).

2.7 Caracterización del riesgo



Representa la integración de las determinaciones resultantes de la identificación del peligro, la caracterización del peligro y la evaluación de la exposición, a fin de obtener una estimación del riesgo; proporciona una estimación cualitativa y cuantitativa de la probabilidad y gravedad de los efectos adversos que podrían presentarse en una población dada, incluida la descripción de las incertidumbres asociadas con estas estimaciones (Luna, Signorini, Díaz, & Ordóñez, 2009).

La caracterización del riesgo reúne toda la información cualitativa o cuantitativa de las etapas anteriores a fin de proporcionar una estimación de riesgos con base sólida para una población dada. Esta depende de los datos y opiniones de expertos disponibles. Es posible que el peso de la evidencia obtenida integrando los datos cualitativos y cuantitativos sólo permita efectuar una estimación cualitativa de los riesgos (Luna, Signorini, Díaz, & Ordóñez, 2009).



MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Tipo de Estudio

El presente trabajo es una investigación cuantitativa, analítica no experimental de corte transversal y de campo en los consumidores de café de la zona urbana de la ciudad de Cuenca

3.2 Variable e Indicadores

3.2.1 Variables Independientes

- El sexo de los habitantes de la zona urbana de la ciudad de Cuenca.
- Marcas de café.

3.2.2 Variable Dependiente

- La concentración de acrilamida en el café de pasar y en el café instantáneo.
- El margen de exposición (MOE).

3.2.3 Indicadores

Los indicadores de este estudio fueron la cantidad de café que se consume diariamente, la concentración de acrilamida en el café de pasar e instantáneo, los resultados de las encuestas aplicadas a la población, los resultados del análisis estadístico y los resultados del efecto toxicológico.

3.3 Desarrollo de la investigación

El análisis de las muestras fue llevado a cabo en el Laboratorio de Análisis de alimentos, aguas y afines LABOLAB Cía. Ltda., ubicado en la ciudad de Quito, las muestras fueron analizadas entre el 10 al 18 de diciembre del 2018.



3.4 Localización de la zona investigada

Este estudio se realizó en la zona urbana de la Ciudad de Cuenca, que consta de 330147 habitantes entre hombres y mujeres, que representa el 63.5% del total de la población de la ciudad, distribuida en de 15 parroquias urbanas, las cuales tienen una buena cantidad de negocios donde se expenden café (INEC, 2010).

3.5 Cálculo del tamaño de muestras

Se realizó la investigación de campo, a través de encuestas para saber la preferencia de la marca de café de pasar como instantáneo con mayor consumo en la zona urbana de la ciudad. Las encuestas se realizaron en varios sectores urbanos de la ciudad de Cuenca como el Parque Calderón, San Blas, sector las herrerías, calle larga, se aplicó las encuestas a las personas que sean habitantes de las parroquias urbanas de la ciudad, por lo cual se preguntaba primero a los encuestados el lugar donde viven.

El tamaño de la muestra se calculó a partir de la población total dando como resultado 384 encuestas, para lo cual se utilizó la siguiente ecuación:

$$n = \frac{N\sigma^2 Z^2}{(N-1)e^2 + \sigma^2 Z^2} \quad (1)$$

Fuente:(Suárez, 2012).

Donde:

n = Tamaño de la muestra.

N = Tamaño de la población que es 330147 (habitantes de la zona urbana) (INEC, 2010)

δ = Desviación estándar de la población (0.5)

Z= Es el valor de confianza, que es un valor constante, en este caso se tomó el nivel de confianza de 95% que equivale a 1.96.



E= límite aceptable de error muestral, se tomó el valor del 5% (0.05)(Suárez, 2012).

El tamaño de la muestra con la que se trabajó fue de 3 muestras de café de pasar y 3 muestras de café instantáneo de las marcas de mayor consumo en la zona urbana de la ciudad de Cuenca, con distinto número de lote y fecha de producción. La muestra recolectada de cada café fue de aproximadamente 500 gramos, las cuales fueron enviadas al laboratorio LABOLAB Cía. Ltda. En el ANEXO 1 se describe las marcas de café según el lote que se utilizó para el análisis de laboratorio.

3.6 Métodos, Técnicas e Instrumentos

Para la recolección de la información de campo se aplicaron encuestas las cuales constaban de siete preguntas sobre el consumo de café, que tienen los habitantes de la zona urbana de Cuenca, para obtener datos como las preferencias de marcas en café instantáneo y café de pasar, la cantidad de tazas de café que consume diariamente ya sea de café instantáneo y café de pasar, la cantidad en gramos de café consumido diariamente. El modelo de la encuesta está en el ANEXO 2

Las personas que participaron fueron personas que habitan en la zona urbana de la ciudad de Cuenca que fueran mayores de 18 años, las encuestas se aplicaron a hombre y mujeres, siendo excluidos las personas que no habitan la zona urbana y que sean menores de edad. Una vez terminadas las encuestas se analizó dos muestras de café de las tres marcas de café de pasar como instantáneo que tuvieron la mayor preferencia dentro de la población para conocer la concentración de acrilamida, en el laboratorio LABOLAB.



3.6.2.2 Determinación de la acrilamida en el café

La determinación de la acrilamida en café se realizó por el método 8032A por cromatografía de gases con detector de captura de electrones (gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD)) el cual se utiliza para determinar trazas de monómero de acrilamida en matrices acuosas. La técnica se basa en la bromación del doble enlace de acrilamida. La técnica está en el ANEXO 3 la cual fue facilitada por el laboratorio LABOLAB.

3.6.3 EVALUACIÓN DEL RIESGO

Debido que la concentración de acrilamida en todas las muestras de café de pasar e instantáneo fue inferior a $<0,02$ mg/Kg, que es el límite de detección con el que trabajan en el laboratorio LABOLAB, no se pudo obtener datos para realizar la evaluación precisa del riesgo toxicológico que se propuso en la investigación. Por lo que se evaluó por medio de encuestas las marcas de mayor consumo en café de pasar e instantáneo, se pudo determinar la siguiente información y realizar el cálculo del MOE

1. Se identificaron las marcas con mayor consumo tanto de café de pasar e instantáneo.
2. Se identificó la concentración de acrilamida presente en tres marcas de café instantáneo.
3. Se identificó la concentración de acrilamida presente en tres marcas de café de pasar.
4. Se identificó la ruta de exposición.
5. Se determinó el margen de exposición MOE

Para determinar todos los parámetros se utilizó ecuaciones y relaciones dadas por la EFSA (European Food Safety Authority) la cual establece que el límite



mínimo de confianza para la dosis de referencia (BMDL10) para tumores (llamado efecto neoplásico) es 0.17mg/Kg de peso corporal/día, y para efectos neurológicos es de 0.43 mg/Kg de peso corporal/día, la cual nos ayuda a calcular el Margen de exposición (MOE) o nivel de peligro sanitario (EFSA, 2015). En la tabla 7 se muestran valores de MOE a nivel internacional para cambios morfológicos, neurotoxicidad y para efectos reproductivos.

Para calcular el MOE se utilizó las siguientes ecuaciones:

$$DE = \frac{\text{Nivel de la sustancia química} \left(\frac{m.g}{Kg}\right) \times \text{tasa de ingestión} \left(\frac{m.g}{dia}\right) \times FE}{\text{Peso corporal (Kg)}} \quad (2)$$

$$FE = \frac{\text{número de días de exposición} \times \text{número de años de exposición}}{\text{Periodo de vida (365*70 años)}} \quad (3)$$

Para encontrar la dosis de exposición se utilizaron los siguientes valores: para el nivel de la sustancia química determinada en las muestras tanto para café de pasar como para el café instantáneo es 0.02 mg/Kg el cual está por debajo del límite de detección; para el tasa de ingesta se utilizó para café de pasar 0.001215 mg/Kg y 0.000519 mg/Kg para café instantáneo (Molina P. E., 2015), para hallar la DE se utilizó la ecuación 2.

El factor de exposición con un valor 0.99 se calculó considerando que la población consume café 7 días a la semana, por 52 semanas al año, durante 70 años, dicho valor se calculó con la ecuación 3.

$$MOE = \frac{NOAEL (mg Kg^{-1} dia^{-1})}{DE (mg Kg^{-1} dia^{-1})} \quad (4)$$

**Tabla7:** Margen de Exposición (MOE) de acrilamida a nivel internacional

CAMBIOS	MOE	
	Exposición alimentaria media	Exposición alimentaria alta
Para la inducción de cambios morfológicas en los nervios	200	50
Para la neurotoxicidad durante desarrollo	310	78
Para los efectos reproductivos y desarrollo	180	45

Fuente: (FAO; WHO; IPCS., &, 2009)

Para cancerígenos genotóxicos como es el caso de acrilamida valores de MOE superiores a 10.000 o mayor para las sustancias genotóxicas y cancerígenas se consideran de nivel bajo de peligro para la salud de los consumidores (EFSA, 2015).

3.7 Análisis Estadístico

Los datos recolectados en el estudio de campo, así como en el análisis de las muestras de café de pasar e instantáneo sus valores de referencia establecidos internacionalmente, fueron analizados estadísticamente utilizando el paquete de Excel 2013 y el paquete estadístico SPSS.

Los datos obtenidos de las encuestas se valoró el porcentajes y estadística descriptiva de acuerdo a la preferencia en la marca de café de pasar e instantáneo de la población de la zona urbana. Se aplicó la media, mediana. La cantidad de café que es consumida diariamente se tabulo a través de las frecuencias.



Para el análisis de muestras de café de la zona urbana de la ciudad de Cuenca se aplicó media, moda, mediana, para los datos de las concentraciones de acrilamida en el café de pasar e instantáneo.



RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización de la población de estudio

Se aplicó una encuesta a 384 personas que viven en la zona urbana de la ciudad de Cuenca, las cuales proporcionaron información sobre la marca de café de pasar e instantáneo con mayor preferencia como se indica en la tabla 8 y tabla 9 respectivamente, datos que usamos para hacer el análisis de la presencia de acrilamida en cada una de las tres muestras tanto de café de pasar como de café instantáneo.

Tabla 8: Marcas de café de pasar con mayor consumo en la zona urbana de ciudad de Cuenca.

Café de pasar	Preferencia	Porcentaje
Marca 1	141	37%
Marca 2	85	22%
Marca 3	41	11%
Marca 4	18	5%
Marca 5	23	6%
Marca 6	4	1%
Otros	17	4%
Solo toman Café Instantáneo	28	7%
No toman café	27	7%
TOTAL	384	100%

Tabla 9: Marcas de café instantáneo con mayor consumo en la zona urbana de ciudad de Cuenca.

Marcas de café instantáneo	Preferencia	Porcentaje
Marca 1	102	27%
Marca 2	95	25%
Marca 3	3	1%
Marca 4	67	17%
Marca 5	6	2%



Marca 6	37	10%
Otros	3	1%
No toman café de pasar	44	11%
No toman café	27	7%
TOTAL	384	100%

En la tabla 10 se especifica la cantidad de tazas de café de pasar y café instantáneo que los encuestados consumen en forma diaria, la cantidad de cucharadas de café de pasar son utilizadas por los encuestados, teniendo en cuenta que una cucharada de café equivale a 15 gramos. También se especifica la cantidad de cucharaditas de café instantáneo que se utilizan para preparar de forma diaria el café, teniendo en cuenta que una cucharadita de café instantáneo equivale a 5 gramos.

Tabla 10: Cantidad de café de pasar y café instantáneo consumido diariamente

Cantidad consumida	Café de pasar		Café instantáneo	
	Preferencia	Porcentaje	Preferencia	Porcentaje
1 Taza	123	32%	130	42%
2 Taza	111	29%	107	34%
3 Taza	71	18%	54	17%
4 Taza	18	5%	18	6%
1 Cucharada	162	49%	-	-
2 Cucharada	110	33%	-	-
3 Cucharada	43	13%	-	-
4 Cucharada	11	3%	-	-
1 Cucharadita	-	-	136	43%
2 Cucharadita	-	-	115	37%
3 Cucharadita	-	-	39	12%
4 Cucharadita	-	-	17	5%

4.2 Concentración de acrilamida en muestras de café de pasar e instantáneo

La concentración de acrilamida en las tres muestras de café instantáneo y tres muestras de café de pasar por duplicado dando un total de 12 muestras analizadas como se indica en el Anexo 4, todas obtuvieron un valor de <0.02mg/kg, las pruebas se realizaron por duplicado para cada marca



seleccionada, valor que no supera el límite máximo permisible de por la EFSA que es de 0.45 mg/kg para el café de pasar y 0.9 mg/kg para el café instantáneo.

4.3. Evaluación de riesgo toxicológico

4.3.1 Dosis y Factor de exposición

Para el cálculo de la dosis de exposición (DE) y el factor de exposición (FE) se realizaron mediante las fórmulas que se encuentra en el capítulo de Materiales y Métodos, dando como resultado para el factor de exposición 0.99 y la dosis de exposición para el café de pasar un valor de $3.43E-7$ mg/kg/día y para café instantáneo un valor de $1.46E-7$ mg/kg/día.

4.3.2 Margen de Exposición

El margen de exposición (MOE) fue calculado mediante el dato del NOAEL establecido por la FAO, dando como resultado el MOE para café de pasar un valor de $5.830E5$ y para café instantáneo un valor de $1.369E5$.



4.4 DISCUSIÓN

En China se han establecido valores de MOEs entre 1069 y 621 para la exposición alimentaria media, y de 633 y 367 para la exposición alta, mientras que en Bogotá – Colombia, los valores para el MOE están en el rango de 979 a 185. Los valores de MOE encontrados indican un riesgo para la salud en la población china y bogotana, ya que dichos valores son menores a 10000 -nivel aceptable establecido por el Comité Científico de la EFSA- (AECOSAN, 2018). Las papas fritas se constituyen en una de las comidas con mayor concentración de acrilamida.

La evaluación de la ingesta de acrilamida es particularmente difícil puesto que sus niveles de concentración en los alimentos, depende de varios factores como: la naturaleza, el alcance del tratamiento térmico de los alimentos y los diferentes métodos de preparación (Freisling, y otros, 2012).

De acuerdo con EFSA, la concentración de acrilamida es más baja en el café tostado (249 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que en el café soluble (710 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (EFSA, 2015). Sin embargo, en este estudio debido a las concentraciones bajas de acrilamida en las muestras tanto de café instantáneo como de café de pasar, es imposible determinar qué tipo de café registra un mayor porcentaje de dicho tóxico.

De los 384 encuestados para el presente estudio, ninguno conocía el término acrilamida, lo que demuestra un desconocimiento de la población respecto al tóxico, su presencia en el café y el efecto nocivo que tiene en la salud.



CONCLUSIONES

- Todas las muestras, tanto de café de pasar como de café instantáneo registraron un valor por debajo del límite de detección (<0.02 mg/kg) lo que refleja un nivel insignificante de acrilamida en las marcas más populares de café consumidas en la zona urbana de la ciudad de Cuenca.
- Las concentraciones de acrilamida en las seis marcas más consumidas en la zona urbana de Cuenca presentaron un valor de <0.02 mg/kg, que está por debajo de los límites máximos permisibles establecidos por la EFSA que son de 0.45 mg/kg para el café de pasar y 0.9 mg/kg.
- El valor del MOE obtenido para el café de pasar fue de $5.830E5$ y para el café instantáneo de $1.36E5$, los cuales son mayores al nivel aceptable (10000) razón por la cual no representan un riesgo toxicológico para los consumidores.



RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios sobre la presencia de acrilamida en alimentos que registran un consumo alto en la dieta diaria por parte de la población ecuatoriana, ya que no existen estudios al respecto, lo que lleva a un desconocimiento generalizado sobre el tema, resultando en la falta de concienciación y prevención con respecto a la preparación de alimentos.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agencia española de consumo, seguridad alimentaria y nutrición [AECOSAN]
http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/seguridad_alimentaria/subdetalle/acrilamida.htm
- Allam, A. A., El-Ghareeb, M., Abdul-Hamid, A., Baikry, & Sabri, M. I. (2011). Prenatal and perinatal acrylamide disrupts the development of cerebellum in rat: Biochemical and morphological studies. *Toxicology and industrial health.* , 291-306.
- Alves, R. C., Soares, C., Casal, S., Fernandes, J. O., & Oliveira, M. B. (2010). Acrylamide in espresso coffee: Influence of species, roast degree and brew length. *Food Chemistry*, 119(3), 929–934.
- Anderson, E., & Hilaire, C. (449-459). The contrast between risk assessment and rules of evidence in the context of international trade disputes: can the U.S. experience inform the process? *Risk Analysis.*, 2004.
- Badui, S. (1993). *Química de los Alimentos*. Pearson Education, 736.
- Beland, F., Mellick, P., Olson, G., Mendoza, M., Marques, M. M., & Doerge, D. (2013). Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F (1) mice and F344/N rats from a 2 year drinking water exposure. . *Food and chemical toxicology: an international journal published for the British Industrial Biological Research Association.* 51. , 149-159.
- Belitz, H., & Grosch, W. (1999). *Food Chemistry*. Springer-Verlag.
- Bjellaas, T. H., Olstorn, G., Becher, J., Alexander, S. H., Knutsen, & E, J. (2007). Urinary metabolites as biomarkers of acrylamide exposure in mice following dietary crisp bread administration or subcutaneous injection. *Toxicological Sciences.* 100 (2)., 374–380.
- Boe, M. d. (2011). Real Decreto 1799/2010, de 30 de diciembre, por el que se regula el proceso de elaboración y comercialización de aguas preparadas envasadas para el consumo humano. España: Ministerio de la Presidencia.



- Bongers, M., Janneke, G. F., Hogervorst, S. L., Goldbohm, R., Schouten, H., & van den Brandt, P. (2012). Dietary acrylamide intake and the risk of lymphatic malignancies: the Netherlands Cohort Study on Diet and Cancer. . PloS one., e38016. .
- Calderón, G. J. (2015). Aspectos sobre acrilamida: formación, cuantificación, mitigación y futuras consideraciones. Una revisión. Producción + Limpia, 119-134.
- Carere, A. (2006). Genotoxicity and carcinogenicity of acrylamide:a critica review, Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria. Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy, ann ist super sanità 2006, 144-155.
- Dearfield, K. L., Douglas, G. R., Ehling, U. H., Moore, M. M., Sega, G. A., & Brusick, D. (1995). Acrylamide - a Review of its Genotoxicity and an Assessment of Heritable Genetic Risk. . Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 330(1-2). , 71-99.
- Delgado, P., Larco, A. M., García, C., Alcivar, M. R., Chilán, W. P., & Patiño, C. M. (2002). Café en Ecuador: Manejo de la Broca del Fruto (*Hypothenemus hampei* Ferrari). Manta : Asociación Nacional de Exportadores de Café "anecafé".
- Díaz, B. F. (1999). Metodología de identificación y evaluación de riesgos para la salud en sitios contaminados. Lima: OPS/CEPIS/PUB/99.34 Centro Panamericano de Ingeniería Sanitaria y Ciencias del Ambiente, .
- Díaz, V. P., & Vásquez, E. (2011). Determinación de la composición y la capacidad antioxidante de aceites obtenidos por extracción con CO₂ supercrítico de granos de café con diferente grado de tosti3n. Bucaramanga: Universidad de Sant3nder, Facultad de Ciencias Qu3mica (Tesis).
- Dorne, L., Bordajandi, B., Amzal, P., & Ferrari, P. (2009). Combining analytical techniques, exposure assessment and biological effects for risk assessment of chemicals in food. Elsevier Ltd.



- Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2001). Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. ASM , 768.
- Duarte-Salles, T. S. (2013). Dietary acrylamide intake during pregnancy and fetal growth-results from the Norwegian mother and child cohort study (MoBa). . Environmental health perspectives. , 121. 374.
- Dybing, E., & Sanner, T. (2003). Evaluación del riesgo de acrilamida en alimentos. *Toxicological Sciences*, 7-15.
- ECHA, E. C. (2009). Acrylamide. Netherlands: European Chemicals Agency on request of the European Commission.
- Echeverri, M. L., Jaramillo, L. A., & Quiroz, J. (2014). ACRILAMIDA: Formación y mitigación en procesamiento industrial de alimentos (Trabajo de grado para optar al título de Especialista en Alimentación y Nutrición). Caldas Antioquia: Corporación Universitaria Lasallista.
- EFSA. (2015). Scientific Opinion On acrylamide in food. EFSA, 4140.
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food, EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain . Parma, Italy : European Food Safety Authority (EFSA),.
- Ehlers, A., Lenze, D., Broll, H., Zagon, J., Hummel, M., & Lampen, A. (2013). Dose dependent molecular effects of acrylamide and glycidamide in human cancer cell lines and human primary hepatocytes. Elsevier. *Toxicology letters.*, 111-120.
- Elika. (2005). Qué es la evaluación de Riesgos. Fundacion Vasca para la Seguridad Agroalimentaria.
- Erkekoğlu, P; Baydar, T. (2010). Toxicity of acrylamine and evaluation of its exposure in baby foods. Cambridge Univ Press. *Nutrition research reviews*, 323-333.
- Erkekoğlu, P; Baydar, T. (2014). Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience.*, 49-57.



- FAO. (2007). Análisis de riesgos en la inocuidad de alimentos. Roma: organización mundial de la salud, organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación.
- FAO. (3 de Abril de 2018). Bases de Datos FAOSTAT. Obtenido de Bases de Datos FAOSTAT: <http://www.fao.org/faostat/>
- FAO/WHO, F. A. (2005). Acrylamide. In: summary and conclusions of the sixtyfourth meeting, JOINT FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), . Rome: Summary and conclusions of the sixty-fourth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) .
- FAO; WHO; IPCS., &. (2009). Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food.
- Flores, C. A. (2008). Estudio de Dieta Total: Estimación de la Ingesta de Acrilamida en la Población Valdiviana. Tesis. Valdivia: Universidad Austral de Chile.
- Freisling, H., Moskal, A., Ferrari, P., Nicolas, G., Knaze, V., Clavel-Chapelon, F., . . . Grote, V. (2012). Dietary acrylamide intake of adults in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition differs greatly according to geographical region. Springer. European journal of nutrition., 1369-1380.
- Friedberg, E. C., Walker, G., Siede, & Wood, R. D. (2005). DNA repair and mutagenesis. American Society for Microbiology Press 2nd Edition, Washington DC.
- Ghanayem, B. I., Bai, R., Kissling, G. E., Travlos, G., & Hoffler, U. (2010). Diet Induced Obesity in Male Mice Is Associated with Reduced Fertility and Potentiation of Acrylamide-Induced Reproductive Toxicity. . Biology of reproduction. , 96–104.
- Goffeng, L. O., Heier, M. S., Kjuus, H., Sjöholm, H., Sørensen, K. A., & Skaug, V. (2008). Nerve conduction, visual evoked responses and electroretinography in tunnel workers previously exposed to acrylamide



and N-methylolacrylamide containing grouting agents. *Neurotoxicology and Teratology*, 94-186.

Gotteland, M., & Saturnino, d. P. (2007). Algunas verdades sobre el café. *Revista Chilena de Nutrición*, 0.

Guibert, R. J. (2011). *Acrilamida*. Universidad de Belgrano.

Hogervorst, J., Baars, B., Schouten, L., Konings, E. R., Goldbohm, A., & Brandt, P. (2010). The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Critical reviews in toxicology*, 485-512.

IARC, I. A. (1994). *Acrylamide*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogen Risk to Humans: Evaluation of Carcinogen Risk to Humans:.

INEC. (22 de Julio de 2010). Instituto nacional de estadística y censos. Obtenido de Instituto nacional de estadística y censos: <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/censo-de-poblacion-y-vivienda/>

INSHT. (23 de 04 de 2018). Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo. <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0091.pdf>

INSHT, I. N. (24 de 03 de 2018). Fichas Internacionales de Seguridad Química. Obtenido de Fichas Internacionales de Seguridad Química: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0091.pdf>

Instituto Nacional de Seguridad e Higiene en el Trabajo [INSHT] Obtenido de: <http://www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/Documentacion/FichasTecnicas/FISQ/Ficheros/0a100/nspn0091.pdf>

International Coffe Organization, I. (3 de Abril de 2018). International Coffe Organization. Obtenido de International Coffe Organization: <http://www.ico.org/>

Jin, F., Chun, L., Xu, D. J., & LI, N. (2014). Immunotoxicity of Acrylamide in Female BALB/c Mice. . Elsevier. *Biomedical and Environmental Sciences*, 401-409.



- Khalil, W., Ahmed, H., Aly, H., & Eshak, M. (2014). Toxicological Effects of Acrylamide on Testicular Function and Immune Genes Expression Profile in Rats. . International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research., 143-151.
- Kim, H., Shin, S., Kim, K., Seo, W., Shin, J., Choi, J., . . . Shin, B. (2015). Determination of acrylamide and glycidamide in various biological matrices by liquid chromatography tandem mass spectrometry and its application to a pharmacokinetic study. . Elsevier. Talanta. 131, 46-54.
- Konings, E., Bears, A., & Van, K. J. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risk. Food and Chemical Toxicology, 1581-1586.
- Lin, C., Lin, L., Chen, T., Wen, L., Chien, K. S., Chen, P., & Su, T. (2015). Association between measurements of thyroid function and the acrylamide metabolite N-Acetyl-S-(propionamide)-cysteine in adolescents and young adults. Elsevier. Environmental research, 246-252.
- Lipworth, L., Sonderman, J. S., Tarone, R. E., & McLaughlin, J. K. (2012). Review of epidemiologic studies of dietary acrylamide intake and the risk of cancer. European Journal of Cancer Prevention., 3-20.
- Luna, C., Signorini, P. M., Díaz, G. ., & Ordóñez, M. L. (2009). Evaluación de Riesgos en Alimentos. México: ILSI DE MÉXICO.
- Marsh, G., Lucas, L., Youk, A., & Schall, L. (1999). Mortality patterns among workers exposed to acrylamide: 1994 follow up. Occupational and environmental medicine. , 181-190.
- Masson, L., Muñoz, J. R., Romero, N., Camilo, C., Encina, C., Hernández, L., . . . Robert, P. (2007). Acrilamida en Patatas Fritas: Revision actualizada. Grasas y Aceites.
- Masson, L., Muñoz, J., Romero, M., Camilo, C., Encina, C., Hernández, L., . . . Robert, P. (2007). Acrilamida en papas fritas: revisión actualizada Departamento de Ciencia de los Alimentos y Tecnología Química. Grasas y Aceites , 185-193.



- Matthäus, B., & Haase, N. (2014). Acrylamide—Still a matter of concern for fried potato food?. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 116, 675-687.
- Medeiros, V. R., & Mestdagh, F. y. (2012). Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies. *Food Chemistry*, 1138–1154. .
- Mei, N., McDaniel, P., Dobrovolsky, V., Guo, X., Shaddock, J., Mittelstaedt, R., . . . Heflich, R. (2010). The genotoxicity of acrylamide and glycidamide in big blue rats. . *Toxicological sciences: an official journal of the Society of Toxicology*. , 412-421.
- Miller, M., Carter, D., & Sipes, I. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-334 rats. . *Elsevier. Toxicology and applied pharmacology*. 63. , 36-44.
- Molina Pérez, E. (2015). Evaluación del Riesgo de Exposición Alimentaria a Acrilamida en España (Tesis Doctoral). Valencia: Universidad de Valencia.
- Molina, P. E. (2015). Evaluación del riesgo de exposición alimentaria acrilamida en españa. Valencia: Universidad de Valencia.
- Molina, P. E., Mañes, J., & Manyes, L. (2016). Evaluación del riesgo de exposición dietética a acrilamida en la población española y valenciana. *Toxicología*, 20-30.
- Montaña, C. H., María, P. C., Álvaro, D., Ramón, E. R., Rosa, M. G., María, E. G., . . . Olga, M. B. (2017). Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Nutrición (AECOSAN) sobre los criterios de seguridad que limiten la exposición a acrilamida producida por la fritura de patatas. *Revista del Comité Científico* nº 26.
- Morales, F. J., & Rufián, J. A. (2004). Acrilamida ¿un riesgo para la salud del consumidor?. . *CTC Alimentación*. 20, 13-18.



- Morales, G., Jimenez, M., Mendoza, M., & Beristain, C. (2014). Effect of natural extracts on the formation of acrylamide in fried potatoes. Elsevier. LWT-Food Science and Technology. 58. , 587-593.
- Moreno Navarro, I., Rubio Armendáriz, C., Gutiérrez Fernández, A., Cameán Fernández, A., & Hardisson de la Torre, A. (2007). Acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. Toxicología Asociación Española de Toxicología. , 1-9.
- Moreno Navarro, I.M; Rubio Armendáriz, C; Gutiérrez Fernández, A.J; Cameán Fernández, A.M; Hardisson de la Torre, A. (2007). Acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. Toxicología Asociación Española de Toxicología, 1-9.
- Moreno, N. I., Rubio, A. C., Gutiérrez, F. A., Cameán, F. A., & Hardisson, d. I. (2007). La acrilamida, contaminante químico de procesado: Revisión. Toxicología, 1-9.
- Mottram, D. S., Wedzicha, B. L., & Dodson, A. T. (2002). Food chemistry: acrylamide is formed in the Maillard reaction. Nature, 448-449.
- Mucci, L. A., & Wilson, K. A. (2008). Acrylamide intake through diet and human cancer risk. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 56(15)., 6013–6019.
- Mucci, L., Adami, H., & Wolk, A. (2006). Prospective study of dietary acrylamide and risk of colorectal cancer among women. Wiley Online Library. International Journal of Cancer. 118. , 169-173.
- Muñoz, J. A. (2016). La acrilamida en el procesamiento de los alimentos. Revista de la Sociedad Química del Perú vol.82 No.1
- Obon-Santacana, M., Slimani, N., Lujan-Barroso, L. T., Freisling, H., & Ferrari, P. (2013). Dietary intake of acrylamide and pancreatic cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) cohort. Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO, 2645-2651.



- Ortiz-Barredo, A. M. (2004). Determinación de los niveles de acrilamida en el café. -Instituto de Investigación y Desarrollo Agrario del País vasco [NEIKER].
- Pavesi, A. A., & De Figueiredo, T. M. (2006). Acrylamide in Foods: A Review. . Brazilian Journal of Food Technology, 123-134,.
- Pedersen, G., Hogervorst, J., Schouten, L., Konings, E., Goldbohm, R., & Van den Brandt, P. (2010). Dietary acrylamide intake and estrogen and progesterone receptor-defined postmenopausal breast cancer risk. Springer. Breast cancer research and treatment., 199-210.
- Pedersen, M., Stedingk, v., Botsivali, M., Agramunt, S., Alexander, J., Brunborg, G., . . . J, W. (2012a). Birth weight, head circumference, and prenatal exposure to acrylamide from maternal diet: the European prospective mother-child study (NewGeneris). Environmental health perspectives. 120., 1739-1745.
- Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013). Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. Multidisciplinary Digital Publishing Institute. International journal of environmental research and public health, 3843-3854.
- Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., & Malaguarnera, M. (2013). Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers. . International journal of environmental research and public health. , 3843-3854.
- Pingarilho, M., Oliveira, N., Martins, C., Gomes, B., Fernandes, A., & Martins, V. (2013). Induction of sister chromatid exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: Role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. Mutation Research, 1-7.
- Plata, G. R. (2015). Determinación, Valoración y Reducción de Acrilamida en Alimentos Hidrocarbonados (Tesis Doctoral). Granada: Universidad de Granada.



- Rosas, C. R. (2015). Módulo de Toxicología. Cuenca: Universidad De Cuenca, Programa de maestría en toxicología industrial y ambiental .
- Rúa, T. L. (s.f.). Riesgos y alertas alimentarias: la acrilamida. Madrid: Departamento de Nutrición y Bromatología II. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- Russell, L. B., Hunsicker, P. R., Cacheiro, N., & Generoso, W. M. (1991). Induction of specific-locus mutations in male germ cells of the mouse by acrylamide monomer. Elsevier. Mutation Research Letters. 262. , 101-107.
- Schettegen, T., Kutting, B., Horning, M., Beckmann, M., Weiss, T., Drexler, H., & Angerer, J. (2004). Trans-placental exposure of neonates to acrylamine a pilot study. Springer. International archives of occupational and environmental health. 77, 213-216.
- Segeberback, D., Calleman, C. J., Schroeder, J. L., Costa, L. G., & Faustman, E. M. (1995). Formation of N-7-(2-carbamoyl-2- hydroxyethyl)guanine in DNA of the mouse and the rat following intraperitoneal administration of [14C]acrylamide. Carcinogenesis., 1161-1165.
- Sobel, W., Bond, G., Parsons, T., & Brenner, F. E. (1986). Acrylamide cohort mortality study. British journal of industrial medicine, 785-788.
- Spiller, M. (1998). The chemical components of coffee. En M. Spiller, Caffeine (págs. 103-167). California: CRC Press.
- Stadler, R., & Scholz, G. (2004). Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, level in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. Nutrition Reviews, 449-467.
- Suárez, M. (2012). Interaprendizaje de estadística básica. Ibarra: Coordinación de publicación: Universidad Técnica del Norte.
- Tareke, E., Per, R., Sune, K. P., & Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 4998-5009.



- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Tornqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 4998-5006.
- Temis-Pérez, A., López-Malo Vigil, A., & Sosa-Morales, M. (2011). Producción de café (*Coffea arabica* L.): cultivo, beneficio, plagas y enfermedades. *Temas Seleccionados de Ingeniería de Alimentos*, 54-74.
- Valenzuela, B. R., & Ronco, M. A. (2007). Acrilamida en los Alimentos. *Revista Chilena de Nutrición. Versión On-line ISSN 0717-7518 nutr. v.34 n.1*
- Vallejo, R. M. (2007). *Toxicología Ambiental 2ª. Edición.*, Colombia, 710 p: Grupo Empresarial Wills Ltda, .
- Van der Brandt, P., Voorrips, L., Hertz-Picciotto, I., Shuker, D., Boeing, H., Speijers, G., . . . Goldbohm, A. (2002). The contribution of epidemiology. *Food and Chemical Toxicology*, 387-424.
- Vega, S., Marta, C. H., Rey, G. T., Gilberto, D. G., Acacia, R. A., Salas, M. J., & Pérez, G. J. (2007). Acrilamida un tóxico alimentario en el nuevo milenio. El caso de la leche. Departamento de Producción Agrícola y Animal. . México D.F.: Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco.
- Vélez, V. M. (2014). Evaluación del Riesgo Toxicológico en la Variación de la Concentración de Peróxidos en las diferentes Variedades de papas fritas, Expendidas en la Ciudad de Cuenca (Tesis de Maestría). Cuenca: Universidad de Cuenca.
- Voysey, P., & Brown, M. (2000). Microbiological risk assessment: a new approach to food safety control. *International Journal of Food Microbiology*, 173-179.
- Zyzak, D., Sanders, R., Stojanovic, M., Tallmadge, D., Eberhart, B., & Ewald, D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4782-4787.



ANEXOS

ANEXO 1: La muestra de cada café es de diferente lote como se detalla a continuación:

Café de pasar

Marca 1

- Muestra 1: Se tomó 500g de café del lote 182518
- Muestra 2: Se tomó 500g de café del lote 3C4418

Marca 2

- Muestra1: Se tomó 500g de café del lote 1508518
- Muestra 2: Se tomó 500g de café del lote 0902218

Marca 3

- Muestra 1: Se tomó 500g de café sin lote
- Muestra2: Se tomó 500g de café sin lote

CAFÉ INSTANTÁNEO

Marca 1

- Muestra 1: Se tomó 500g de café instantáneo en polvo con lote número 20180968
- Muestra 2: Se tomó 500g de café instantáneo en polvo con lote número 20180862

Marca 2

- Muestra 1: Se tomó 500g de café soluble atomizado con lote número 230818



- Muestra 2: Se tomó 500g de café soluble atomizado con lote número 260318

Marca 3

- Muestra 1: Se tomó 500g de café soluble granulado con lote número 80610681
- Muestra2: Se tomó 500g de café soluble granulado con lote número 81020681



ANEXO 2: ENCUESTA DE PREFERENCIA DE CAFÉ

ENCUESTAS SOBRE LAS PREFERENCIAS DE LA POBLACIÓN DE LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE CUENCA SOBRE EL CONSUMO DE CAFÉ

ENCUESTAS NECESARIAS PARA EL DESARROLLO DE LA TESIS PREVIA OBTENCIÓN DEL TÍTULO DE MAGISTER EN TOXICOLOGIA INDUSTRIAL Y AMBIENTAL, “EVALUACIÓN DEL RIESGO TOXICOLÓGICO DE LA ACRILAMIDA DEL CAFÉ DE LAS MARCAS MÁS CONSUMIDAS EN LA ZONA URBANA DE LA CIUDAD DE CUENCA.” DE LA UNIVERSIDAD DE CUENCA.

LA INFORMACIÓN OBTENIDA SERA CONFIDENCIAL Y DE USO EXCLUSIVO PARA ESTE ESTUDIO.

NOMBRE:

Género: Masculino Femenino

Edad:

INDICACIONES: MARQUE CON UNA “X” EN LA RESPUESTA CORRECTA.

1. ¿Consumo Usted café?

Sí No

2. ¿Qué tipo de café consume?

- a) Instantáneo.
- b) Tostado y molido (Café de pasar).
- c) Los dos.

3. ¿De las siguientes marcas de café, cuál es la que consume regularmente?

- Para Pasar: Minerva
- Montecristi
- Café Cubanito
- Colcafé
- Café Lojanito
- Sello Rojo
- Juan Valdez
- Otro:



Instantáneo:

- Colcafé
- Nescafé
- Pres 2
- Si Café
- Café Oro
- Café Buen día
- Otro.....

4. ¿Qué cantidad de café consume Usted diariamente?

- a) 1 Taza de café
- b) 2 tazas de café
- c) 3 tazas de café
- d) 4 tazas de café
- e) otra cantidad: especifique

5. ¿Qué cantidad de café instantáneo consume Usted diariamente?

- a) 1 cucharadita que equivale a 5 gramos.
- b) 2 cucharadita que equivale a 10 gramos.
- c) 3 cucharadita que equivale a 15 gramos.
- d) 4 cucharadita que equivale a 20 gramos.
- e) Otra cantidad, especifique

6. ¿Qué cantidad de café de pasar consume Usted diariamente?

- a) 1 cucharada que equivale a 15 gramos.
- b) 2 cucharada que equivale a 30 gramos.
- c) 3 cucharada que equivale a 45 gramos.
- d) 4 cucharada que equivale a 60 gramos.
- e) Otra cantidad, especifique.

GRACIAS POR SU COLABORACIÓN



ANEXO 3: Método 8032A

METHOD 8032A

ACRYLAMIDE BY GAS CHROMATOGRAPHY

1.0 SCOPE AND APPLICATION

1.1 Method 8032 is used to determine trace amounts of acrylamide monomer (CAS No. 79-06-1) in aqueous matrices. This method may be applicable to other matrices and to other similar analytes.

1.2 The method detection limit (MDL) in an aqueous matrix is 0.032 µg/L.

1.3 This method is restricted for use by, or under the supervision of, analysts experienced in the use of gas chromatographs and skilled in the interpretation of gas chromatograms. Each analyst must demonstrate the ability to generate acceptable results with this method.

2.0 SUMMARY OF METHOD

2.1 Method 8032 is based on bromination of the acrylamide double bond. The reaction product (2,3-dibromopropionamide) is extracted from the reaction mixture with ethyl acetate, after salting out with sodium sulfate. The extract is cleaned up using a Florisil column, and analyzed by gas chromatography with electron capture detection (GC/ECD).

2.2 Compound identification should be supported by at least one additional qualitative technique. Analysis using a second gas chromatographic column or gas chromatography/mass spectrometry may be used for compound confirmation.

3.0 INTERFERENCES

3.1 No interference is observed from seawater or in the presence of 8.0% of ammonium ions derived from ammonium bromide.

3.2 Impurities from potassium bromide are removed by the Florisil cleanup procedure.

4.0 APPARATUS AND MATERIALS

4.1 Gas chromatographic system

4.1.1 Gas chromatograph suitable for on-column injections with all required accessories, including detector, analytical columns, recorder, gases, and syringes. A data system for measuring peak heights and/or peak areas is recommended.

4.1.2 GC Column - 2 m x 3 mm glass column, 5% FFAP (free fatty acid polyester) on 60-80 mesh acid washed Chromosorb W, or equivalent.

4.1.3 Detector - electron capture detector.

4.2 Separatory funnel - 150-mL.



4.3 Volumetric flask (Class A) - 100-mL, with ground-glass stopper; 25-mL, amber, with ground-glass stopper.

4.4 Syringe - 5-mL.

4.5 Microsyringes - 5- μ L, 100- μ L.

4.6 Pipets (Class A).

4.7 Glass chromatography column (30 cm x 2 cm).

4.8 Mechanical shaker.

5.0 REAGENTS

5.1 Reagent grade chemicals shall be used in all tests. Unless otherwise indicated, it is intended that all reagents shall conform to the specifications of the Committee on Analytical Reagents of the American Chemical Society, where such specifications are available. Other grades may be used, provided it is first ascertained that the reagent is of sufficiently high purity to permit its use without lessening the accuracy of the determination.

5.2 Organic-free reagent water. All references to water in this method refer to organic-free reagent water, as defined in Chapter One.

5.3 Solvents - All solvent must be pesticide quality, or equivalent.

5.3.1 Ethyl acetate, $C_2H_5CO_2C_2H_5$

5.3.2 Diethyl ether, $C_2H_5OC_2H_5$. Must be free of peroxides as indicated by test strips (EM Quant, or equivalent). Procedures for removal of peroxides are provided with the test strips. After cleanup, 20 mL of ethyl alcohol preservative must be added to each liter of ether.

5.3.3 Methanol, CH_3OH

5.3.4 Benzene, C_6H_6

5.3.5 Acetone, CH_3COCH_3

5.4 Saturated bromine water - Prepare by shaking organic-free reagent water with bromine and allowing to stand for 1 hour, in the dark, at 4°C. Use the aqueous phase.

5.5 Sodium sulfate (anhydrous, granular), Na_2SO_4 . Purify this reagent by heating at 400°C for 4 hours in a shallow tray, or by precleaning the sodium sulfate with methylene chloride. If the sodium sulfate is precleaned with methylene chloride, a method blank must be analyzed, demonstrating that there is no interference from the sodium sulfate.

5.6 Sodium thiosulfate, $Na_2S_2O_3$, 1 M aqueous solution.

5.7 Potassium bromide, KBr, prepared for infrared analysis.

5.8 Concentrated hydrobromic acid, HBr, specific gravity 1.48.



5.9 Acrylamide monomer, $\text{H}_2\text{C}=\text{CHCONH}_2$, electrophoresis reagent grade, minimum 95% purity.

5.10 Dimethyl phthalate, $\text{C}_6\text{H}_4(\text{COOCH}_3)_2$, 99.0% purity.

5.11 Florisil (60/100 mesh): Prepare Florisil by activating at 130°C for at least 16 hours. Alternatively, store Florisil in an oven at 130°C . Before use, cool the Florisil in a desiccator. Pack 5 g of the Florisil, suspended in benzene, in a glass column (Sec. 4.8).

NOTE: Benzene is toxic, and should only be used in a ventilated laboratory hood.

5.12 Stock standard solution

Prepare a stock standard solution of acrylamide monomer as described below. When compound purity is assayed to be 96% or greater, the weight can be used without correction to calculate the concentration of the stock standard. Commercially-prepared standards can be used at any concentration if they are certified by the manufacturer or by an independent source.

Dissolve 105.3 mg of acrylamide monomer in organic-free reagent water in a 100-mL volumetric flask, and dilute to the mark with organic-free reagent water. Dilute the solution of acrylamide monomer so as to obtain standard solutions containing 0.1 - 10 mg/L of acrylamide monomer.

5.13 Calibration standards

Dilute the acrylamide stock solution with organic-free reagent water to produce standard solutions containing 0.1 - 5 mg/L of acrylamide. Prior to injection the calibration standards are reacted and extracted in the same manner as environmental samples (Sec. 7.0).

5.14 Internal standards

The suggested internal standard is dimethyl phthalate. Prepare a solution containing 100 mg/L of dimethyl phthalate in ethyl acetate. The concentration of dimethyl phthalate in the sample extracts and calibration standards should be 4 mg/L.

6.0 SAMPLE COLLECTION, PRESERVATION, AND HANDLING

6.1 See the Introductory material to this chapter, Organic Analytes, Sec. 4.1.

7.0 PROCEDURE

7.1 Bromination

7.1.1 Pipet 50 mL of sample into a 100-mL glass-stoppered flask. Dissolve 7.5 g of potassium bromide into the sample, with stirring.

7.1.2 Adjust the pH of the solution with concentrated hydrobromic acid until the pH is between 1 and 3.



7.1.3 Wrap the flask with aluminum foil in order to exclude light. Add 2.5 mL of saturated bromine water, with stirring. Store the flask and contents in the dark, at 0°C, for at least 1 hour.

7.1.4 After reacting the solution for at least 1 hour, decompose the excess of bromine by adding 1 M sodium thiosulfate solution, drop by drop, until the solution becomes colorless.

7.1.5 Add 15 g of sodium sulfate and stir vigorously using a magnetic stirrer.

7.2 Extraction

7.2.1 Transfer the solution into a 150-mL separatory funnel. Rinse the reaction flask three times with 1-mL aliquots of organic-free reagent water. Transfer the rinsings into the separatory funnel.

7.2.2 Extract the aqueous solution twice with 10-mL portions of ethyl acetate for 2 min each extraction, using a mechanical shaker at approximately 240 strokes per minute. Dry the organic phase with 1 g of sodium sulfate.

7.2.3 Transfer the organic phase into a 25-mL amber volumetric flask. Rinse the sodium sulfate with three 1.5-mL portions of ethyl acetate and combine the rinsings with the organic phase.

7.2.4 Add exactly 100 µg of dimethyl phthalate to the flask and make the solution up to the 25 mL mark with ethyl acetate. Inject a 5-µL aliquot of this solution into the gas chromatograph.

7.3 Florisil cleanup - Whenever interferences are observed, the samples should be cleaned up as follows.

7.3.1 Transfer the dried extract into an evaporation vessel with 15 mL of benzene. Evaporate the solvent at 70°C under reduced pressure, and concentrate the solution to about 3 mL.

7.3.2 Add 50 mL of benzene and subject the solution to Florisil column chromatography at a flow rate of 3 mL/min. Elute the column first with 50 mL of diethyl ether/benzene (1:4) at a flow rate of 5 mL/min, and then with 25 mL of acetone/benzene (2:1) at a flow rate of 2 mL/min. Discard all of the first eluate and the initial 9 mL portion of the second eluate, and use the remainder for the determination, using dimethyl phthalate (4 mg/L) as an internal standard.

NOTE: Benzene is toxic, and should be only be used in a ventilated laboratory hood.

7.4 Gas chromatographic conditions

Nitrogen carrier gas flow rate:	40 mL/min
Column temperature:	165°C.
Injector temperature:	180°C
Detector temperature:	185°C.
Injection volume:	5 µL



7.5 Calibration

7.5.1 Inject 5 μL of a method blank (organic-free reagent water carried through all sample storage, handling, bromination and extraction procedures) into the GC.

7.5.2 Prepare a minimum of five standard solutions of acrylamide as described in Sec. 5.13.1. One standard should be near the detection limit of the method. The remaining four standards should bracket the expected sample concentrations and cover the linear working range of the instrument. Brominate and extract each standard solution as described in Secs. 7.1 and 7.2.

7.5.3 Inject 5 μL of each of the brominated and extracted standards, and record the instrument response.

7.5.4 Calculate the response factor relative to the internal standard for each calibration standard according to the guidance in Sec. 7.0 of Method 8000.

7.5.5 Calculate the mean, standard deviation, and relative standard deviation of the response factors from the five calibration standards, using the equations found in Sec. 7.0 of Method 8000.

7.5.6 If the RSD of the response factors is less than or equal to 20%, then the calibration can be assumed to be linear, and an average response factor may be used to calculate sample results. If the RSD is greater than 20%, see Method 8000 for alternative approaches to calibration.

7.6 Sample analysis

7.6.1 Inject 5- μL portions of each sample extract (containing 4 mg/L internal standard) into the gas chromatograph. An example GC/ECD chromatogram is shown in Figure 1.

7.6.2 The concentration of acrylamide monomer in the sample is calculated according to the following equation.

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/L}) = \frac{(A_s)(C_{is})(D)(V_i)}{(A_{is})(\overline{\text{RF}})(V_s)(1000)}$$

where:

- A_s - Area (or height) of the peak for the analyte in the sample.
- A_{is} - Area (or height) of the peak for the internal standard.
- C_{is} - Concentration of the internal standard in the concentrated sample extract ($\mu\text{g/L}$).
- D - Dilution factor, if the sample or extract was diluted prior to analysis. If no dilution was made, $D = 1$. The dilution factor is always dimensionless.
- V_i - Volume of the extract injected (μL). The injection volume for samples and calibration standards must be the same.
- $\overline{\text{RF}}$ - Mean response factor from the initial calibration.
- V_s - Volume of the aqueous sample extracted or purged (mL). If units of liters are used for this term, multiply the results by 1000.



The 1000 in the denominator represents the number of μL in 1 mL. If the Injection (V_i) is expressed in mL, then the 1000 may be omitted.

Using the units specified here for these terms will result in a concentration in units of ng/mL, which is equivalent to $\mu\text{g/L}$.

8.0 QUALITY CONTROL

8.1 Refer to Chapter One and Method 8000 for specific quality control (QC) procedures. Quality control procedures to ensure the proper operation of the various sample preparation and/or sample introduction techniques can be found in Methods 3500 and 5000. Each laboratory should maintain a formal quality assurance program. The laboratory should also maintain records to document the quality of the data generated.

8.2 Quality control procedures necessary to evaluate the GC system operation are found in Method 8000, Sec. 7.0 and includes evaluation of retention time windows, calibration verification and chromatographic analysis of samples.

8.3 Initial Demonstration of Proficiency - Each laboratory must demonstrate initial proficiency with each sample preparation and determinative method combination it utilizes, by generating data of acceptable accuracy and precision for target analytes in a clean matrix. The laboratory must also repeat the following operations whenever new staff are trained or significant changes in instrumentation are made. See Method 8000, Sec. 8.0 for information on how to accomplish this demonstration.

8.4 Sample Quality Control for Preparation and Analysis - The laboratory must also have procedures for documenting the effect of the matrix on method performance (precision, accuracy, and detection limit). At a minimum, this includes the analysis of QC samples including a method blank, a matrix spike, a duplicate, and a laboratory control sample (LCS) in each analytical batch.

8.4.1 Documenting the effect of the matrix should include the analysis of at least one matrix spike and one duplicate unspiked sample or one matrix spike/matrix spike duplicate pair. The decision on whether to prepare and analyze duplicate samples or a matrix spike/matrix spike duplicate must be based on a knowledge of the samples in the sample batch. If samples are expected to contain target analytes, then laboratories may use one matrix spike and a duplicate analysis of an unspiked field sample. If samples are not expected to contain target analytes, laboratories should use a matrix spike and matrix spike duplicate pair.

8.4.2 A Laboratory Control Sample (LCS) should be included with each analytical batch. The LCS consists of an aliquot of a clean (control) matrix similar to the sample matrix and of the same weight or volume. The LCS is spiked with the same analytes at the same concentrations as the matrix spike. When the results of the matrix spike analysis indicate a potential problem due to the sample matrix itself, the LCS results are used to verify that the laboratory can perform the analysis in a clean matrix.

8.4.3 See Method 8000, Sec. 8.0 for the details on carrying out sample quality control procedures for preparation and analysis.

8.5 It is recommended that the laboratory adopt additional quality assurance practices for use with this method. The specific practices that are most productive depend upon the needs of the



availability and the nature of the samples. Whenever possible, the laboratory should analyze standard reference materials and participate in relevant performance evaluation studies.

9.0 METHOD PERFORMANCE

9.1 The following performance data have been generated under the conditions described in this method:

9.1.1 The calibration curve for Method 8032 has been found to be linear over the range 0-5 µg/L of acrylamide monomer.

9.1.2 In previous analyses, the limit of detection for an aqueous matrix has been found to be 0.032 µg/L.

9.1.3 The yields of the brominated compound have been found to be $85.2 \pm 3.3\%$ and $83.3 \pm 0.9\%$, at fortification concentrations of 1.0 and 5.0 µg/L, respectively.

9.2 Table 1 provides the recoveries of acrylamide monomer from river water, sewage effluent, and sea water.

9.3 The recovery of the bromination product as a function of the amount of potassium bromide and hydrobromic acid added to the sample is shown in Figure 2.

9.4 The effect of the reaction time on the recovery of the bromination product is shown in Figure 3. The yield was constant when the reaction time was more than 1 hour.

9.5 Figure 4 shows the recovery of the bromination product as a function of the initial pH from 1 to 7.35. The yield was constant within this pH range. The use of conventional buffer solutions, such as sodium acetate - acetic acid solution or phosphate solution, caused a significant decrease in yield.

10.0 REFERENCES

1. Hashimoto, A., "Improved Method for the Determination of Acrylamide Monomer in Water by Means of Gas-Liquid Chromatography with an Electron-Capture Detector", *Analyst*, 101:932-938, 1976.

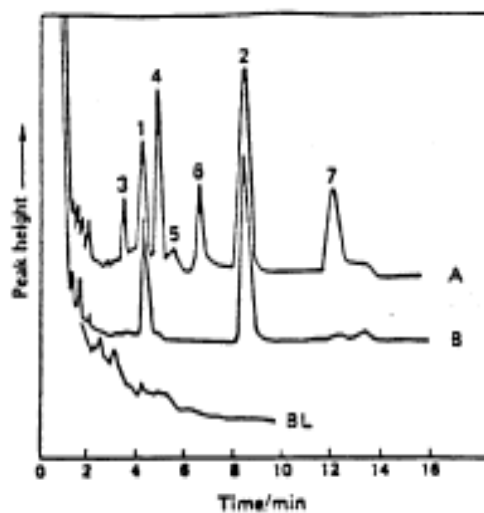
TABLE 1
RECOVERY OF ACRYLAMIDE FROM WATER SAMPLES AS 2,3-DIBROMOPROPIONAMIDE

Sample Matrix	Acrylamide Monomer Spiked/ μ g	Amount of 2,3-DBPA ^a / μ g Calculated	Found ^b	Bromination Recovery % ^b	Recovery of Acrylamide Monomer (%) ^b	RSD (%)
Standard	0.05	0.162	0.138	85.2	-	3.3
	0.20	0.649	0.535	82.4	-	1.0
	0.25	0.812	0.677	83.3	-	0.9
River Water	0.20	0.649	0.531	81.8	99.4	2.5
Sewage Effluent	0.20	0.649	0.542	83.5	101.3	3.0
Seawater	0.20	0.649	0.524	80.7	98.8	3.5

^a 2,3-Dibromopropionamide

^b Mean of five replicate determinations

FIGURE 1



Typical gas chromatograms of the bromination product obtained from aqueous acrylamide monomer solution:

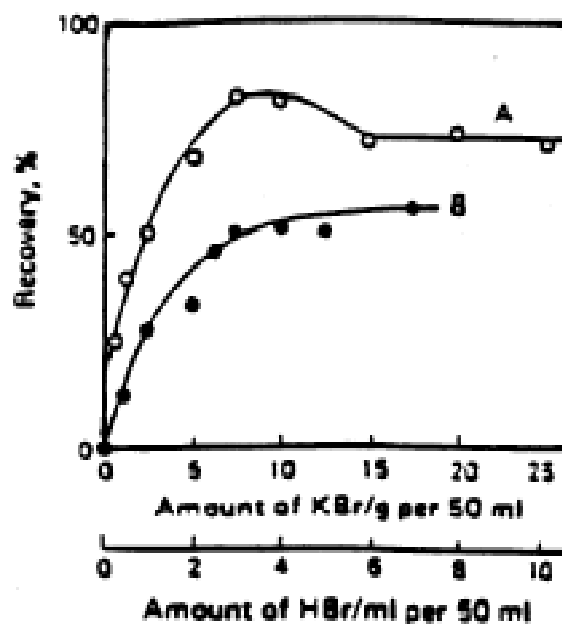
- A. Untreated
- B. With Florisil cleanup
- BL. Chromatogram of blank, concentrated five-fold before gas chromatographic analysis.

Peaks:

- 1. 2,3-Dibromopropionamide
- 2. Dimethyl phthalate
- 4-7. Impurities from potassium bromide

Sample size = 100 mL; acrylamide monomer = 0.1 μ g

FIGURE 2

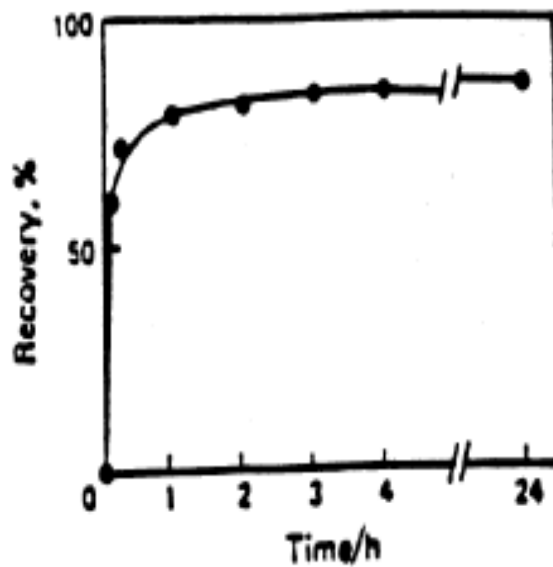


Effect of (A) potassium bromide and (B) hydrobromic acid on the yield of bromination.

Sample size = 50 mL;

Acrylamide monomer = 0.25 μ g

FIGURE 3



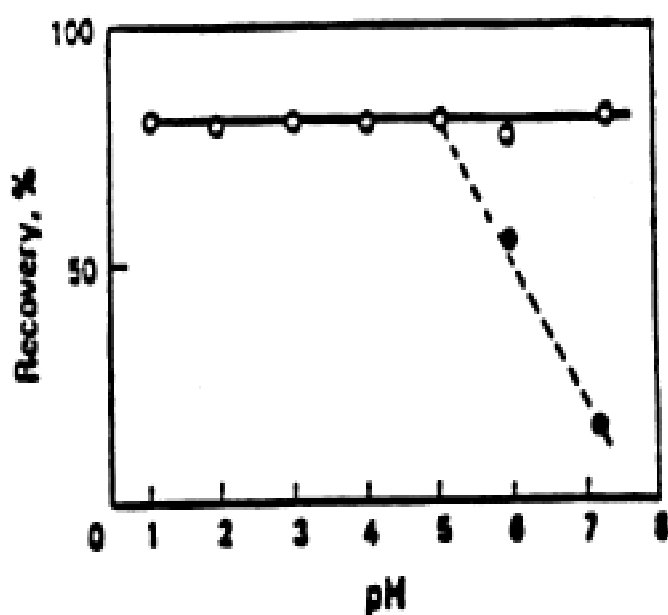
Effect of reaction time on the bromination. Reaction conditions:

50 mL of sample;
0.25 μg of acrylamide monomer;
7.5 g of potassium bromide;
2.5 mL of saturated bromine water

Extraction conditions:

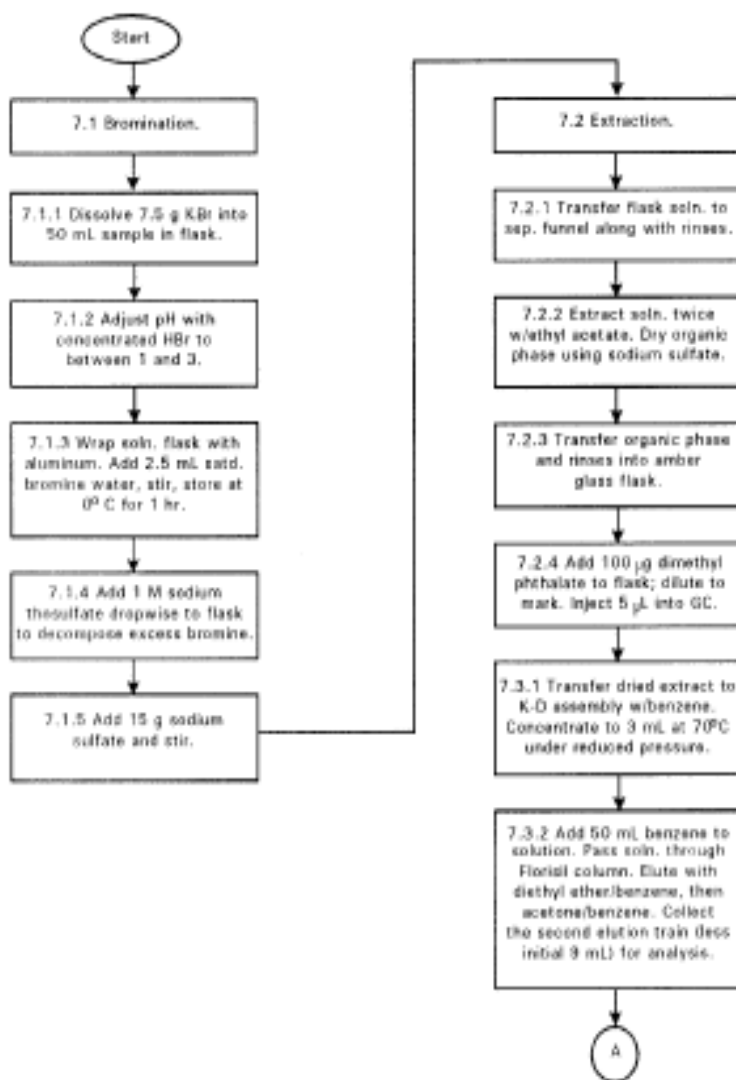
15 g of sodium sulfate;
extraction at pH 2;
solvent = 10 mL of ethyl acetate (X2)

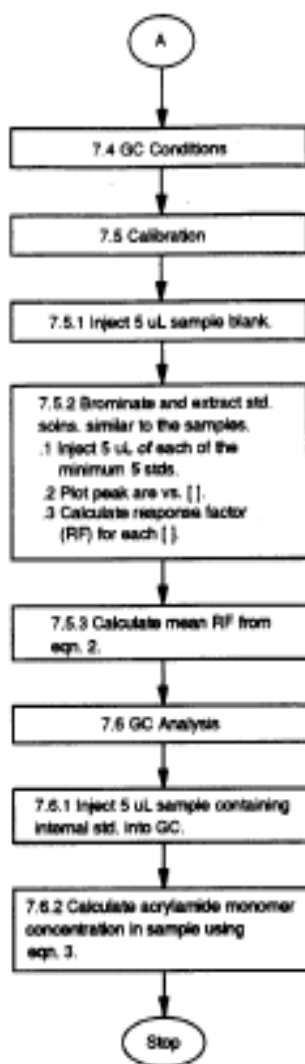
FIGURE 4



Effect of initial pH on the bromination. Reaction and extraction conditions as in Figure 3. The pH was adjusted to below 3 with concentrated hydrobromic acid, and to 4 - 5 with dilute hydrobromic acid. Reaction at pH 6 was in distilled water. A pH of 7.35 was achieved by careful addition of dilute sodium hydroxide solution. The broken line shows the result obtained by the use of sodium acetate - acetic acid buffer solution.

METHOD 8032A
ACRYLAMIDE BY GAS CHROMATOGRAPHY



METHOD 8032A
continued

**ANEXO 4: RESULTADO DE CONCENTRACIONES DE ACRILAMIDA EN EL CAFÉ INSTANTÁNEO**

Marca	Descripción de la muestra	Lote	Parámetro	Método	Resultado	Condiciones ambientales
Muestra 1	Instantáneo	20180968	Acrilamida (mg/kg)	EPA 8032a	< 0,02	23.2 ° C 48%HR
Muestra 2	Instantáneo	20180862			< 0,02	
Muestra 3	Instantáneo	80610681			< 0,02	
Muestra 4	Instantáneo	81020681			< 0,02	
Muestra 5	Instantáneo	230818			< 0,02	
Muestra 6	Instantáneo	260318			< 0,02	
Muestra 7	De pasar	1508518			< 0,02	
Muestra 8	De pasar	902218			< 0,02	
Muestra 9	De pasar	s/lote			< 0,02	
Muestra 10	De pasar	s/lote			< 0,02	
Muestra 11	De pasar	182518			< 0,02	
Muestra 12	De pasar	3C4418			< 0,02	



ANEXO 5: REPORTE DEL LABORATORIO

LABOLAB

ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES
INFORME DE RESULTADOS

Orden de trabajo N° 189053
Hoja 1 de 1

NOMBRE DEL CLIENTE: Fabiola Uday
DIRECCIÓN: Cordillera del Cóndor y Abdón Calderón
ANÁLISIS: Acrilamida
MUESTRA: **Café instantáneo en polvo "Colcafé" Muestra 1**
DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA: Polvo color café
FECHA DE RECEPCION: 10 de diciembre del 2018
FECHA DE ELABORACION: 19 de julio del 2018
FECHA DE VENCIMIENTO: 19 de julio del 2020
LOTE: 2018 0968
ENVASE: Frasco de vidrio 170 g
TOMA DE MUESTRA: Por cliente
FECHA DE REALIZACIÓN DE ENSAYO: 10 - 18 de diciembre del 2018
FECHA DE EMISION DEL ANALISIS: 18 de diciembre del 2018
CONDICIONES AMBIENTALES: 23.2°C 48%HR

PARÁMETRO	METODO	RESULTADO
Acrilamida (mg/kg)	EPA 8032a modificado cromatografía de gases con MSD	< 0.02

Dra. Cecilia Luzuriaga
GERENTE GENERAL
LABOLAB
ANÁLISIS DE ALIMENTOS, AGUAS Y AFINES

El presente informe es válido sólo para la muestra analizada.
Este informe no debe reproducirse más que en su totalidad previa autorización escrita de LABOLAB.

INFORME TÉCNICO, FICHA DE ESTABILIDAD, INFORMACIÓN NUTRICIONAL PARA NOTIFICACION SANITARIA

Análisis físico, químico, microbiológico, entomológico de: alimentos, aguas, bebidas, materias primas, balanceados, cosméticos, pesticidas, suelos, metales pesados y otros
Fco. Andrade Marín E7-29 y Diego de Almagro Telf.: 2563-225 / 2561-350 / 3238-503/ 3238-504 Cel.: 099 959 0412 / 099 944 2153 / 098 700 1591
E-mails: secretaria@labolab.com.ec / servicioalcliente@labolab.com.ec / ceciliacruzuriaga@labolab.com.ec / informes@labolab.com.ec

www.labolab.com.ec

Quito - Ecuador