



Validación de una metodología de extracción,
identificación y cuantificación de PhIP en muestras
de orina de voluntarios sanos mediante HPLC-MS

Presentada para la obtención del título
Magíster en Ciencia y Tecnología de los Alimentos
por
Lic. María Florencia Brioni
2015

Universidad Nacional de Córdoba
Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos
(ISIDSA)
Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC) -
CONICET
Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP)

Trabajo realizado en:

Universidad Nacional de Córdoba

Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos
(ISIDSA)

Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC) -
CONICET

Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP)

Directora de tesis

Dra. Romina Di Paola Naranjo

Co-directora de tesis

Dra. Sonia Muñoz

Comisión de tesis

Dra. Liliana Ryan

Dr. Celso Camusso

Dra. Soledad Cerutti
Evaluador externo

DEDICATORIA

Dedico este trabajo final de tesis, especialmente, a mi mamá Norma y mi papá Carlos, dos personas fundamentales en mi vida, quienes con sus valores, amor y cariño hicieron de mí la persona que soy. Mi mamá apoyándome, acompañándome y aconsejándome día a día en todas mis decisiones; y mi papá, mi ángel de la guarda, quien se que me cuida y protege en todo momento.

A mi abuela, Mamé, mi segunda mamá, quien junto a mi papá es una estrella que me protege, guía e ilumina.

A mis hermanos, Juan Pablo, Federico, Belén y Luz, quienes algunos desde la distancia, otros estando muy cerca, permanecen siempre a mi lado en todos los momentos, ayudándome a recorrer distintas etapas de nuestra vida, y porque gracias a su incondicionalidad logré muchos de mis objetivos propuestos.

A Emilio, con quien comparto mi vida y a quien le dedico gran parte de este trabajo, ya que gracias a su cariño, compañía, amor y principalmente gracias a su comprensión logre culminar una etapa tan importante de mi vida. Es y será un soporte fundamental, por lo cual le estoy eternamente agradecida.

A mis amigas de toda la vida, Geraldine, Antonella, Estefanía, Sol, Julia, Mariana y Paola, quienes me han escuchado, aconsejado y han compartido a mi lado diferentes situaciones de la vida, y principalmente me han dado su mano permitiendo afrontar los momentos más duros junto a su compañía.

AGRADECIMIENTOS

Son muchas las personas que contribuyeron a la realización de la presente tesis y a quienes estoy profundamente agradecida.

A la Dra. Romina Di Paola Naranjo y a la Dra. Sonia Muñoz, por ser quienes me aconsejaron, guiaron, compartieron sus conocimientos conmigo, y gracias a su dedicación y generosidad permitieron realizar el presente trabajo de tesis bajo su tutoría.

Al Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP), al Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicios en Alimentos (ISIDSA) y al Instituto de Ciencia y Tecnología de los Alimentos Córdoba (ICYTAC)-CONICET por permitirme utilizar sus instalaciones.

Un agradeciendo especial al (INQUISAL)-Instituto de Química de San Luis-(CCT - CONICET - San Luis), a Soledad Cerutti y Romina Canales, por brindarme generosamente la posibilidad de utilizar tanto el equipo UHPLC-MS como sus instalaciones.

Al SECYT por brindarme los subsidios necesarios para llevar a cabo, durante estos años, dicho proyecto de tesis.

A la Lic. Gabriela Reartes quien colaboró con las muestras de orina necesarias para la realización de este trabajo.

A mis amigos y compañeros de laboratorio en CEQUIMAP, especialmente a las Dra. Silvia Pesce y Dagna Mazzoni por su gran predisposición y respeto en concederme los tiempos necesarios para cumplimentar las diferentes etapas de esta maestría.

A Geraldine Cheminet y Eugenia Ghibaudó, grandes amigas y consejeras, por su fundamental compañía en cada momento que las necesité.

Finalmente quiero agradecer a mis compañeros de maestría, con quienes transite dos largos años de estudio, clases, trabajos, como así también reuniones, paseos y hermosos recuerdos compartidos.

TABLA DE CONTENIDO

I.	Introducción	1
1	Dieta y Salud.....	1
2	Aminas heterocíclicas	3
2.1	<i>Antecedentes</i>	3
2.2	<i>Formación de las aminas heterocíclicas</i>	5
2.2.1	Reacciones de Maillard	7
	Primera Fase o Etapa Inicial	7
	Segunda Fase o Etapa Avanzada.....	7
	Tercera Fase o Etapa Final	8
2.3	<i>Factores que afectan la formación de Aminas Heterocíclicas en alimentos</i>	9
2.3.1	Temperatura y tiempo de cocción.....	10
2.3.2	Método de cocción.....	10
2.3.3	Grado de cocción.....	11
2.3.4	Tipo de carne	11
2.4	<i>Clasificación de las Aminas Heterocíclicas en alimentos</i>	12
2.4.1	Según el mecanismo de generación y de sus precursores ...	12
2.4.2	Según el comportamiento químico	15
2.5	<i>Niveles de Aminas Heterocíclicas en alimentos</i>	16
2.6	<i>2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP)</i>	16
2.6.1	Metabolismo de la PhIP y enzimas involucradas	18
3	Biomarcadores de exposición.....	20

4	Determinación de PhIP en orina.....	21
4.1	<i>Métodos de extracción y purificación de PhIP</i>	22
4.2	<i>Métodos de detección y cuantificación de PhIP.</i>	23
4.3	<i>Efecto matriz</i>	28
II.	Objetivos.....	29
1	Objetivo General	29
2	Objetivos Específicos	29
III.	Materiales y métodos	30
1	Estándares y reactivos.....	30
2	Aparatos e instrumentos.....	30
	• <i>Balanza analítica</i>	30
	• <i>Centrífuga</i>	30
	• <i>Evaporador rotatorio</i>	31
	• <i>Baño termostatzado</i>	31
	• <i>UHPLC-MS(QTOF)</i>	31
	• <i>UHPLC-MS(QqQ)</i>	31
3	Muestras de orina	31
4	Determinaciones analíticas.....	34
4.1	<i>Condiciones cromatográficas UHPLC-MS(QTOF).</i>	34
4.2	<i>Extracción de PhIP a partir de muestras de orinas</i>	35
	Procedimiento de extracción 1	36
	Procedimiento de extracción 2	37
	Procedimiento de extracción 3	38
	Procedimiento de extracción 4	38

	Procedimiento de extracción 5	39
4.3	<i>Condiciones cromatográficas UHPLC-MS(QqQ)</i>	39
5	Validación del método analítico	41
5.1	<i>Precisión</i>	41
5.2	<i>Rango de linealidad</i>	42
5.3	<i>Límite de detección</i>	42
5.4	<i>Límite de cuantificación</i>	43
6	Análisis de datos	43
6.1	<i>Cálculo de efecto matriz (EM)</i>	43
6.2	<i>Cálculo de porcentaje de recuperación</i>	44
6.3	<i>Análisis estadístico</i>	44
IV	Resultados y discusión.....	45
1	Elección del procedimiento de extracción.....	46
1.1	<i>Procedimiento de extracción 1</i>	46
1.2	<i>Procedimiento de extracción 2</i>	49
1.3	<i>Procedimiento de extracción 3</i>	50
1.4	<i>Procedimiento de extracción 4</i>	51
1.5	<i>Procedimiento de extracción 5</i>	52
2	Determinación de PhIP por espectrometría de masas.....	55
3	Validación del método analítico	59
4	Determinación de PhIP en orinas de voluntarios sanos	60
V	Conclusiones.....	62
VI	Bibliografía.....	63

RESUMEN

Los seres humanos están constantemente expuestos a una amplia variedad de agentes químicos carcinógenos en su entorno. Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe una estrecha relación entre el estilo de vida y la incidencia del cáncer en los seres humanos. Se puede decir que entre el 70 % y el 80 % de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida, siendo la dieta el factor que contribuye en mayor proporción, con una incidencia entre un 35% y un 45%.

Entre los precursores del cáncer se encuentran sustancias que poseen carácter tóxico y que, mediante procesos químicos o enzimáticos, se forman en los alimentos durante las etapas de procesado, preparación y almacenamiento. Entre ellos, se destacan por ser cancerígenos reconocidos o potenciales, las aminas heterocíclicas.

La formación de aminas heterocíclicas en carnes cocidas depende fundamentalmente del tipo de carne, de la temperatura y el tiempo de cocción. Por lo tanto, las concentraciones de aminas pueden variar en gran medida de acuerdo a los tiempos prolongados de cocción y a las altas temperaturas.

En la actualidad, se sabe que la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina es con frecuencia la más abundante de las aminas heterocíclicas, y con mayor potencial carcinogénico.

Los niveles de excreción urinaria de aminas heterocíclicas, pueden servir como una aproximación para poder estimar la exposición de los seres humanos que consumen dietas sin restricciones a estos compuestos. Para evaluar el riesgo que supone la presencia de dichas aminas en los alimentos es imprescindible disponer de metodologías analíticas capaces de identificar y determinar estos compuestos en niveles de concentración muy bajos, del orden de los pg/mL.

Por este motivo, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una metodología de extracción, identificación y cuantificación de 2-amino-1-metil-6-

fenilimidazo [4,5-b] piridina, para determinar su presencia en orina de voluntarios sanos, en una población de la ciudad de Córdoba, con el fin de ser utilizada como biomarcador de exposición al consumo de carnes. Para alcanzar dicho objetivo, se contó con la colaboración de 6 voluntarios sanos, quienes debieron recolectar muestras de orina posterior a una dieta específica libre de dicho compuesto, así como después del consumo de carnes sometidas a distintos procesos de cocción.

En una primera instancia se consiguió optimizar un procedimiento de purificación selectiva de 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina a partir de las muestras de orinas, incluyendo una hidrólisis básica previa de la muestra. Asimismo, se logró desarrollar un método de identificación y cuantificación de dicha amina en orinas mediante cromatografía líquida acoplada a un espectrómetro de masas con detector de triple cuadrupolo, equipado con una fuente de ionización por electrospray.

Finalmente, el método validado permitió cuantificar 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina en las muestras de orinas recolectadas posteriormente a la ingestión de carnes cocidas, observando una mayor excreción en el primer periodo de recolección (0-6 hs), alcanzando niveles promedio de 1,6 y 0,3 ng/mL para ingesta de carnes con sobre-cocción y cocida a 70°C; respectivamente. Asimismo, la eliminación de la amina en el segundo periodo (6-12 hs) fue significativamente menor, alcanzando valores promedio de 1,2 y 0,1 ng/mL para ingesta de carnes con sobre-cocción y cocida a 70°C; respectivamente.

Este marco de trabajo contribuiría a caracterizar nuestra población de acuerdo a la susceptibilidad a distintos agentes relacionados con enfermedades como el cáncer.

Palabras Clave: aminas heterocíclicas, 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina, biomarcador, excreción urinaria, espectrometría de masas.

ABSTRACT

Humans are constantly exposed to a wide variety of chemical carcinogens in their environment. Several epidemiological studies have shown a close relationship between lifestyle and cancer incidence. Between 70% and 80% of human cancers are related to lifestyle, being the diet the mayor factor that contributes with an incidence between 35% and 45%.

The toxic derivatives belong to the group of precursors of cancer. These are toxic substances in nature and that, by chemical or enzymatic processes, are formed in foods during processing, preparation and storage steps. Among these substances, heterocyclic amines stand out as recognized or potential carcinogens.

The formation of heterocyclic amines in cooked meat depends mainly on the type of meat, temperature and cooking time. Therefore, concentrations of heterocyclic amines can vary according to prolonged cooking times and high temperatures.

Currently, it is known that 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine is often the most abundant heterocyclic and carcinogenic amine.

Urinary excretion levels of heterocyclic amines can serve as an approximation to estimate the exposure of humans consuming unrestricted diets of these compounds. To assess the risk posed by the presence of heterocyclic amines in foods it is essential to have analytical methods capable of identifying and determining levels of these compounds in very low concentrations such as pg/mL.

Therefore, the aim of this work was to develop a methodology for the extraction, identification and quantification of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine, to determine its presence in urine samples from Córdoba city, in order to be used as a biomarker of exposure to meat consumption. To achieve this objective, we had the collaboration of 6 healthy

volunteers who had to collect urine samples following a specific diet previous the ingestion of cooked meats.

In the first instance, it was possible to optimize a process for selective purification of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine from urine samples, including a previous basic hydrolysis of the sample. Also it was possible to develop a method for identification and quantification of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in urine by liquid chromatography coupled to a mass spectrometer, triple quadrupole detector equipped with a electrospray ionization source.

Finally, the validated method allowed to quantify 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine in urine samples collected after the ingestion of cooked meats, noting increased excretion in the first collection period (0-6 hours), reaching average levels of 1.6 and 0.3 ng / mL for intake of over-cooked meats and baked at 70 ° C; respectively. Also, excretion of the amine in the second period (6-12 hours) was significantly lower, reaching values of 1.2 and 0.1 ng / mL for overcooked meats and cooked at 70 ° C; respectively.

This work would help to characterize our population according to susceptibility to various agents related to diseases like cancer.

Keywords: heterocyclic amines, 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine, biomarker, urinary excretion, mass spectrometry.

LISTADO DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

°C: grados centígrados

μg: microgramo

μL: microlitro

μmol: micromol

4'-HO-PhIP: 2-amino-1-metil-6-(4'-hidroxi)-fenilimidazo [4,5-b] piridina

5-HO-PhIP: 2-amino-1-metil-6-(5-hidroxi)-fenilimidazo [4,5-b] piridina

70: 70°C

Ácido clorhídrico: HCl

AHs: aminas heterocíclicas

AIAs: aminoimidazoazarenos

APCI: ionización química a presión atmosférica

API: ionización a presión atmosférica

Ar: argón

C₃H₆O: acetona

CG: cromatografía gaseosa

CG -MS: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

CID: disociación inducida por colisión

Clean Up: procedimientos de limpieza

CV%: coeficiente de variación porcentual

EM: efecto matriz

ER: evaporador rotatorio

ESI: ionización por electrospray

eV: electrovoltios

g: gramo

h: hora

H₂O: agua

HCO₂H: ácido fórmico

HONHPhIP: 2- hidroxiamino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina

HPLC: cromatografía líquida de alta resolución

HPLC-MS: cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IQ: 2-amino-3-metilimidazo (4,5-f) quinolina

ISIDSA: Instituto Superior de Investigación, Desarrollo y Servicio en Alimentos

IT: trampa de iones

kg: kilogramo

KV: kilovoltios

L: litro

LC-MS: Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas

LD: límite de detección

LQ: límite de cuantificación

m/z: relación masa/carga

m: metro

M: molar

MeIQ: 2-amino-3,4-dimetilimidazo (4,5-f) quinolina

MeOH: metanol

mL: mililitro

mm: milímetro

mM: milimolar

MRM: multiplereactionmonitoring

MS/MS: espectrometría de masas en tándem

MS: espectrometría de masas

N: normal

NaOH: Hidróxido de sodio

N₂: nitrógeno

NAT: N-acetiltransferasas

NH₃: amoníaco

NH₄OH: hidróxido de amonio

nm: nanómetro

P1: primer periodo

P2: segundo periodo

PAHs: hidrocarburos aromáticos policíclicos

PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina

ppb: partes por billón

ppm: partes por millón

ppt: partes por trillón

Q: cuadrupolos de barras

QqQ: triple cuadrupolo

Q-TOF: cuadrupolo-TOF

RM: reacción de Maillard

RP-HPLC: cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa

rpm: revoluciones por minuto

S/R: relación señal ruido

s: segundo

SC: sobrecocción

SD: desviación estándar

SPE: extracción en fase solida

SULT: sulfotransferasas

T°: temperatura

TOF: tiempo de vuelo

TR: tiempo de retención

UGT: glucoronosiltransferasas difosfato de uridina

UHPLC-MS-MS: cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem.

UHPLC: cromatografía líquida de ultra resolución

UHPLC-MS: cromatografía líquida de ultra resolución acoplada a espectrometría de masas.

UV: ultravioleta

UV-Vis: ultravioleta-visible

v/v: volumen en volumen

Zn: zinc

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Estructura química de aminas heterocíclicas	4
Figura 2: Esquema general de la Reacción de Maillard	6
Figura 3: Fases o etapas de la Reacción de Maillard.....	9
Figura 4: Formación de los aminoimidazoazarenos (AIA).....	14
Figura 5: Aminoimidazoazarenos (AIA) y carbolinas.....	15
Figura 6: Estructura química de PhIP	16
Figura 7: Formación de la PhIP a partir de fenilalanina y creatinina.....	17
Figura 8: Principales vías metabólicas de PhIP en animales de laboratorio y humanos	19
Figura 9: Ionización por electrospray (ESI).....	25
Figura 10: Esquema general de un sistema de MS/MS	27
Figura 11: Curva de calibración externa de PhIP utilizando UHPLC-MS(QTOF).....	45
Figura 12: Procedimiento de extracción 1	46
Figura 13: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (--) y estándar externo de PhIP de 50 ng/mL (----).	47
Figura 14: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (--), orina fortificada con PhIP de 10 ng/mL (----), 50 ng/mL (----), 100 ng/mL (--) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (----).	47
Figura 15: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (--), orina fortificada con 60 ng/mL (----) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (----).	49
Figura 16: Procedimiento de extracción 2	49

Figura 17: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP de 50 ng/mL (----) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (----).	50
Figura 18: Procedimiento de extracción 3	50
Figura 19: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP de 50 ng/mL (----) y estándar de PhIP de 50 ng/mL(----).	51
Figura 20: Procedimiento de extracción 4	52
Figura 21: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (----) y estándar de PhIP de 10 $\mu\text{g/mL}$ (---).	52
Figura 22: Procedimiento de extracción 5	53
Figura 23: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (----) y solución estándar de PhIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (----).	54
Figura 24: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco sometidas a hidrólisis básica (----) e hidrólisis ácida (----).	54
Figura 25: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina fortificada con PhIP 10 ng/mL (----), 50 ng/mL (----), 200 ng/mL (----), 1000 ng/mL (----), 5000 ng/mL (----) y 10000 ng/mL (----).	55
Figura 26: Curva de calibración PhIP en orina utilizando UHPLC-MS(QTOF).....	56
Figura 27: Curva de calibración externa de PhIP utilizando UHPLC-MS(QqQ).....	57
Figura 28: Cromatogramas de estándar de PhIP 25 pg/mL (----), 50 pg/mL (----), 100 pg/mL (----), 250 pg/mL(----), 500 pg/mL(----), 1000 pg/mL(---), 2000 pg/mL(----), 4000 pg/mL(----).	58

Figura 29: Curva de calibración PhIP en orina blanco utilizando detector de MS(QqQ)..... 58

Figura 30: Cromatogramas de orina fortificada con PhIP 25 pg/mL (----), 50 pg/mL (----), 100 pg/mL (----), 250 pg/mL(----), 500 pg/mL(----), 1000 pg/mL(----), 2000 pg/mL(----). 59

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Muestras de orina de voluntarios sanos utilizadas en el estudio.	34
Tabla 2: Gradiente cromatográfico UHPLC-MS(QTOF).....	35
Tabla 3: Gradiente cromatográfico UHPLC-MS(QqQ).....	40
Tabla 4: Ion molecular y productos de fragmentación de PhIP.....	41
Tabla 5: Concentración de PhIP encontrada en orina de voluntarios sanos, previa ingesta de carne con sobre-cocción (SC). Valores promedios de 4 determinaciones (n.d.= no determinado).....	61
Tabla 6: Concentración de PhIP encontrada en orina de voluntarios sanos, previa ingesta de carne con cocción a 70°C. Valores promedios de 4 determinaciones (n.d.= no determinado).....	61

I. INTRODUCCIÓN

1 DIETA Y SALUD

Los seres humanos están constantemente expuestos a una amplia gama de agentes químicos carcinógenos en su entorno. Estudios epidemiológicos han demostrado que existe una estrecha relación entre el estilo de vida y la incidencia del cáncer en los seres humanos. Se puede decir que entre el 70 % y el 80 % de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida, siendo la dieta el factor que contribuye en mayor proporción, con una incidencia entre un 35% y un 45% (Kidd *et al.*, 1999; Weisburger, 2000).

Nuestra dieta comprende mezclas complejas de compuestos, macronutrientes y micronutrientes, de sustancias orgánicas e inorgánicas que, mientras algunos de ellos cumplen con las exigencias nutricionales, proporcionando sustento, energía, y desempeñando un importante papel en el desarrollo, modulación y prevención de enfermedades, otros pueden constituir un riesgo para la salud (Skog, 2002). Asimismo, el efecto de la dieta puede variar en función del tipo de alimento, del modo de cocción, de su valor nutricional y de su composición.

En Argentina, especialmente en la provincia de Córdoba, la población se caracteriza por tener un perfil alimentario en el que se incluye un alto consumo de proteínas y grasas animales, provenientes principalmente de las carnes rojas; una baja ingesta de fibras y pescados; y estilos de cocción característicos como por ejemplo, fritura, a la plancha, al horno y a la parrilla, los cuales permiten la formación de costra tostada muy atractiva en la superficie de los alimentos (Navarro *et al.*, 2004).

Entre los iniciadores del cáncer se encuentran los llamados tóxicos derivados, es decir, sustancias que poseen carácter tóxico y que, mediante procesos químicos o enzimáticos, se forman en los alimentos durante las etapas de procesado, preparación y almacenamiento. Entre los tóxicos derivados se

I. Introducción

incluyen un número importante de compuestos originados en tratamientos a temperaturas elevadas. Entre ellos, se destacan, por ser cancerígenos reconocidos o potenciales, las aminas heterocíclicas (AHs) (Martin Calero, 2009).

El proceso de oncogénesis es la mutación de una célula que, de esta forma, adquiere las características de las células tumorales, siendo una de las más importantes la capacidad de proliferar desordenadamente de forma irreversible (Martin Calero, 2009). Las sustancias carcinógenas pueden actuar ya sea induciendo lesiones mutagénicas en las células, o bien estimulando el desarrollo del cáncer ya iniciado, es decir, actuando como promotores. Los carcinógenos pueden ser o no nutrientes, ya que en ocasiones están presentes en los alimentos pero carecen de valor nutritivo.

Al hacer referencia a los mutágenos presentes en los alimentos hay que indicar que los mismos pueden provenir de distintas fuentes; pueden ser de origen natural como por ejemplo, las micotoxinas, las hidracinas y algunos alcaloides y flavonoides; pueden encontrarse en los alimentos como resultado de una contaminación de los mismos, como es el caso de los pesticidas, herbicidas o disolventes; o bien, podemos mencionar una tercera categoría de compuestos genotóxicos entre los que se pueden citar las nitrosaminas, las nitrosoamidas, los hidrocarburos aromáticos policíclicos y las aminas heterocíclicas, los cuales son productos que se generan durante el procesado y cocción de los alimentos. Los compuestos pertenecientes a esta tercera categoría presentan una característica especial que los diferencia de otros contaminantes alimentarios, y es que para minimizar el riesgo de ingesta de los mismos puede ser necesario modificar algunos de los hábitos culinarios de la población o bien los procedimientos de preparación industrial de algunos alimentos (Galceran, 2001). Por lo tanto podemos decir que la dieta constituye un vehículo de entrada en el organismo de diferentes compuestos con capacidad para influir sobre el desarrollo del cáncer, algunos de ellos comportándose como carcinógenos y otros como anticarcinógenos (Martin Calero, 2009).

I. Introducción

Como se mencionó anteriormente, entre el 70 y el 80 % de los cánceres humanos están relacionados con el estilo de vida, siendo la dieta el factor que contribuye en mayor proporción, y sólo una pequeña proporción de cánceres tiene un origen exclusivamente genético. Sin embargo, se sabe que los factores genéticos pueden modificar el grado de asociación entre la dieta y cáncer, influyendo en la susceptibilidad individual (Martin Calero, 2009).

Por lo tanto, se puede decir que uno de los aspectos más relevantes para la evaluación de la importancia de las AHs en la etiología del cáncer es el establecimiento de la ingesta diaria de estos compuestos, a partir de datos de consumo y de niveles de concentración (Toribio, 2003).

Actualmente se dispone de Guías Alimentarias para la Población Argentina, las cuales recomiendan un equilibrio en el consumo de los diferentes grupos de alimentos, sin embargo las mismas no especifican características en cuanto a tiempo y métodos de cocción, fundamental a la hora de minimizar la ingesta de los mismos.

2 AMINAS HETEROCÍCLICAS

2.1 *Antecedentes*

En el año 1975, Bruce N. Ames describió un sencillo test que permitía cuantificar, de manera rápida y económica, la actividad mutagénica de sustancias mediante el uso de bacterias (*Salmonella typhimurium*), conocido como test de Ames (Toribio, 2003).

Poco tiempo después del desarrollo de dicho test , científicos empezaron a investigar la mutagenicidad del humo de tabaco, el cual se sabía que era una de las principales causas de cáncer en seres humanos. El estudio estructural de las moléculas orgánicas derivadas de la pirólisis del tabaco reveló la presencia de varios tipos de agentes cancerígenos, incluyendo algunos hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) (Toribio, 2003).

I. Introducción

Luego que se confirmara la presencia de aminas aromáticas en el humo del tabaco, se empezó a evaluar la posibilidad de que el humo originado durante el cocinado de alimentos también pudiera presentar actividad mutagénica. En el año 1977, finalmente se confirmó esta hipótesis cuando Sugimura y col. analizaron las partículas retenidas en un filtro de fibra de vidrio a través del cual se había hecho pasar el humo desprendido durante el asado de sardinas. Los compuestos aislados resultaron tener propiedades básicas y una estructura aromática con heteroátomos, por lo que fueron denominados AHs.

Hasta la fecha, se han aislado y caracterizado más de 25 AHs como potentes mutágenos. Todas ellas contienen de dos a cinco anillos aromáticos condensados con uno o más átomos de nitrógeno y, generalmente, un grupo amino exocíclico (Figura 1) (Martin Calero, 2009).

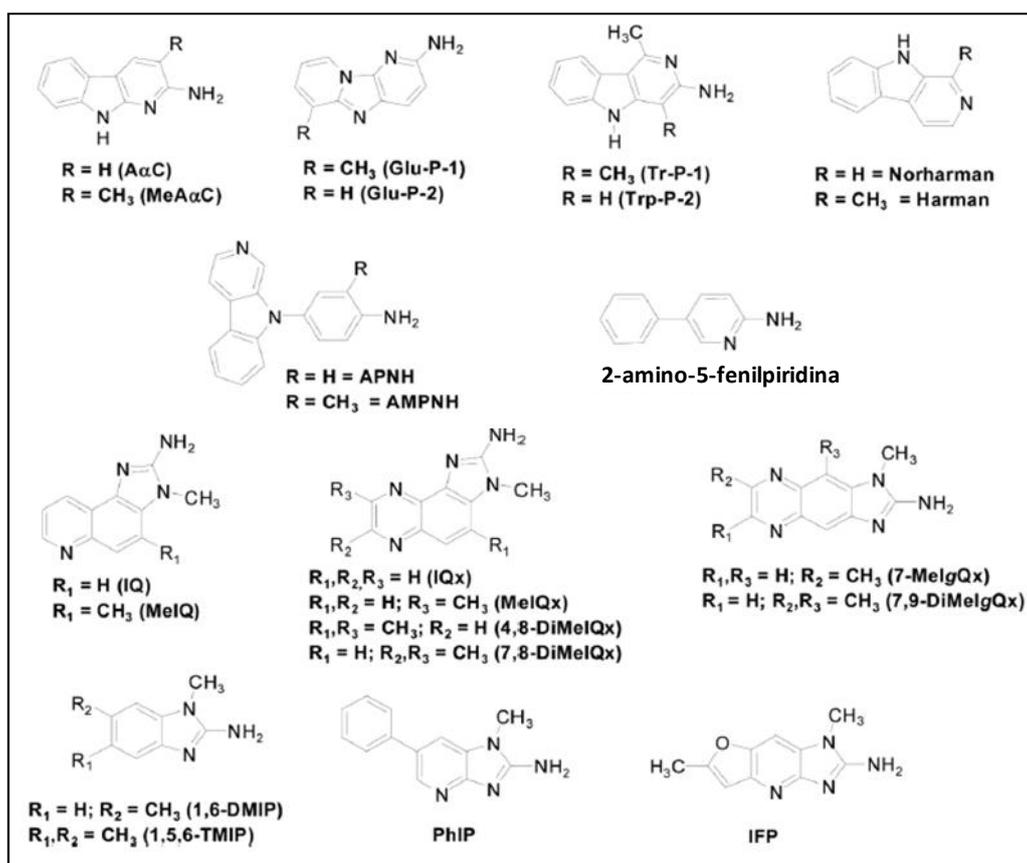


Figura 1: Estructura química de aminas heterocíclicas

2.2 *Formación de las aminas heterocíclicas*

La formación de las AHs durante el procesado industrial y/o culinario de los alimentos cárnicos puede estar influida por algunos factores composicionales, como la creatinina presente en el tejido muscular, la grasa o el agua, así como los azúcares y los aminoácidos (Galceran, 2001).

El agua y los lípidos que contienen los alimentos también tienen importancia en la generación de compuestos mutagénicos dado que durante el proceso de cocción los precursores solubles en agua migran junto con ésta a la superficie de los alimentos donde son expuestos a temperaturas relativamente altas que favorecen la reacción de formación de los mismos.

Además de la composición, la aparición de estos contaminantes en el tratamiento térmico de los alimentos proteicos está influida por otros factores, como por ejemplo el material en el que se lleva a cabo el tratamiento, el tiempo, la temperatura y el tipo de cocción (Galceran, 2001).

El tratamiento térmico es uno de los procesos más ampliamente utilizado en la preparación de los alimentos, tanto en la industria alimentaria como en el hogar. La forma en la que el alimento es procesado, directamente sobre el fuego, hervido, asado, frito, etc., así como la temperatura y la duración del mismo influyen drásticamente sobre los cambios químicos y la naturaleza de los productos originados. En este proceso, los constituyentes de los alimentos experimentan una serie de reacciones, muchas de las cuales son responsables del aroma, color, textura y sabor, pero otras están asociadas con la generación de compuestos potencialmente tóxicos (Gema Arribas, 2013).

Por lo tanto, durante la cocción de la carne no solo se mejoran sus cualidades organolépticas, ya que los alimentos se oscurecen, tomando un aspecto muy atractivo visualmente; sino que también se generan sustancias agradables tanto en olor como en sabor. Las reacciones que dan lugar a este proceso, se denominan reacciones de Maillard (RM) o reacciones de oscurecimiento no enzimático, en las que se forman melanoidinas coloreadas,

que van desde el amarillo claro hasta el marrón muy oscuro; además de diferentes compuestos aromáticos.

Para que las transformaciones tengan lugar, son necesarios, un grupo carbonilo de un azúcar reductor, cetosa o aldosa, y un grupo amino libre, proveniente de un aminoácido o una proteína. Dichas reacciones se producen principalmente en las partes más superficiales de los alimentos, donde más bajo es el contenido de agua y más elevada la temperatura (Toribio, 2003).

La RM puede ocurrir durante el calentamiento de los alimentos o durante el almacenamiento prolongado. Los productos mayoritarios de estas reacciones son moléculas cíclicas y policíclicas que, además de aportar sabor y aroma a los alimentos, también pueden ser cancerígenas. En algunos pasos de la reacción se forman pirazinas, quinoxalinas y pirido[3,4-d]imidazoles, quienes están involucradas en la formación de las AHs. Esta reacción se acelera con la temperatura de cocción y está influenciada por varios factores, tales como el pH, el tiempo de cocción, la presión, etc.; además, puede ser catalizada por la presencia de algunos metales. La variación de cualquiera de estos factores altera la velocidad y los productos finales de la reacción (Figura 2) (Martin Calero, 2009).

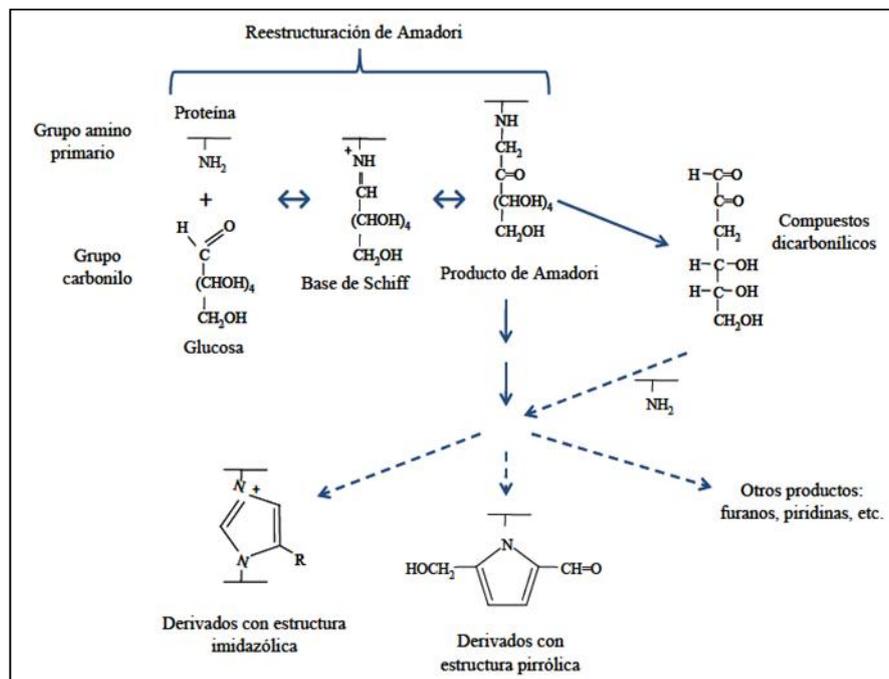


Figura 2: Esquema general de la Reacción de Maillard

2.2.1 Reacciones de Maillard

Primera Fase o Etapa Inicial

La primera etapa de la RM comienza con una reacción de condensación entre el grupo carbonilo, normalmente de un azúcar reductor, aunque también puede ser un compuesto carbonílico generado en la etapa intermedia de la RM o procedente de la oxidación lipídica; y un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína, originándose una base de Schiff (Figura 3). Por ciclación, la base de Schiff se transforma rápidamente en la glicosilamina N-sustituida correspondiente. Cuando la base de Schiff es una aldósilamina N-sustituida, se forma la 1-amino-1-deoxi-2-cetosa mediante la denominada reorganización de Amadori, siendo esta etapa irreversible. Sin embargo, cuando la molécula es una cetosilamina-N-sustituida se forma una 2-amino-2-deoxi-2-cetosa y se le conoce como reorganización de Heyns (Gema Arribas, 2013).

Segunda Fase o Etapa Avanzada

En la segunda fase o etapa avanzada, se produce la formación inicial de colores amarillos muy ligeros y de olores algo desagradables. En esta etapa los productos de Amadori y Heyns se descomponen dependiendo del pH, la actividad de agua, la presencia de metales divalentes o la temperatura, dando lugar a la formación de diferentes compuestos intermedios responsables del aroma que caracterizan a los alimentos cocinados. A pH neutro o ligeramente ácido, y en condiciones de baja actividad de agua, la reacción predominante es una enolización-1,2 que da lugar a la formación de furfural cuando el azúcar reductor implicado es una pentosa, o hidroximetilfurfural en el caso de una hexosa. Por el contrario, a pH básicos tiene lugar una enolización-2,3 formándose reductonas y una variedad de productos de fisión tales como acetol, piruvaldehído y diacetilo, todos ellos de gran reactividad, lo que hace que participen en nuevas reacciones con otros productos intermedios. El producto de Amadori puede degradarse también vía oxidativa hacia

compuestos carbonílicos (ruta de Namiki). Los compuestos dicarbonílicos producidos, mediante la degradación de Strecker pueden reaccionar con aminoácidos y dar lugar a la formación de aldehídos con un carbono menos, α -aminocetonas, y eliminación de CO_2 . Estos aldehídos también juegan un papel importante en el aroma y sabor de los alimentos cocinados (Figura 3) (Gema Arribas, 2013).

Tercera Fase o Etapa Final

En la tercera fase o etapa final, se produce la formación de los conocidos pigmentos oscuros, denominados melanoidinas. Engloban un gran número de reacciones que incluyen ciclaciones, deshidrataciones, reorganizaciones y condensaciones originando dos clases diferentes de compuestos: los compuestos aromáticos volátiles, siguiendo la vía paralela de Strecker, y las melanoidinas.

Las melanoidinas son polímeros coloreados producidos por reacciones de condensación de compuestos con grupos amino procedentes de las etapas intermedias de la RM, como pirroles N-sustituidos, 2-formilpirroles N-sustituidos, y 2-furaldehído. La estructura de las melanoidinas varía dependiendo de las condiciones en las que haya tenido lugar la reacción así como del tipo de alimento; además, poseen menor solubilidad que los productos de la RM de partida (Figura 3) (Gema Arribas, 2013).

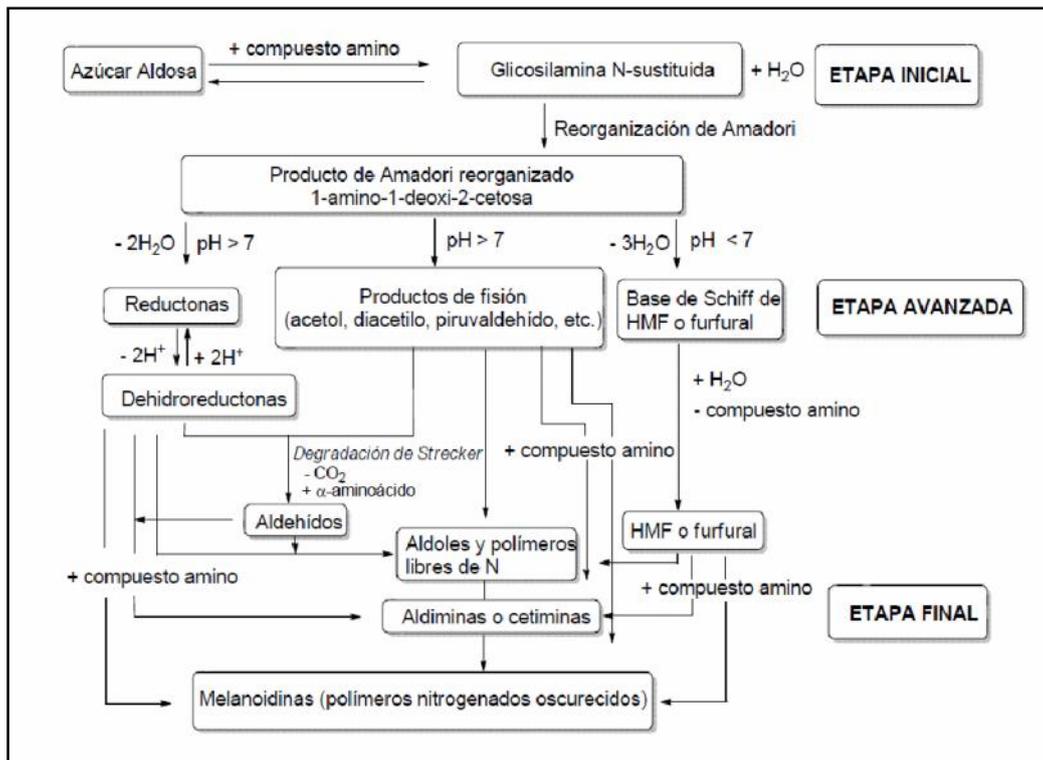


Figura 3: Fases o etapas de la Reacción de Maillard.

2.3 Factores que afectan la formación de Aminas Heterocíclicas en alimentos

Durante muchos años se han estudiado distintos factores que favorecen la generación de aminas mutagénicas durante el procesado térmico de la carne. Variables físicas como por ejemplo la temperatura, tiempo y método de cocción afectan significativamente a la actividad mutagénica de las muestras sometidas a distintos métodos de cocción.

Los contenidos de AHs específicas varían con el tipo de carne, método y grado de cocción. Otros factores dependientes del tipo de alimento son el pH, las concentraciones de precursores, la presencia de ciertos iones divalentes, el contenido de sustancias que favorecen o inhiben su formación, y el tipo de aminoácidos (Martin Calero, 2009).

Aunque el procesamiento de diversos tipos de alimentos sea similar, las cantidades de AHs generadas varían de acuerdo a la composición de aminoácidos, creatinina, y proteínas, que son los precursores de las mismas.

Algunos ejemplos de las AHs mutagénicas presentes en mayor proporción en los alimentos sometidos a procesamiento térmico son: piridoindole (amino-gamma-carbolina); 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinolina (IQ); 2-amino-3-metilimidazo [4,5-f] quinoxalina (IQx); 2-amino-3,4-dimetilimidazo [4,5-f] quinolina (MeIQ); 2-amino-3,8-dimetilimidazo [4,5-f] quinoxalina (MeIQx); 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP).

2.3.1 Temperatura y tiempo de cocción

La formación de las AHs depende en gran medida del tiempo y temperatura de cocción. La temperatura tiene una marcada influencia sobre la concentración de AHs en los alimentos. Se puede decir que a temperaturas inferiores a 150 °C, generalmente no se detecta la presencia de mutágenos, o bien los niveles encontrados de AHs son muy bajos, y a partir de este valor la cantidad de AHs aumenta progresivamente a medida que la misma se va incrementando, siendo este incremento no lineal para aminas como PhIP, AαC y las β-carbolinas.

Otro factor de gran influencia es la duración de la cocción, ya que cuanto más larga es, más elevado resulta ser el contenido de AHs. Con sólo 30 segundos de calentamiento se pueden llegar a formar cantidades detectables de AHs, para tiempos un poco mayores, y dependiendo de la temperatura de cocción, se alcanza un nivel máximo en la concentración de las AHs, después del cual la concentración se mantiene más o menos constante (Martin Calero, 2009).

2.3.2 Método de cocción

Es muy importante tener en cuenta el tipo de cocción, ya que la temperatura utilizada y el mecanismo de transmisión del calor son muy diferentes. En general, los tipos de cocinado que implican temperaturas alrededor de 100°C como por ejemplo hervir en agua, cocinar al vapor, no

generan agentes mutagénicos, o bien se generan en cantidades muy bajas, prácticamente no cuantificables. Otros tipos de cocción que calientan los alimentos mediante convección indirecta, como es el caso del horno convencional, producen niveles bajos de AHs, y con el uso de los hornos de microondas la cantidad de AHs formada es casi nula. En cambio, numerosas publicaciones han demostrado que los procesos en los que se produce un contacto directo entre la fuente de calor y el alimento, como freír o asar, son los que producen mayores niveles de mutágenos (Sinha *et al.*, 1998 (A); Sinha *et al.*, 1998 (B); Toribio, 2003; Martin Calero, 2009).

2.3.3 Grado de cocción

El grado de cocción es un aspecto clave en la producción de AHs y está muy relacionado con el color oscuro de la superficie de los alimentos y el tiempo total de cocción. Las carnes poco cocinadas, a temperaturas iguales o inferiores a 150°C muestran un contenido más bajo en mutágenos que las carnes muy cocinadas, a temperaturas superiores a 150°C. La parte interna de la carne muestra un contenido menor en AHs que la superficie. La formación de la corteza exterior al cocinar las carnes es el resultado de un transporte continuo de agua y compuestos disueltos como aminoácidos y creatinina, a la superficie o cerca de la superficie de la carne, donde la temperatura es más alta (Martin Calero, 2009).

2.3.4 Tipo de carne

La cantidad de AHs generadas en diversos tipos de alimentos es diferente aunque se hayan procesado de manera similar, esto se debe principalmente a diferencias en la composición tanto de aminoácidos, creatina, y proteínas, que son los precursores de las mismas.

La carne de pollo se conoce como carne blanca, mientras que las carnes de cerdo y vacuna se las conoce como carnes rojas. En la carne de pollo, la

principal diferencia es el contenido bajo en grasa, y los contenidos de aminoácidos, glucosa y creatinina, comparadas con las carnes rojas (Liu *et al.* 2005).

La cantidad de grasa desempeña un papel relevante, ya que hace más eficiente la transmisión del calor, lo que provoca un aumento de la mutagenicidad. Otro factor de influencia es el contenido en agua, ya que actúa como disolvente del medio de reacción (Martin Calero, 2009).

Los jugos de las carnes contienen, frecuentemente, cantidades similares de AHs y similar actividad mutagénica, que la carne por sí misma. Por lo tanto, también deben ser considerados como una fuente de compuestos mutagénicos en la dieta (Martin Calero, 2009).

2.4 Clasificación de las Aminas Heterocíclicas en alimentos

En el año 1993, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) consideró ocho de las AHs estudiadas (MeIQ, MeIQx, PhIP, A α C, MeA α C, Trp-P-1, Trp-P-2 y Glu-P-1) como posibles cancerígenos humanos (clase 2B) y a una de ellas (IQ) como un cancerígeno probable (clase 2A) y se recomendó reducir la exposición a estos compuestos. En el año 2004, IQ, MeIQ, MeIQx y PhIP fueron registrados en la *NTP 11th Report on Carcinogens* como posibles carcinógenos humanos.

Las AHs se clasifican según el mecanismo de generación y de sus precursores, y según su comportamiento químico.

2.4.1 Según el mecanismo de generación y de sus precursores

Dependiendo del mecanismo de generación y de sus precursores, las AHs se pueden clasificar en dos grandes grupos, las carbolinas y los aminoimidazoazarenos (AIAs). Ambas se forman a partir del calentamiento a

temperaturas elevadas de mezclas de creatina, creatinina y aminoácidos, abundantes en las carnes rojas y blancas.

- Aminas térmicas, tipo IQ o aminoimidazoarenos (AIAs): Se generan a partir de la reacción de aminoácidos libres, creatina, creatinina y hexosas, a temperaturas de cocción ordinarias, entre 100 y 300°C, y es por ello que se designan también como aminas térmicas. Estas aminas contienen en su estructura un grupo metilaminoimidazólico. Los mutágenos incluidos en este grupo (piridinas, quinolinas y quinoxalinas y furopiridinas) son los más frecuentemente encontrados en la carne cocinada, por lo tanto son los que contribuyen mayormente a la mutagenicidad de este tipo de alimentos. En el año 1983, Jägerstad y col. propusieron que las quinolinas y las quinoxalinas se formaban durante el calentamiento de creatinina, aminoácidos y azúcares reductores, lo que sugirió la participación de las reacciones de Maillard. Piridinas o pirazinas y aldehidos, generados en las reacciones de Maillard de azúcares y aminoácidos, se fusionan mediante una condensación aldólica con la creatinina, compuesto únicamente presente en tejidos animales. Dependiendo de la identidad del aminoácido, la quinolina o quinoxalina obtenida es diferente. Por ejemplo, en el caso de que la glicina reaccione con la hexosa, se formaría IQ o MeIQx, mientras que si el aminoácido es alanina, se obtendría MeIQ (Figura 4 y Figura 5) (Toribio, 2003).

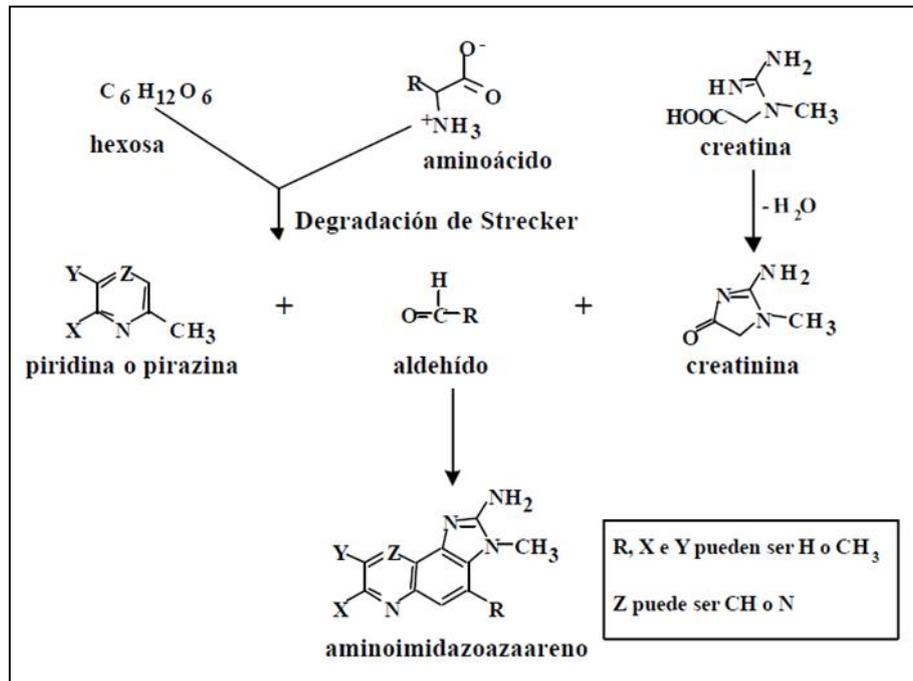


Figura 4: Formación de los aminoimidazoazarenos (AIA)

- Aminas pirolíticas o tipo no-IQ, Carbolinas: Las carbolinas se producen a temperaturas superiores a $300^\circ C$ por la pirólisis de aminoácidos y proteínas mediante una reacción radicalaria. Como se observa en la figura 5, estas aminas contienen en su estructura grupos piridoindol (Trp-P-1, Trp-P-2, AaC, MeAaC, harman, norharman) o piridoimidazol (Glu-P-1, Glu-P-2). Generalmente, estas AHs tienen un grupo amino primario unido a un anillo piridínico, el cual a su vez está fusionado con un indol o un imidazol. En esta subfamilia se incluyen la harman y la norharman, dos β -carbolinas que, aunque no son mutagénicas debido a la ausencia del grupo amino primario, poseen la capacidad de potenciar la mutagenicidad de algunas AHs. Estos comutágenos pueden incluso formar aductos con el ADN en presencia de otras aminas aromáticas no mutagénicas, como la anilina o la o-toluidina (Toribio, 2003).

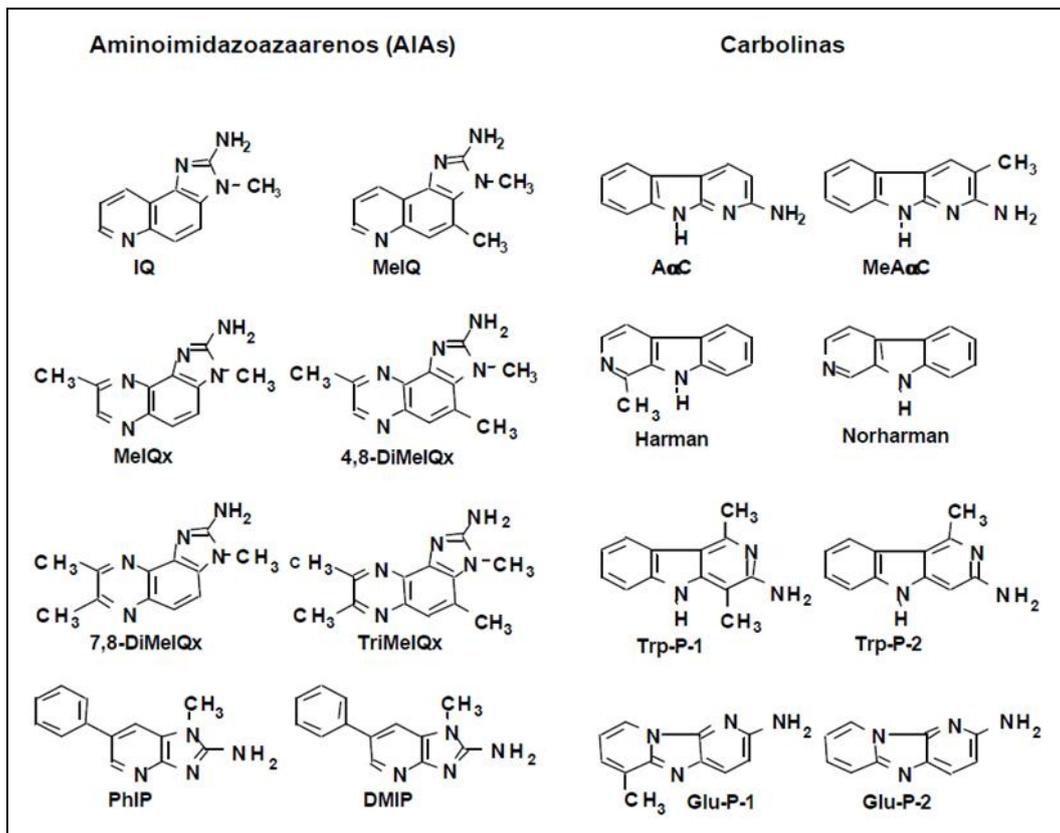


Figura 5: Aminoimidazoazarenos (AIA) y carbolinas

2.4.2 Según el comportamiento químico

De acuerdo con el comportamiento químico, estos compuestos se pueden agrupar como aminas polares (aminoimidazoazarenos junto con Glu-P-1 y Glu-P-2) y aminas no polares, entre las que se incluirán todas las restantes. Muchas de estas AHs han sido aisladas de alimentos proteicos incluyendo carnes y pescados cocinados, extractos de carne o aromatizantes y alimentos infantiles. También están presentes en café, bebidas alcohólicas, y en fuentes medioambientales, como los humos de cocción, humo de tabaco, aire, agua de río y lluvia. Además, algunas AHs han sido detectadas en tejidos humanos, pelo y fluidos biológicos, como plasma, orina o bilis, así como en leche de mujeres sanas (Martin Calero, 2009).

2.5 Niveles de Aminas Heterocíclicas en alimentos

Si bien los niveles de concentración son muy variados, generalmente oscilan entre los 0,1 y los 40 ng/g. Vale la pena señalar que los valores más elevados corresponden siempre a alimentos tratados a temperaturas altas y en algunos de estos casos, las concentraciones, especialmente para la PhIP, pueden alcanzar los 400 ng/g. Dependiendo del tipo de carne, de la temperatura y la duración de cocción, las concentraciones de AHs puede variar en más de 100 veces (Galceran, 2001).

También es interesante remarcar que las temperaturas relativamente bajas y los tiempos de cocción más largos, favorecen la presencia de las aminas en los residuos de la sartén, lo que es explicable por el transporte de los precursores de las aminas desde la carne a la sartén. En general, el compuesto más abundante y que se encuentra en mayor proporción en alimentos sometidos a procesamiento térmico es la 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP). En los demás casos, las aminas encontradas más frecuentemente y en mayor cantidad dependen del tipo de alimento (Galceran, 2001; Martin Calero, 2009).

2.6 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP)

PhIP, es una amina aromática que se genera por la cocción de alimentos ricos en proteínas a temperaturas elevadas y, su proporción varía según el tipo de carne y método de cocción empleado (Martin Calero, 2009).

La PhIP se encuentra dentro del grupo de AIAs, y como se observa en la figura 6, su estructura se caracteriza por contener un grupo 2-aminoimidazo y un anillo de piridina (Galceran, 2001).

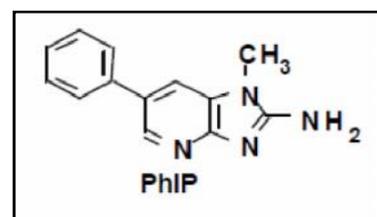


Figura 6: Estructura química de PhIP

La PhIP se origina por la condensación aldólica de fenilacetaldehído, producto de la degradación térmica de fenilalanina, con creatinina, como se observa en la figura 7.

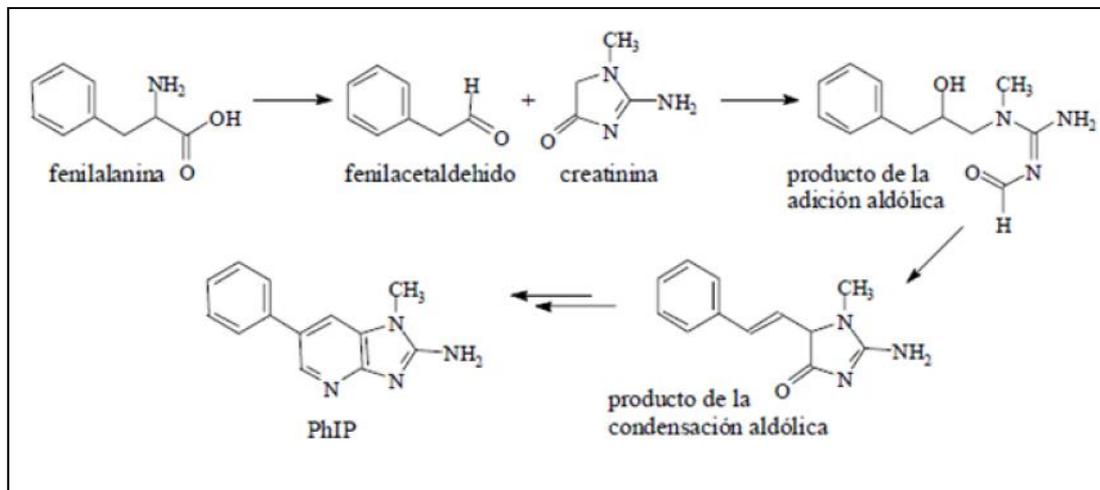


Figura 7: Formación de la PhIP a partir de fenilalanina y creatinina.

En cuanto a sus propiedades físico químicas se puede decir que PhIP se caracteriza por poseer un punto de fusión de 327-328°C, es una de las aminas más termolábil, comenzando su formación a partir de los 100 °C, es soluble en metanol y en dimetilsulfóxido, y en cuanto a su estabilidad, es estable en medios moderadamente ácidos y alcalinos (Toribio, 2003).

PhIP es la amina más susceptible a la degradación durante el calentamiento, y esta inestabilidad puede atribuirse principalmente a dos razones, a que contienen más dobles enlaces conjugados carbono-carbono, lo cual la hace más susceptible a cambios químicos que otras AHs y que contiene un anillo bencénico unido a un enlace simple de una cadena lateral, lo que le hace libre para rotar (Martin Calero, 2009).

Evidencias epidemiológicas demuestran que la exposición a AHs presentes en la dieta, es un factor de riesgo significativo para el desarrollo de cáncer. De las 25 AHs identificadas, PhIP es con frecuencia el compuesto más abundante (Kidd *et al.*, 1999; Toribio, 2003). Una de las principales características por la cual se destaca es por su alto potencial cancerígeno, siendo

los más frecuentes el cáncer colon rectal, páncreas, próstata, mama, ovario y endometrio (Toribio, 2003).

2.6.1 Metabolismo de la PhIP y enzimas involucradas

El metabolismo de PhIP ha sido ampliamente estudiado *in vitro* e *in vivo* tanto en animales de laboratorio como en seres humanos.

La PhIP es una amina susceptible de ser metabolizada mediante reacciones de biotransformación, de esta forma, se facilita su eliminación del organismo, evitando tanto su acumulación como potenciales efectos tóxicos.

El sistema citocromo P450 (1A1, 1A2 y 1B1) cataliza la oxidación del grupo amino exocíclico de PhIP para formar el metabolito genotóxico 2-hidroxiamino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (HONHPhIP). Este metabolito puede someterse a la conjugación por sulfotransferasas (SULT) o N-acetiltransferasas (NAT), para producir ésteres altamente reactivos que se unen al ADN, o bien, someterse a solvolisis para producir 2-amino-1-metil-6-(5-hidroxi) fenilimidazo [4,5-b] piridina (5-HOPhIP). Estos mismos P450 catalizan la oxidación en la posición 4' de PhIP para formar 2-amino-1-metil-6-(4'-hidroxi)-fenilimidazo [4,5-b] piridina (4'-HO-PhIP), un producto principal de desintoxicación de PhIP en roedores y primates no humanos. Sin embargo, P450 cataliza principalmente en humanos la formación de HONH-PhIP como el producto de oxidación mayor, la formación de 4'-HO-PhIP se produce a niveles considerablemente inferiores (Fede *et al.*, 2009).

La PhIP experimenta un extenso metabolismo por acción de glucuronosiltransferasas difosfato de uridina (UGT). Tanto PhIP y HONHPhIP pueden someterse a conjugación con la isoforma UGT1A1 para producir N2- Y N3- conjugados glucurónidos. La actividad de la UGT hacia PhIP y HONH-PhIP, se ha detectado en el hígado humano y muestras del colon. Los conjugados glucurónidos de HONH-PhIP han sido vistos como productos de desintoxicación, aunque glucuronidasas bacterianas pueden hidrolizar HON-

PhIP-N3-Gl para liberar HONH-PhIP para el metabolismo y la formación potencial de aductos de ADN (Figura 8) (Fede *et al.*, 2009).

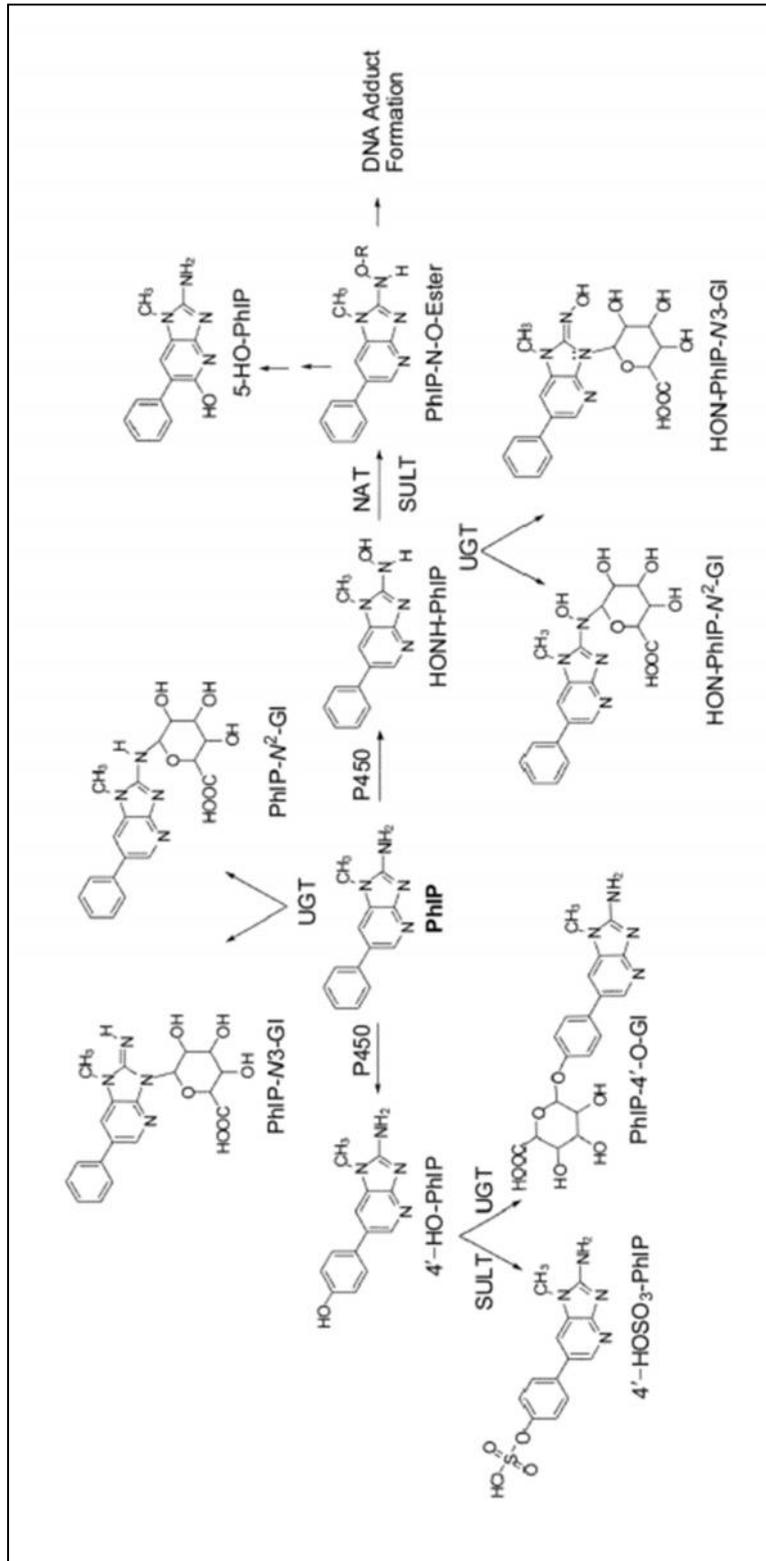


Figura 8: Principales vías metabólicas de PhIP en animales de laboratorio y humanos

3 BIOMARCADORES DE EXPOSICIÓN

En la última década ha aumentado notablemente el uso de biomarcadores como medida para mejorar la evaluación de la exposición, y poder explicar y predecir posibles causas de enfermedades progresivas, como por ejemplo el cáncer.

Los marcadores biológicos son variables que indican un determinado momento en el proceso conducente a la enfermedad. Tienen especial interés en la evaluación de enfermedades progresivas donde los síntomas se manifiestan tras un largo periodo de exposición. En este sentido, se define a un biomarcador como la presencia de un xenobiótico en un fluido biológico y/o las alteraciones inducidas por el mismo sobre los componentes celulares o bioquímicos o sobre procesos, estructuras o funciones en un organismo vivo, que son cuantificables en un sistema biológico o muestra (Gil Hernández, 2000).

Algunos de los biomarcadores incluyen compuestos inalterados o metabolitos en fluidos corporales, proteínas y aductos de ADN derivados de metabolitos genotóxicos (Turesky, 2011).

Sin duda, la ventaja principal del empleo de biomarcadores radica en que considera las variaciones interindividuales (diferencias en la absorción, biodisponibilidad, excreción o en los mecanismos reparadores del ADN) e incluso, intraindividuales como consecuencia de una alteración fisiopatológica concreta en un período de tiempo determinado. Ello conlleva una evaluación de la exposición individualizada (Gil Hernández, 2000).

Los biomarcadores pueden clasificarse en tres categorías: biomarcadores de susceptibilidad, biomarcadores de efecto y biomarcadores de exposición.

Los primeros sirven como indicadores de la respuesta individual frente a la agresión de un tóxico o grupo de tóxicos. Se deben generalmente a factores genéticos, reconocibles por estudios de ADN y sus fragmentos de restricción, clonado de genes e investigación de polimorfismos de actividades enzimáticas.

Los biomarcadores de efecto indican cambios bioquímicos que acontecen tras la exposición a xenobióticos. Incluyen modificaciones en la composición

celular sanguínea, alteraciones en actividades enzimáticas, aparición de aductos del ADN, incrementos localizados de ARN-m, aumento de determinadas proteínas, e incluso aparición de anticuerpos específicos (autoanticuerpos) contra un xenobiótico o frente a fracciones celulares.

Por último, los biomarcadores de exposición pueden ser compuestos exógenos (o un metabolito) dentro del organismo que reflejan la exposición de éste a un xenobiótico. El análisis se realiza en fluidos corporales (sangre y orina, fundamentalmente) o incluso aire espirado. En esta categoría pueden incluirse a las AHs. Existen trabajos de investigación que demuestran la eliminación de AHs sin metabolizar, así como metabolizadas (conjugados de fase II) en orina (Huetos Hidalgo, 2004). Así, su determinación en fluidos biológicos de sujetos expuestos, podría ser empleada como un indicador efectivo del patrón de consumo de los mismos.

4 DETERMINACIÓN DE PHIP EN ORINA

Como se mencionó anteriormente, PhIP también puede estar presente en café, bebidas alcohólicas, en fuentes medioambientales, tejidos humanos, pelo y fluidos biológicos, como plasma, orina o bilis (Martin Calero, 2009), por lo que puede ser empleada como un biomarcador de exposición a xenobioticos.

Entre los fluidos biológicos, la orina es una matriz útil para la medición de PhIP, ya que de la misma se pueden obtener grandes cantidades de forma no invasiva. Aunque las mediciones de PhIP en orina no arrojan luz sobre el daño del ADN, pueden reflejar la capacidad de un individuo para bioactivar y desintoxicar este procarcinógeno (Fede *et al.*, 2009).

La considerable complejidad de las matrices, las bajas cantidades en las que las AHs pueden estar presentes y la necesidad de introducir etapas sucesivas para conseguir selectividades adecuadas, justifica lo laborioso de los procedimientos analíticos disponibles. Todo ello hace necesario el desarrollo de metodologías analíticas, tanto para el tratamiento de las muestra como para su determinación (Calero, 2009).

4.1 *Métodos de extracción y purificación de PhIP*

Diversos estudios experimentales han logrado aislar PhIP en muestras biológicas, principalmente en orina. Generalmente, los métodos que se emplean incluyen procedimientos de limpieza (*clean up*) que conllevan pasos de extracción, purificación y preconcentración, seguidos de una técnica de separación, como puede ser la cromatografía líquida o gaseosa. En este punto, el origen de la muestra condiciona en gran medida el grado de limpieza que la misma requiera, y por lo tanto la complejidad del tratamiento a aplicar.

En una etapa inicial, se puede realizar un ajuste de pH de la muestra para adecuarlo al posterior proceso a llevarse a cabo (Friesen *et al.*, 2001); y en ocasiones, también se realiza una centrifugación con la finalidad de eliminar partículas que se encuentran en suspensión (Fede *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010).

Antes de proceder a la etapa de purificación de la muestra, los analitos deben ser extraídos, lo que supone una ruptura de las interacciones de las AHs con los macrocomponentes de la matriz. Al realizar esta ruptura se evita la posterior coelución, junto con nuestro analito de interés, de otros componentes presentes en la matriz extraídos de la muestra. Dicha extracción consiste en realizar una hidrólisis a temperaturas que oscilan entre los 70 y 100°C, ya sea en medio ácido (Frandsen, 2008; Stillwell *et al.* 1997, Fu *et al.*, 2014; Hwa Shin *et al.*, 2014) o bien, en medio alcalino (Friesen *et al.*, 2001), y posterior separación con disolventes orgánicos, como por ejemplo acetato de etilo (Stillwell *et al.*, 1997; Friesen *et al.*, 2001). Luego, es necesario llevar a cabo una etapa de purificación, en la cual se intenta eliminar el mayor número de interferencias posible (Martin Calero, 2009; Gu *et al.*, 2010).

En general, la purificación de la muestra se centra en el uso de la extracción en fase sólida (SPE) (Fede *et al.*, 2009; Galceran, 2001; Friesen *et al.*, 2001; Martin Calero, 2009). La SPE, se basa en la retención sobre el adsorbente sólido de los compuestos deseados disueltos en una muestra líquida. La adición de un eluyente permite eliminar los componentes de la matriz que interfieren y, finalmente, los analitos se eluyen y concentran (Martin Calero, 2009).

Entre los adsorbentes más comúnmente utilizados en SPE, se encuentran los consistentes en rellenos de base sílice de C18 (Frandsen y Alexander, 2000; Friesen *et al.*, 2001; Frandsen *et al.*, 2002) o con grupos funcionales carboxilo (Knize *et al.*, 2001). Otros adsorbentes utilizados para la SPE han sido los llamados adsorbentes mixtos, consistentes en mezclas de materiales apolares y de intercambio iónico, a base de sílice (Fede *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010).

Finalmente, el extracto obtenido se evapora y se redissuelve para su posterior separación y cuantificación por cromatografía acoplada a diversos sistemas de detección.

4.2 *Métodos de detección y cuantificación de PhIP.*

Los principales sistemas de detección utilizados para el análisis de PhIP son la Fluorescencia (Lezamiz *et al.*, 2008), UV-visible (Toribio, 2003) y la espectrometría de Masas (MS). Los recientes avances en la instrumentación analítica, principalmente Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS) (Frandsen, 2008) y Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) (Friesen *et al.*, 2001), han facilitado en gran medida la determinación de las AHs, particularmente PhIP en muestras de orina.

La cromatografía de gases (GC) ha sido ampliamente utilizada para el análisis de aminas por su alto poder de resolución y su bajo costo. Sin embargo, las AHs son compuestos polares y poco volátiles, y se adsorben en la columna o en el inyector. Por tanto, previo al análisis debe realizarse una etapa de derivatización (Friesen *et al.*, 2001), enfocada no sólo a reducir la polaridad de los compuestos sino también para aumentar su volatilidad y mejorar la separación cromatográfica (Toribio, 2003).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más ampliamente utilizada para la determinación de las AHs (Toribio, 2003). La separación se basa en el uso de sistemas de gradiente binarios, que consisten en

una solución acuosa con un modificador de pH y un solvente orgánico soluble en agua, como metanol o acetonitrilo. Los modificadores de pH más ampliamente utilizados con esta finalidad son el ácido fórmico y el ácido acético.

La identificación de compuestos se lleva a cabo a partir de los tiempos de retención de los picos del cromatograma y de alguna propiedad física o química del compuesto que eluye, para lo cual es necesario acoplar un sistema de detección, como puede ser detectores de índice de refracción, espectrofotómetros UV-Vis o espectrómetros de masas.

La espectrometría de masas (MS) es una técnica de detección basada en la ionización de los compuestos, la separación y registro de los iones producidos, según su relación masa/carga (m/z). Esta técnica es idónea para compuestos no volátiles, polares y termolábiles, permitiendo la identificación estructural de las moléculas. El acoplamiento HPLC-MS combina la efectividad en la separación y la versatilidad de la cromatografía líquida con la elevada sensibilidad y selectividad de la espectrometría de masas, ofreciendo muy buenos límites de detección. Dado que el espectrómetro de masas funciona como un detector específico del analito, las posibles interferencias quedan considerablemente reducidas comparado con otras técnicas de detección, con lo cual es posible simplificar los complejos tratamientos de muestra empleados comúnmente. Otra ventaja de la combinación HPLC-MS es la posibilidad de confirmar la identidad del analito mediante el espectro de masas correspondiente al pico cromatográfico (Martin Calero, 2009). Todas estas cualidades, junto con las mejoras introducidas en los últimos años en el acoplamiento entre las dos técnicas, han facilitado la aparición de un creciente número de publicaciones que analizan AHs mediante HPLC-MS.

En un principio, dicho acoplamiento (HPLC-MS) supuso bastantes problemas debido a que la MS opera a presión atmosférica ionizando los compuestos mientras que la cromatografía de alta presión trabaja en fase líquida. Los caudales relativamente elevados que se manejan en HPLC obligan

I. Introducción

al empleo de una interfase cuya misión es compatibilizar la cromatografía líquida con el espectrómetro de masas. Las principales interfases usadas para ionizar a presión atmosférica (API) son la ionización química a presión atmosférica (APCI) y la ionización por electrospray (ESI).

ESI ioniza las muestras directamente desde soluciones acuosas, orgánicas o mezclas de ambos, mediante la formación de un spray de gotas. Estas gotas van reduciendo su tamaño debido a fenómenos de evaporación del solvente (por efecto del gas y de la temperatura) y a la desintegración de las mismas gotas en otras de menor tamaño. Al disminuir las gotas de tamaño, la densidad de carga eléctrica en su superficie aumenta. La mutua repulsión entre cargas de igual signo en la superficie llega a ser tan grande que se superan las fuerzas de cohesión superficial y los iones dejan las gotas en la forma que se conoce como “cono de Taylor”, siendo dirigidas hacia el analizador mediante la aplicación de vacíos crecientes, que van desde presión atmosférica en la introducción de la muestra, hasta valores de vacío de 10^{-9} en la zona del analizador/detector. La vaporización de estas gotas cargadas da lugar a la producción de iones con una o varias cargas en fase gaseosa. Los iones formados se “extraen” del spray gracias a la diferencia de potencial existente entre el capilar y el cono de entrada (Figura 9).

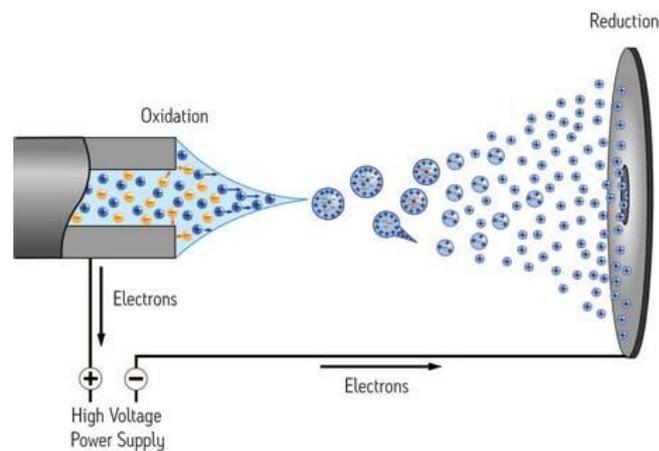


Figura 9: Ionización por electrospray (ESI).

Existen diversos tipos de espectrómetros de masas, tales como, trampa de iones (IT), tiempo de vuelo (TOF) o cuadrupolos de barras (Q). El tipo de analizador influye en la resolución, el intervalo de masas a registrar y también en la posibilidad de realizar experimentos en tándem.

La espectrometría de masas en tándem (MS/MS) es una técnica que se basa en la detección de los compuestos mediante la fragmentación de los iones. La trampa de iones (IT), el triple cuadrupolo (QqQ) y el cuadrupolo-TOF (Q-TOF) permiten realizar estos experimentos en tándem, permitiendo realizar una detección aún más selectiva que la MS, tal es el caso de los trabajos realizados por Fede y col. (2009), Gu y col. (2010) y Stillwell y col. (1997).

El analizador de tiempo de vuelo (Q-TOF) es, en cuanto a su fundamento, uno de los analizadores más simples de los que se utilizan hoy en día. Se basa en la medida del tiempo que tardan los iones generados y acelerados con igual energía en la fuente de iones, en alcanzar un electrodo colector situado a una distancia prefijada. Como los iones poseen la misma energía pero diferentes masas alcanzarán el colector a diferentes tiempos, dependiendo de su masa, carga y energía cinética (Jiménez cordón, 2012).

En el triple cuadrupolo (QqQ), en una primera instancia, los iones de la muestra son formados en la fuente de ionización. Los iones generados en la fuente de ionización son conducidos a una zona de vacío intermedio a través de un pequeño orificio, el cual está protegido por una cortina de gas inerte que minimiza la entrada de moléculas neutras y contribuye a la ruptura de *clusters*. Si dicho voltaje es suficientemente elevado puede provocarse fragmentación, con la consecuente aparición de iones producto. Como se observa en la figura 10, una vez en la zona de vacío intermedio, los iones deben atravesar un cuadrupolo al que se aplican únicamente radiofrecuencias (Q0) y una lente, tras lo cual entran en la zona de elevado vacío del instrumento. En esta región, además de una serie de lentes se encuentran los dos filtros cuadrupolares (Q1 y Q3) y la cámara de colisión (Q2), consistente en un cuadrupolo al que se aplican únicamente radiofrecuencias. Mientras que Q1 y Q3 son capaces de permitir

I. Introducción

únicamente el paso de iones con una determinada relación m/z , Q2 no tiene propiedades de filtración de iones. Sin embargo, cuando se introduce un gas en su interior éste colisiona con los iones provocando su fragmentación. Tras atravesar el sistema analizador, los iones finalmente impactan en el detector, produciendo un pulso de electrones que es amplificado por un multiplicador de electrones originando una señal digital (Toribio, 2003). Por lo tanto, podemos decir que permite seleccionar un único ión procedente de la ionización ESI en el primer cuadrupolo, fragmentar ese ión en el segundo cuadrupolo por colisión con Argón (Ar) y separar los fragmentos con el tercer cuadrupolo antes de llegar al detector. Con este proceso se puede realizar una mejor dilucidación estructural de los compuestos que eluyen desde el cromatógrafo y una buena cuantificación de dichos compuestos, alcanzando, de ser necesario, niveles trazas.

La diferencia entre los analizadores de triple-cuadrupolo y los equipos de alta resolución (Q-TOF), es la sensibilidad, que es mayor en los triple-cuadrupolo, por al menos uno o dos órdenes de magnitud, lo que suele ser crucial para el análisis de compuestos a niveles de trazas.

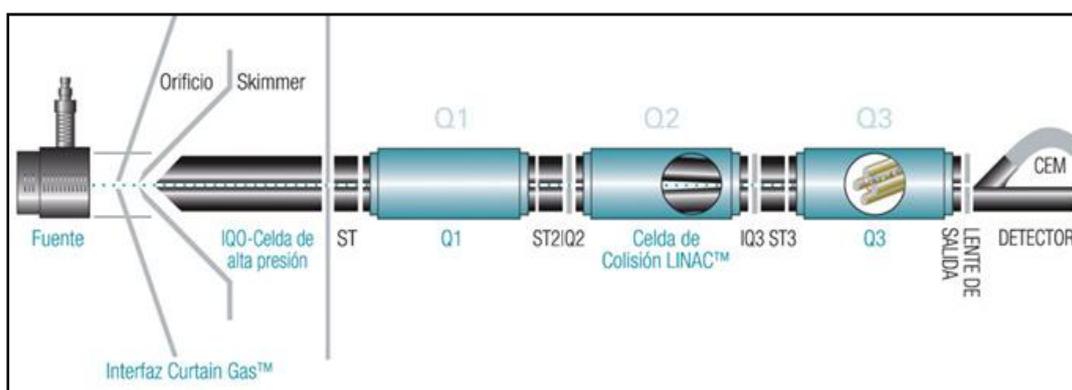


Figura 10: Esquema general de un sistema de MS/MS

4.3 Efecto matriz

Como se mencionó anteriormente, la interfaz más ampliamente usada en el análisis por MS es la ionización por electrospray (ESI). Sin embargo, una de las principales desventajas de la ESI es el efecto matriz, definido como una modificación de la señal del analito, producto del aumento o disminución de la ionización, causada por compuestos de la matriz que coeluyen con el analito (Zhao y Metcalfe, 2008). En otras palabras, para la misma concentración de analito, el análisis de una muestra real o de una disolución estándar del analito puro no proporciona la misma respuesta instrumental (García Fernández, 2012).

Este efecto dependiente de la matriz también se conoce como el “efecto de la supresión/incremento del ión”. El efecto más conocido es la supresión iónica (disminución de la señal del analito), la cual ocurre en matrices complejas cuando no se logra una adecuada limpieza (“*clean-up*”) de la muestra (Gros *et al.*, 2009). En general, la supresión iónica se produce por una interacción entre el ion procedente del analito con otros iones formados en la cámara de ESI, dando lugar a especies no-iónicas o a iones de distinta relación masa/carga (m/z). La evaluación y compensación de este efecto es un componente importante en la validación de métodos de análisis de compuestos en muestras biológicas, especialmente cuando se analizan extractos de muestras con matrices complejas.

Por lo tanto, para eliminar o minimizar este EM, es necesario realizar una optimización del método de extracción de la muestra y de la separación cromatográfica de los analitos (Becerra Herrera, 2013).

II. OBJETIVOS

1 OBJETIVO GENERAL

El presente estudio se enmarca en el trabajo de miembros del grupo de investigación de epidemiología ambiental del cáncer en Córdoba (GEACC), quienes abordan la determinación de las aminas aromáticas heterocíclicas carcinogénicas y/o mutagénicas en carnes sometidas a distintos procesos de cocción y en fluidos biológicos, como potenciales biomarcadores de exposición. Para ello, se plantea la necesidad de validar una metodología de extracción y cuantificación de PhIP (2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina) en fluidos biológicos (orina), para determinar su presencia en orina de voluntarios sanos de una población de la ciudad de Córdoba, con el fin de ser utilizada como biomarcador de exposición al consumo de carnes.

Debido que las AHs se generan en bajas concentraciones y, por otro lado, la elevada complejidad de las matrices biológicas, es necesario desarrollar metodologías analíticas altamente sensibles y selectivas, disminuyendo el efecto matriz, permitiendo así determinar su contenido.

Con este fin, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Realizar la puesta a punto del procedimiento de extracción de PhIP a partir de muestras de orinas de voluntarios sanos.

2. Realizar la puesta a punto y validación de una metodología mediante UHPLC-MS para la determinación y cuantificación de PhIP en muestras de orinas de voluntarios sanos.

3. Cuantificar PhIP en muestras de orina de voluntarios sanos, previo consumo de carnes cocidas con dos tipos de cocción diferentes, utilizando la metodología validada.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

1 ESTÁNDARES Y REACTIVOS

Para la validación de la metodología se utilizó como estándar externo 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP), el cual fue obtenido de Toronto Research Chemicals (Toronto, ON, Canadá). Metanol, acetonitrilo y ácido fórmico (todos de grado HPLC) fueron obtenidos de laboratorio Merck (Alemania).

Acetato de etilo, acetona, éter etílico, hidróxido de sodio, hidróxido de amonio, ácido clorhídrico, fosfato de potasio dibásico y monobásico, todos de grado analítico, fueron obtenidos de Cicarelli Laboratorios (Santa Fe, Argentina).

El agua ultrapura utilizada para dilución de muestras, preparación de reactivos y fase móvil fue obtenida de un equipo Sartorius Arium 611 UV con una conductividad $< 0,18 \mu\text{S}$ (micro Siemens) y contenido de carbono orgánico total (TOC) $< 5 \text{ ppb}$ ($\mu\text{g/L}$).

2 APARATOS E INSTRUMENTOS

- *Balanza analítica*

Para realizar el pesaje tanto de patrones como de reactivos analíticos se utilizó una balanza electrónica granataria marca AND, A&D company limited, GR series con una precisión de 0,1 mg.

- *Centrífuga*

Con la finalidad de separar de proteínas y sales previamente precipitadas en las muestras de orina, se utilizó una centrifuga marca Sorvall Instrument, DUPONT, RC5C.

- ***Evaporador rotatorio***

Con el objetivo de evaporar la mayor parte del disolvente presente en la muestra se utilizó un evaporador rotatorio marca Büchi R-124, con baño calefactor marca Büchi B-480. La temperatura del baño donde se llevó a cabo la evaporación fue de aproximadamente 40°C.

- ***Baño termostatzado***

En el proceso de hidrólisis tanto básica como ácida, se utilizó un baño calefactor de temperatura regulable marca VICKING, modelo Masson D. Las temperaturas utilizadas en ambos casos fueron de 95 °C.

- ***UHPLC-MS(QTOF)***

Se contó con un sistema UHPLC marca Agilent Technologies 1200, equipado con una bomba de gradiente binario, desgasificador de solventes e inyector automático. El mismo se encuentra acoplado a un espectrómetro de masas (Bruker, micrOTOF-Q11), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI), disponible en el Instituto ISIDSA/ICYTAC (UNC-CONICET).

- ***UHPLC-MS(QqQ)***

Se utilizó un sistema UHPLC marca Acquity, Ultra Performance, Waters, acoplado a un espectrómetro de masas Quattro Premier XE, Micromass, Waters Triple Quadrupolo MS/MS con una fuente de ionización por electrospray (ESI), equipado con una bomba binaria, inyector automático y desgasificador, disponible en el Instituto de Química de San Luis [INQUISAL] (CCT-CONICET).

3 MUESTRAS DE ORINA

Para llevar a cabo la validación de la metodología de extracción y cuantificación de PhIP, se utilizaron muestras de orina de voluntarios sanos de

III. Materiales y métodos

la ciudad de Córdoba. Fueron seleccionados 6 (seis) voluntarios sanos de cualquier rango de edad y de ambos sexos que cumplieron con exhaustivos criterios de inclusión; los cuales se basan en la ausencia de factores de riesgo que pudieran interferir en el funcionamiento adecuado del hígado y riñones.

Se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de inclusión para participar en el estudio:

- No poseer un peso inferior al 90% o más del 130% de ponderaciones del peso deseable (Sinha *et al.*, 1994).
- No ser fumador (al menos 6 meses antes del estudio) (Sinha *et al.*, 1994; Stillwell *et al.*, 1997).
- No poseer patologías hepáticas y renales.
- Consumir habitualmente una dieta equilibrada y balanceada en Macro y Micronutrientes (basadas en las Recomendaciones de las Guías Alimentarias de la Población Argentina) (Sinha *et al.*; 1994, Stillwell *et al.*, 1997).
- No consumir suplementos de vitaminas y minerales (Sinha *et al.*, 1994).
- No consumir productos que contengan *Lactobacillus* (probióticos).
- No consumir carne asada más de 2 veces a la semana.
- No consumir habitualmente vegetales crucíferos (Knize *et al.*, 2002; Felton *et al.*, 2004; Walters *et al.*, 2004).
- No estar expuestos a inhalación y contacto directo con pinturas.
- Dar su aprobación por escrito firmando una carta de consentimiento informado.
- Residir en la ciudad de Córdoba.

A dichos voluntarios sanos se les hizo entrega de la dieta específica que debían realizar 48 (cuarenta y ocho) horas antes del estudio, la cual consistía en no consumir ninguna preparación que contuviera carnes (vacuna, cerdo, pollo y pescado), pan tipo francés o mignón, vegetales crucíferos (brócoli, coliflor,

repollos y nabo), productos lácteos que contuvieran *Lactobacillus* (probióticos) y vino.

El estudio se llevó a cabo en dos semanas diferentes, utilizando muestras de carne cocida de dos formas distintas. En una primera instancia (semana 1) se les proporcionó a los voluntarios una porción de carne vacuna magra cocida a la plancha con una cocción en el centro de la carne a 70° C, con un tiempo final de aproximadamente 7 minutos. En una segunda etapa (semana 2) se les proporcionó una muestra de carne sometida a sobre-cocción a la plancha durante 15 minutos, dándolas vuelta minuto a minuto durante toda la cocción. Las muestras de carne cocida fueron fraccionadas en cubos del mismo tamaño, y la cantidad ingerida por los voluntarios fue estandarizada, de acuerdo al procedimiento diseñado por la Licenciada Gabriela Reartes en su trabajo de tesis doctoral (Reartes, 2015), de manera tal que todos ingirieran la misma cantidad.

Una vez ingerida la carne, se procedió a la recolección de las muestras de orina en dos períodos distintos: el primer período (P1) correspondió al rango horario de 0-6 hs y el segundo período (P2) de 6-12 hs a partir del momento del consumo. Las mismas fueron fraccionadas y almacenadas a -80°C hasta el momento de su procesamiento y posterior análisis (Tabla 1).

Desde el punto de vista ético, previo al estudio todos los voluntarios debieron firmar un documento escrito en donde se especifican las características del proceso a llevarse a cabo y, por lo tanto, dejando asentado el consentimiento escrito que avala la participación voluntaria en este estudio de investigación.

Dicho proyecto ha sido evaluado y aprobado por el Comité de Ética del Hospital Nacional de Clínicas. Presidente del Comité Prof. Dra. Hilda Montrull. Hospital de Clínicas, Córdoba.

Tabla 1: Muestras de orina de voluntarios sanos utilizadas en el estudio.

Cocción	Período	Voluntario	Cocción	Período	Voluntario
SC	1	AB	70	1	CG
SC	1	FS	70	1	JB
SC	1	JM	70	1	MJ
SC	1	CG	70	1	JM
SC	1	JB	70	1	AB
SC	1	MJ	70	1	FS
SC	2	AB	70	2	CG
SC	2	CG	70	2	FS
SC	2	JM	70	2	JM
SC	2	FS	70	2	AB
SC	2	MJ	70	2	JB
SC	2	JB	70	2	MJ

SC: sobrecocción.

70: cocción a 70°C.

4 DETERMINACIONES ANALÍTICAS

4.1 Condiciones cromatográficas UHPLC-MS(QTOF).

Debido a algunas características de la PhIP, entre las que destaca su alta polaridad y que es térmicamente inestable, la cromatografía líquida se presenta como una de las técnicas que más se utiliza en la determinación de estos compuestos (Martin Calero, 2009).

La cromatografía líquida se realizó con un sistema de UHPLC, equipado con una bomba de gradiente binario, acoplado a un espectrómetro de masas (Bruker, micrOTOF-Q11), equipado con una fuente de ionización por electrospray (ESI). La columna utilizada fue de fase reversa (C18; Phenomenex, 100 × 2,10 mm; tamaño de partícula 2,6 micras), termostaticada a 30°C.

Para lograr la optimización y validación del método de análisis se utilizó un estándar comercial de PhIP. Inicialmente se procedió a hacer una infusión directa del compuesto por ESI-MS con el fin de maximizar la señal obtenida para el ión molecular del compuesto de interés (m/z 225,1). Previo a la infusión

directa a la fuente ESI, las soluciones de estándar se filtraron a través de membranas de 0,22 μm de poro.

Las condiciones de trabajo de la fuente de ionización fueron las siguientes: voltaje del capilar 4500 V; presión del gas de nebulización 3,5 bar; flujo del gas de secado 7,5 L/min y temperatura de secado 200°C. N_2 y Ar fueron utilizados como gases de nebulización y de colisión, respectivamente. Los espectros de MS fueron registrados en modo positivo en un intervalo de 100 a 800 m/z . La adquisición y procesamiento de datos se llevaron a cabo utilizando los programas Compass Versión 3.1 y Data Analysis Versión 4.0, respectivamente.

Posteriormente, se realizó la optimización de las condiciones cromatográficas, ensayando diferentes gradientes de polaridad. Finalmente, la fase móvil elegida consistió en un gradiente de solventes (solvente A: ácido fórmico 0,5 % v/v y solvente B: ácido fórmico 0,5% v/v en acetonitrilo) descrito en la Tabla 2, con el cual se obtuvo la mejor resolución del pico de absorción para PhIP. La velocidad de flujo se ajustó a 0,4 mL/min, con una duración de corrida de 18 minutos y el volumen de inyección fue de 10 μL .

Tabla 2: Gradiente cromatográfico UHPLC-MS(QTOF)

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	95	5
8	30	70
12	30	70
13	95	5
18	95	5

4.2 *Extracción de PhIP a partir de muestras de orinas*

Una vez optimizado el método de detección mediante UHPLC-MS(QTOF), se ensayaron cinco procedimientos de extracción diferentes, con la

finalidad de obtener una buena recuperación de PhIP, así como disminuir el efecto matriz generado en fuente ESI.

Para la realización de dichas pruebas fue necesario recolectar orina de 6 voluntarios sanos, quienes debieron realizar la misma dieta durante las 48 horas previas a su recolección. La misma consistía, como se mencionó anteriormente, en no consumir preparaciones que contuvieran carnes (vacuna, cerdo, pollo y pescado), pan tipo francés o mignón, vegetales crucíferos (brócoli, coliflor, repollos y nabo), productos lácteos que contuvieran *Lactobacillus* (probióticos) y vinos. Una vez pasadas las 48 horas se recolectaron muestras de orina durante 12 horas. Las muestras de todos los voluntarios se mezclaron obteniendo una única muestra denominada “orina blanco”, la cual no contenía PhIP proveniente del consumo de carnes cocidas.

En los cinco procedimientos ensayados se procesaron muestras de orinas blanco sin agregado de PhIP, y con agregado externo de PhIP estándar. En el caso de los procedimientos de extracción 1, 2 y 3 se adicionaron cantidades conocidas de PhIP obteniendo concentraciones finales de 10, 50 y 100 ng/mL (ppb); y para los procedimientos 4 y 5 se obtuvieron concentraciones finales de 10 µg/mL (ppm).

Procedimiento de extracción 1

Se realizó una extracción siguiendo el procedimiento descrito por Fede y col. (2009), con ligeras modificaciones.

A 1 mL de cada muestra de orina blanco se añadieron 3 mL de la mezcla metanol (MeOH)/acetona (C₃H₆O) (1:1), previamente refrigerada a -20°C. Las muestras se mantuvieron en baño frío durante 15 minutos para lograr la precipitación de proteínas y sales, posteriormente se centrifugó a 15,000 g durante 5 min, a 4 °C.

III. Materiales y métodos

El sobrenadante fue transferido a un balón, y el disolvente orgánico se evaporó utilizando un evaporador rotatorio (ER). La fracción acuosa restante, de aproximadamente 1 mL, fue acidificada con 20 μ L de ácido fórmico (HCO_2H).

La muestra de orina acidificada se aplicó a un cartucho de extracción (resina combinada de intercambio catiónico y C18, HYPERSEP retain - CX SPE column 60 mg/3 mL), el cual previamente ha sido activado con hidróxido de amonio (NH_4OH) en MeOH (5%; 2 mL), seguido de HCO_2H en Agua (H_2O) (2%; 2 mL). Posteriormente, el cartucho fue lavado con HCO_2H en H_2O (2%; 2 mL), seguido de HCO_2H en MeOH (2%; 2 mL), H_2O (2 mL), NH_4OH al 5% (2 x 2 mL), y H_2O (2 mL).

PhIP fue eluída del cartucho con NH_4OH en MeOH (1%; 2 mL). La muestra recolectada en viales se colocó en una campana ventilada durante 15 minutos para permitir la evaporación del Amoníaco (NH_3). Finalmente, la muestra se llevó a sequedad bajo corriente de N_2 , y se resuspendió en 40 μ L de una mezcla MeOH: H_2O (1:1) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Asimismo, el procedimiento de extracción se realizó con volúmenes de orina blanco de 2 mL y de 60 mL.

Procedimiento de extracción 2

Se colocaron 10 mL de cada muestra de orina blanco y 10 mL de éter etílico en ampollas de decantación para extraer la PhIP por partición. Luego de agitar suavemente la mezcla, se dejaron en reposo durante 1 hora con el fin de lograr la separación de fases. La fase orgánica se recolectó en un balón y se repitió el procedimiento de extracción. Ambas fases orgánicas se combinaron y se llevó a sequedad en ER.

III. Materiales y métodos

Posteriormente, se agregaron 0,5 mL de HCO₂H (2%) y se aplicaron al cartucho de extracción (HYPERSEP retain - CX SPE columna 60 mg/3mL), el cual previamente ha sido activado como se explicó en el procedimiento de extracción 1. PhIP fue eluída con NH₄OH en MeOH (1%; 1 mL). La muestra recolectada en viales se colocó en una campana ventilada durante 15 minutos para permitir que el NH₃ se evapore. A continuación, la muestra se evaporó a sequedad bajo corriente de N₂ y se resuspendió en 200 µL de una mezcla de MeOH: H₂O (1:1) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Procedimiento de extracción 3

Se colocaron 10 mL de cada muestra de orina blanco y 10 mL de éter etílico en ampollas de decantación para extraer la PhIP por partición. Luego de agitar suavemente la mezcla, se dejó en reposo durante 1 hora con el fin de lograr la separación de fases. La fase orgánica se recolectó en un balón y se repitió el procedimiento de extracción. Una vez recolectadas ambas fases orgánicas en el balón, se llevó a sequedad en ER y se suspendieron en 200 µL de una mezcla MeOH: H₂O (1:1) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

Procedimiento de extracción 4

Se realizó la extracción de PhIP siguiendo el procedimiento descrito por Strickland y col. (2002) con ligeras modificaciones.

Se colocó 1 mL de cada muestra de orina blanco en tubos de hidrólisis con tapa a rosca y se agregó 1 mL de ácido clorhídrico (HCl) 0,5 N, con el fin de realizar una hidrólisis ácida. Se taparon los tubos de hidrólisis y se colocaron en baño de agua a 95°C durante 60 minutos. Transcurrido dicho tiempo se agregaron 10 gotas de hidróxido de sodio (NaOH) 2N, con la finalidad de ajustar el pH de la muestra a 7. El contenido fue transferido a ampollas de

decantación y se realizaron 2 extracciones sucesivas con porciones de 3 mL de acetato de etilo cada una. Las fases orgánicas se combinaron y recolectaron en balones de vidrio de 50 mL. Posteriormente se evaporó a sequedad en ER y se resuspendió en 200 μ L de una mezcla MeOH: H₂O (1:1) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

El procedimiento de extracción se realizó también con volúmenes de orina blanco de 2 mL y de 3 mL.

Procedimiento de extracción 5

Se realizó la extracción de PhIP siguiendo el procedimiento descrito por Friesen y col. (2001) con ligeras modificaciones.

Se tomó 1 mL de cada muestra de orina blanco en un tubo de hidrólisis con tapa a rosca y se agregaron 2 mL de buffer fosfato 0,2 M pH=8 y 1 mL de NaOH 1N, con el fin de realizar una hidrólisis básica.

Los tubos se colocaron en baño de agua a 95°C durante 16 horas. Transcurrido dicho tiempo, se centrifugaron durante 5 min a 3000 rpm, y se transfirieron a ampollas de decantación. Se realizaron 2 extracciones sucesivas con porciones de 3 mL de acetato de etilo cada una. Finalmente, la fase orgánica fue separada recogida en balones de vidrio de 50 mL. El acetato de etilo se evaporó a sequedad en ER y se resuspendió en 200 μ L de una mezcla MeOH: H₂O (1:1) para su posterior inyección en el sistema cromatográfico.

El procedimiento se realizó además con volúmenes de orina blanco de 2 mL y 3 mL.

4.3 Condiciones cromatográficas UHPLC-MS(QqQ).

Luego de probar los diferentes procedimientos de extracción, fue necesario recurrir a un sistema de detección de mayor sensibilidad, por lo que se optimizaron las condiciones cromatográficas para un sistema acoplado a un

III. Materiales y métodos

espectrómetro de masas de triple cuadrupolo equipado con una fuente ESI. Se utilizó una columna de fase reversa (C18; 50 × 2,10 mm; tamaño de partícula 1,7 micras, Waters). La separación se llevó a cabo a 25°C, a un flujo de 0,25 mL/min; con una duración de corrida de 4 minutos, y un volumen de inyección de 10 µL. Previo al análisis, el estándar y las muestras se filtraron a través de membranas de 0,22 µm de poro.

La fase móvil consistió en un gradiente binario compuesto por ácido fórmico 0,1 % (v/v) (solvente A) y acetonitrilo con ácido fórmico 0,1 % (solvente B) (Tabla 3).

Tabla 3: Gradiente cromatográfico UHPLC-MS(QqQ)

Tiempo (min)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0.00	95	5
1.00	75	25
3.00	75	25
3.20	95	5
4.00	95	5

Inicialmente se procedió a hacer infusión directa del estándar en la fuente ESI para determinar el ión molecular y el fragmento proveniente del segundo cuadrupolo que se utilizaría para la cuantificación de PhIP, así como los parámetros de detección por MS (temperatura, voltajes, etc.). Se seleccionó el ion molecular y sus correspondientes productos de fragmentación (evaluados por infusión directa ESI-MS/MS), este modo de trabajo recibe el nombre de MRM (multiple reaction monitoring) (Tabla 4). Los espectros de MS fueron registrados en modo positivo. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes: voltaje del capilar 2,7 KV, presión del nebulizador 3,5 Bar, flujo del gas de secado 7,5 L/min, temperatura de la fuente 150°C, temperatura de desolvatación 350°C, y energía de colisión 30 eV. N₂ fue utilizado como gas de nebulización y colisión.

Tabla 4: Ion molecular y productos de fragmentación de PhIP

Compuesto	Ion Molecular (<i>m/z</i>)	Fragmento de cuantificación MS/MS (<i>m/z</i>)	Fragmentos de identificación MS/MS (<i>m/z</i>)
PhIP	225	210	183/168

5 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

La correcta interpretación de los resultados obtenidos mediante una determinada metodología analítica depende de la fiabilidad de la misma. Por lo tanto, es fundamental que los nuevos métodos desarrollados para su aplicación sigan un proceso de validación.

Tras lograr la detección del compuesto de interés (PhIP) en orina y optimizar las condiciones del MS, se estudiaron los parámetros de calidad del método asegurando una adecuada separación, identificación, confirmación y cuantificación de dicho compuesto.

Los parámetros que se han estudiado en este trabajo para la validación del método analítico fueron la precisión, el rango de linealidad, el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LQ).

5.1 Precisión

Se entiende por precisión la reproducibilidad de los resultados; es decir, la concordancia mutua entre los datos que se han obtenido exactamente de la misma forma. En general, la precisión de un método analítico se obtiene mediante la simple repetición de la medida.

Normalmente se utilizan tres términos para describir la precisión de un conjunto de datos replicados que incluyen la desviación estándar (SD), la varianza y el coeficiente de variación (CV%) (Arias Gonzalez y Gil Cañas, 2012).

El objetivo del estudio de la precisión es conocer la variabilidad del método de ensayo, debida a errores aleatorios inherentes al mismo.

En este estudio se evaluó la precisión mediante el CV%, calculado de un mínimo de ocho determinaciones, a partir de dos réplicas de cuatro niveles de concentración diferentes (ICH, 2005).

$$CV(\%) = \frac{SD}{X} \times 100$$

donde, SD es la desviación estándar absoluta y X la media.

5.2 *Rango de linealidad*

Se denomina rango de linealidad de un método analítico, al intervalo que va desde la concentración más pequeña a la que se puede realizar medidas cuantitativas (LQ) hasta la concentración en la que la curva de calibrado se desvía de la linealidad (Skoog *et al.*, 1992). En el presente estudio el rango de linealidad fue obtenido de las curvas de calibración, las cuales se realizaron en cinco niveles de concentración 50, 200, 1000, 5000, 10000 ng/mL (ppb) cuando se utilizó como equipo un HPLC-MS(QTOF) y siete niveles de concentración 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000 pg/mL (ppt) cuando se utilizó como equipo un UHPLC-MS(QqQ).

5.3 *Límite de detección*

El límite de detección (LD) es sólo una medida cualitativa y se entiende como la mínima concentración o la mínima masa de analito que se puede detectar, sin necesidad de ser cuantificada, para un nivel de confianza dada. El límite depende de la relación entre la magnitud de la señal analítica y el valor de las fluctuaciones estadísticas de la señal del blanco. Su determinación se realiza por la relación entre el ruido y la señal debida al analito; se expresa en unidades de concentración (Arias Gonzalez y Gil Cañas, 2012).

En el presente trabajo, el mismo fue calculado como:

$$LD = LQ/3,3$$

donde, LQ es el límite de cuantificación.

5.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LQ) es un término cuantitativo y se entiende como la mínima cantidad de analito presente en la muestra que se puede cuantificar, bajo condiciones experimentales descritas, con una adecuada precisión y exactitud, expresándose en unidades de concentración (Arias Gonzalez y Gil Cañas, 2012).

Hay diversos métodos de análisis para hallar el LQ. En el presente trabajo se aplicó el método basado en la relación señal /ruido (S/R). Este método es uno de los más empleados cuando el procedimiento de análisis es instrumental y proporciona una señal blanco, un ruido de fondo o una línea de base, es decir una señal residual a concentración cero de analito.

En el caso de métodos cromatográficos para calcular el límite de cuantificación (LQ), el mismo será igual a la concentración de analito que proporcione una señal 10 veces superior (Arias Gonzalez y Gil Cañas, 2012).

6 ANÁLISIS DE DATOS

6.1 Cálculo de efecto matriz (EM).

Para realizar el cálculo del EM se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto matriz (\%)} = \left(\frac{\text{Area matriz agregada} - \text{Area blanco}}{\text{Area estándar}} - 1 \right) \times 100$$

Donde *Área matriz agregada* es el área del analito agregado en el extracto de la matriz en el momento previo a la inyección al cromatógrafo líquido, *Área blanco* es el área del analito en la matriz (si está presente naturalmente) y *Área estándar* es el área de analito en solución estándar preparada en fase móvil. Valores negativos de efecto matriz indican supresión iónica y valores positivos aumento de señal del analito por efecto matriz.

6.2 Cálculo de porcentaje de recuperación

Para realizar el cálculo del porcentaje de recuperación se aplicó la siguiente ecuación:

$$\text{Recuperación (\%)} = \left(\frac{\text{Área muestra agregada} - \text{Área blanco}}{\text{Área estándar}} \right) \times 100$$

Donde *Área muestra agregada* es el área del analito en la muestra con agregado de estándar al inicio del tratamiento (es decir que sufre todo el proceso de análisis), *Área blanco* es el área del analito presente en la muestra naturalmente y *Área estándar* es el área de analito en solución estándar preparada en fase móvil (sin sufrir todo el pre-tratamiento de la muestra).

6.3 Análisis estadístico

Las concentraciones de PhIP en orina de los voluntarios se compararon empleando un modelo lineal multinivel (Skron dal y RabeHeskth, 2008), siendo la concentración, la variable respuesta, el periodo de medición post ingesta y el tipo de cocción se incluyeron como covariables en el primer nivel; y el sujeto como variable aleatoria en el segundo nivel.

IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el presente estudio se optimizó una metodología para el análisis de PhIP en muestras de orina mediante separación cromatográfica y detección por espectrometría de masas.

Para ello, en una primera instancia se ajustaron las condiciones de separación y detección, a partir de un estándar comercial de PhIP, utilizando un equipo de UHPLC-MS(QTOF). Las condiciones de trabajo seleccionadas fueron descritas en la sección de Materiales y Métodos (III.4.). Una vez establecidas dichas condiciones, se evaluó el rango de linealidad del método, para lo cual se construyó una curva de calibración externa de PhIP, obteniendo una buena linealidad ($R^2 = 0,996$) en un rango de 20 a 6250 ng/mL (Figura 11). Posteriormente, se ensayaron cinco procedimientos diferentes de extracción de PhIP, con la finalidad de evaluar la recuperación de la misma a partir de muestras de orina blanco.

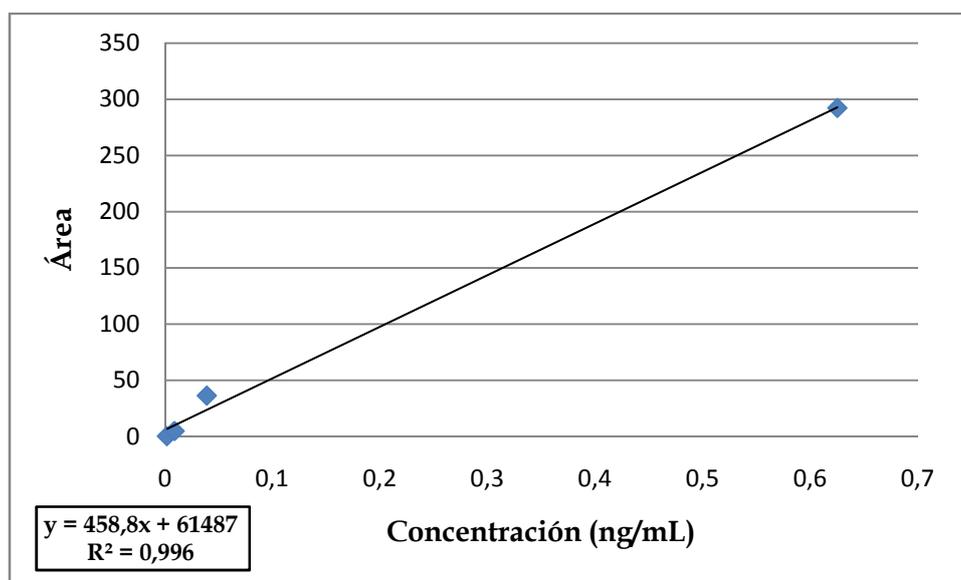


Figura 11: Curva de calibración externa de PhIP utilizando UHPLC-MS(QTOF).

1 ELECCIÓN DEL PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN

1.1 Procedimiento de extracción 1

El primer procedimiento ensayado fue el desarrollado por Fede y col. (2009) con algunas modificaciones, el cual consistió en precipitar sales y proteínas presentes en la muestra de orina, previo a la extracción de la misma. Posteriormente se realizó un proceso de *clean up* de la muestra, utilizando cartuchos de SPE (HYPERSEP retain - CX), rellenos de una resina combinada de intercambio catiónico y fase reversa (C18) (Figura 12). Dicho procedimiento fue aplicado a dos volúmenes de orina diferentes (1 y 2 mL), y en muestras de orina con y sin agregado de PhIP estándar.



Figura 12: Procedimiento de extracción 1

En ambos volúmenes de orina ensayados (1 y 2 mL) sin agregado de PhIP, se observó la presencia de interferentes que eluyen al mismo tiempo de retención que el estándar de PhIP (Figura 13). Este resultado sugiere que el procedimiento de limpieza por SPE no fue eficiente para lograr extraer el compuesto de interés de la matriz de orina.

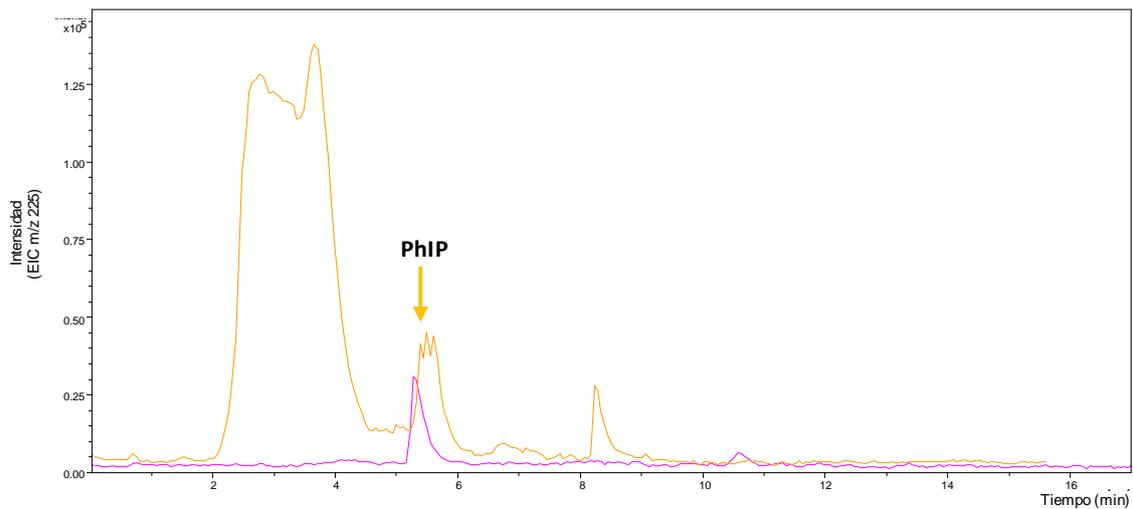


Figura 13: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---) y estándar externo de PhIP de 50 ng/mL (---).

Asimismo, se realizaron ensayos de recuperación por adición de PhIP en cantidades conocidas a una muestra de orina blanco, obteniendo concentraciones finales de 10, 50 y 100 ng/mL (ppb). Cuando se compararon los cromatogramas de una disolución del patrón de referencia y las orinas fortificadas con PhIP, se observó un perfil de interferentes similar en todas las orinas ensayadas, que coeluyen con el pico de PhIP, no permitiendo evaluar la recuperación de la misma (Figura 14).

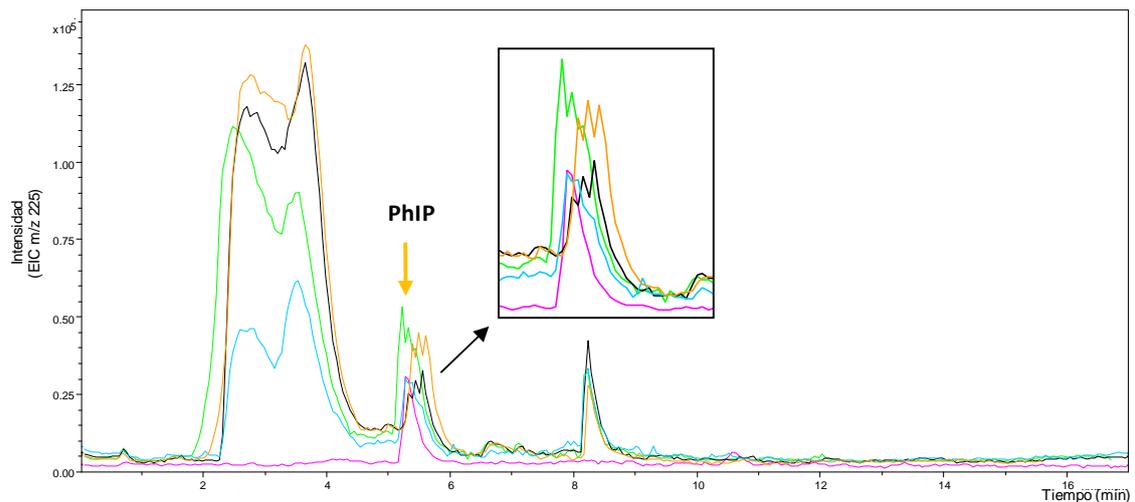


Figura 14: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP de 10 ng/mL (---), 50 ng/mL (---), 100 ng/mL (---) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (---).

IV. Resultados y discusión

Este resultado fue opuesto al obtenido por Fede y col. (2009), quienes obtuvieron porcentajes de recuperación entre 50 y 80% utilizando el mismo procedimiento de extracción en idénticas condiciones. Como se explicó anteriormente, la presencia de interferentes provenientes de la matriz puede producir supresión iónica (disminución de la señal del analito), lo cual ocurre en matrices complejas cuando no se logra una adecuada limpieza ("*clean-up*") de la muestra. Por este motivo, se calculó el efecto matriz obteniendo valores negativos, lo cual nos permite concluir la posibilidad de que ocurra una supresión iónica por parte de la misma (-115 %).

Según Fede y col. (2009) y Gu y col. (2010), las concentraciones de PhIP que se esperan encontrar en orina de voluntarios están por debajo de los ng/mL (ppb). Probablemente, esta sería otra de las razones por la cual no logramos detectar PhIP en orina. Por lo tanto, se consideró oportuno aumentar drásticamente el volumen de orina a 60 mL, adaptando el procedimiento a dicho volumen con el fin de concentrar la PhIP presente en la muestra; a la cual se agregó estándar con una concentración final de 60 ng/mL.

El cromatograma obtenido se muestra en la Figura 15, donde no se observó un aumento en el área del pico correspondiente a la PhIP, demostrando un efecto de supresión iónica debido a la presencia de interferentes en la matriz. Si bien la SPE cumple una doble función, como etapa de purificación y pre-concentración de la muestra, en base a los resultados obtenidos, podemos decir que el procedimiento de extracción por SPE no fue efectivo.

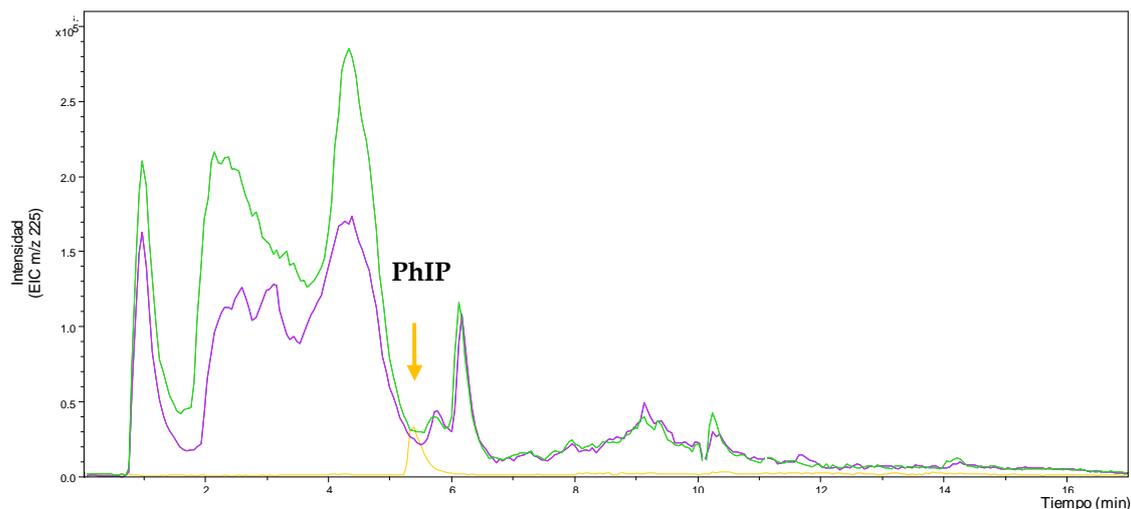


Figura 15: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con 60 ng/mL (---) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (---).

1.2 Procedimiento de extracción 2

En el segundo procedimiento ensayado se extrajo PhIP utilizando un disolvente orgánico (éter etílico), y posteriormente se realizó un proceso de *clean up* de la muestra mediante SPE (HYPERSEP retain - CX) (Figura 16). Cabe destacar que se procesaron muestras de orina blanco con y sin agregado de PhIP estándar. Nuevamente, PhIP no pudo ser detectada en las orinas fortificadas (Figura 17), sugiriendo un efecto de supresión iónica o bien una pérdida del compuesto en el cartucho de SPE.



Figura 16: Procedimiento de extracción 2

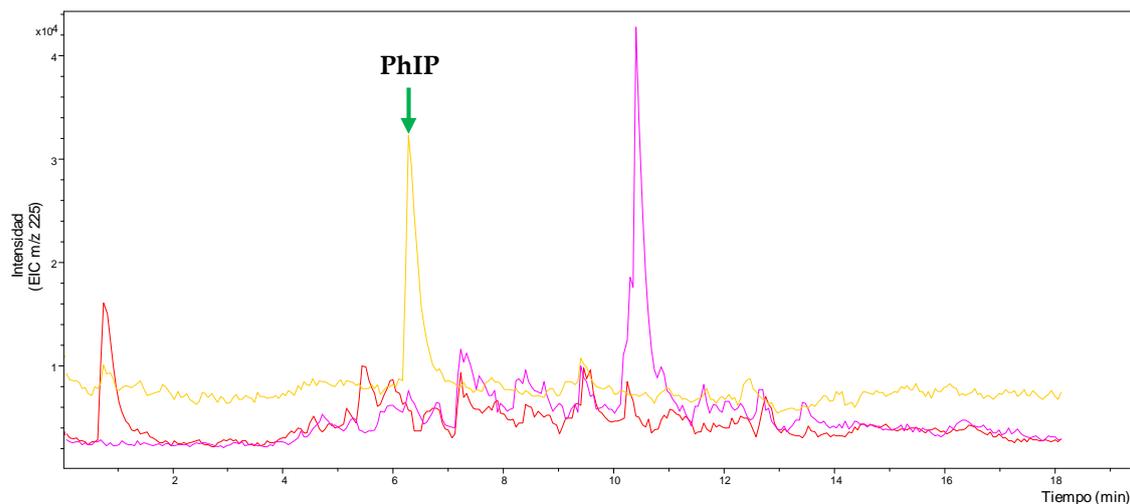


Figura 17: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP de 50 ng/mL (---) y estándar de PhIP de 50 ng/mL (---).

1.3 Procedimiento de extracción 3

Para confirmar si la extracción por SPE era ineficiente, se decidió realizar la extracción del compuesto con un disolvente orgánico, eliminando la etapa de *clean up* (Figura 18).



Figura 18: Procedimiento de extracción 3

El resultado obtenido demostró que, eliminando la extracción en fase sólida se pudo recuperar PhIP; no obstante, el porcentaje de recuperación fue muy bajo (20 %). Por lo tanto, se puede concluir que la SPE no fue eficiente para la recuperación de PhIP en muestras de orina, y que, a su vez, existe un efecto

de supresión iónica debido a la presencia de interferencias por parte de la matriz (Figura 19).

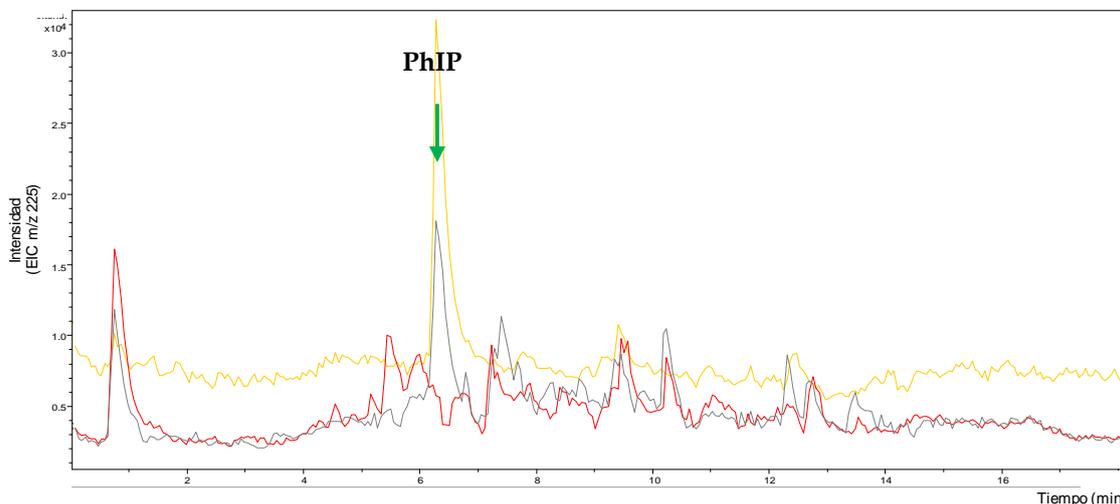


Figura 19: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP de 50 ng/mL (—) y estándar de PhIP de 50 ng/mL(---).

1.4 Procedimiento de extracción 4

Debido a que el porcentaje de recuperación obtenido en el procedimiento de extracción 3 fue muy bajo, se ensayaron otros procedimientos basados en la hidrólisis de la muestra con el fin de minimizar el efecto matriz producido por los interferentes provenientes de la misma.

El procedimiento ensayado se basó en el método desarrollado por Strickland y col. (2002) con algunas modificaciones, el cual consistió en realizar una hidrólisis ácida a la muestra de orina, y posteriormente una extracción de PhIP con acetato de etilo (Figura 20). Dicho procedimiento fue aplicado a tres volúmenes de orina diferentes (1, 2 y 3 mL), así como a muestras de orina con y sin agregado de PhIP estándar.

Aplicando la hidrólisis ácida, fue posible detectar PhIP obteniendo porcentajes de recuperación de 29 %. Si bien fue posible mejorar la recuperación con respecto a los procedimientos anteriores, la misma sigue siendo bastante

baja (Figura 21). De acuerdo a Strickland y col. (2002), PhIP puede ser conjugada en hígado con ácido glucurónico. Por esta razón, durante el tratamiento ácido de la orina podría ocurrir una deconjugación de PhIP, lo cual explicaría el ligero aumento del porcentaje de recuperación de la misma, comparado con el procedimiento anterior.



Figura 20: Procedimiento de extracción 4

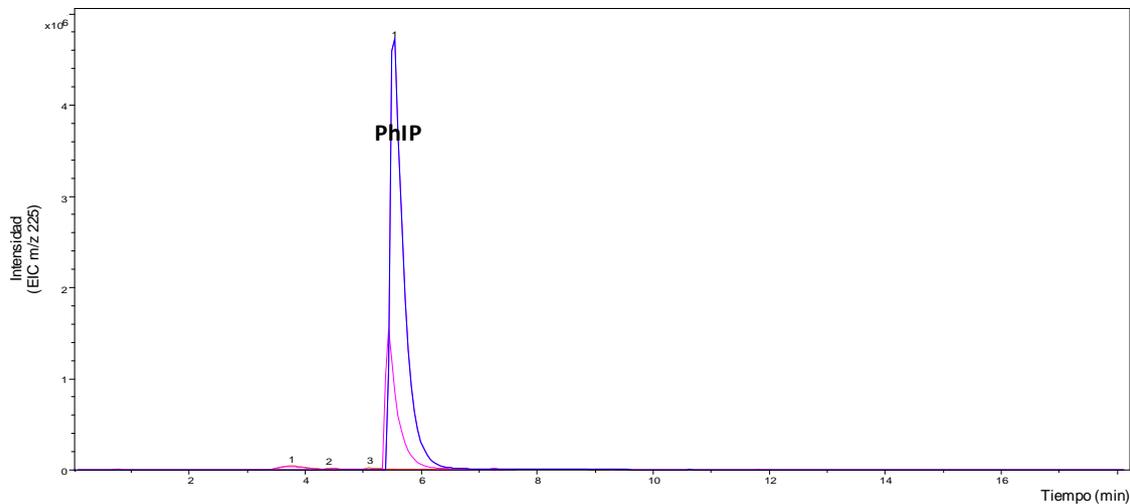


Figura 21: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (---) y estándar de PhIP de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (---).

1.5 Procedimiento de extracción 5

El último procedimiento ensayado se basó en el método desarrollado por Friesen y col. (2001) con algunas modificaciones, el cual consistió en realizar

una hidrólisis básica a las muestras de orina y posteriormente una extracción de PhIP con acetato de etilo (Figura 22). Dicho procedimiento fue aplicado también a tres volúmenes de orina diferentes (1, 2 y 3 mL), y a muestras de orina con y sin agregado de PhIP estándar.



Figura 22: Procedimiento de extracción 5

En la Figura 23 se observan dos cromatogramas de PhIP de idéntica concentración, en orina y en solución estándar, en los que se puede observar que aún existe un efecto importante de supresión de la señal. La recuperación obtenida en este caso fue de 33 %.

Asimismo, a continuación se presentan dos cromatogramas comparativos de muestras de orina blanco sin agregado externo de PhIP, una sometida a hidrólisis básica, y otra a hidrólisis ácida (Figura 24). En el segundo caso, se observó una mayor cantidad de interferentes, mientras que en el primer caso se observó una línea de base de menor señal; indicando una mejor eliminación de interferencias propias de la matriz.

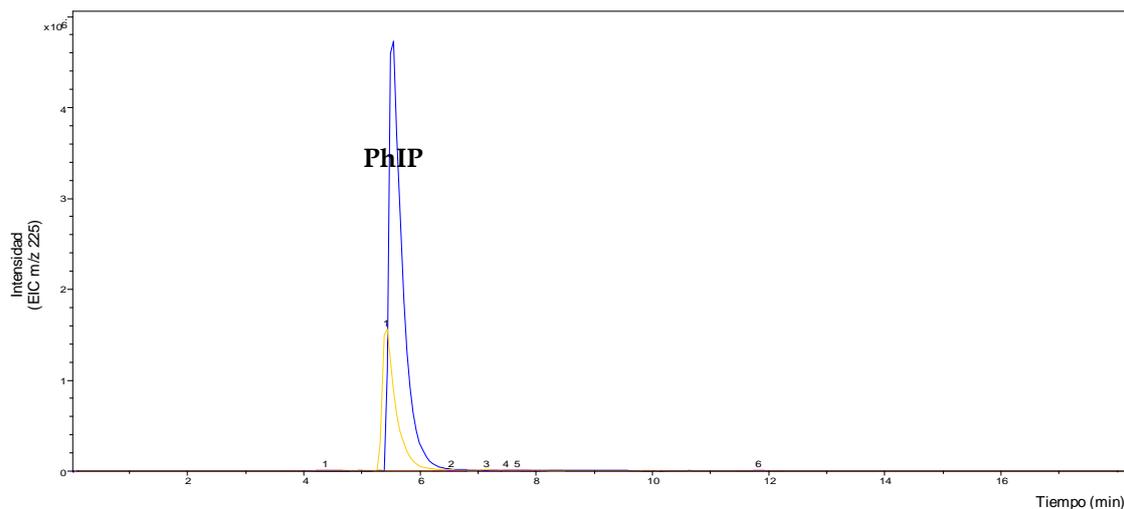


Figura 23: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco (---), orina fortificada con PhIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (---) y solución estándar de PhIP 10 $\mu\text{g/mL}$ (---).

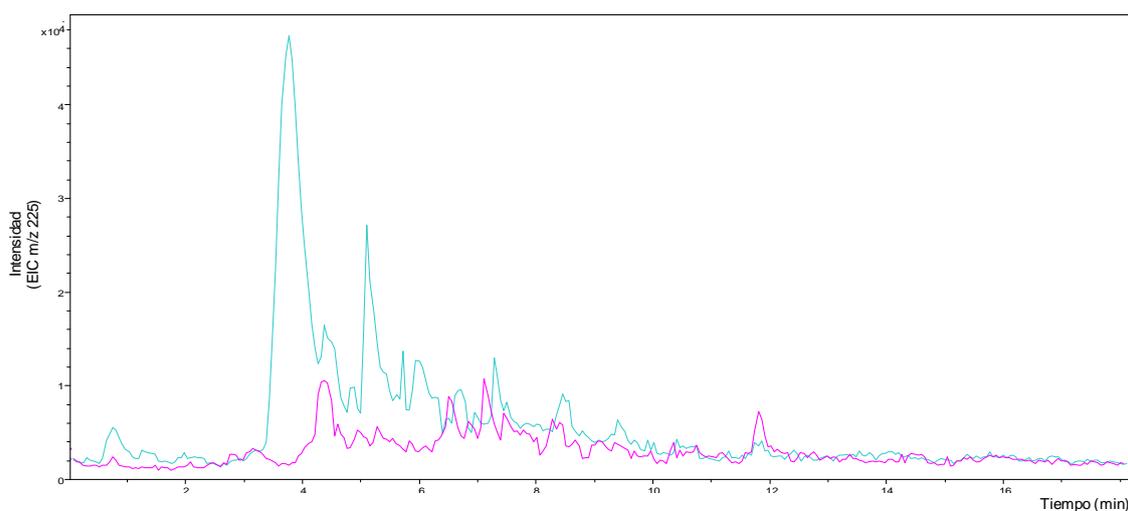


Figura 24: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina blanco sometidas a hidrólisis básica (---) e hidrólisis ácida (---).

Finalmente, el análisis de todos los datos obtenidos mediante los cinco procedimientos ensayados, sumado a esta última observación, justificó la elección de la hidrólisis básica seguida de la extracción con acetato de etilo, como método de extracción de PhIP en muestras de orinas. Dicho procedimiento consistió en hidrolizar 1 mL de la muestra de orina en buffer fosfato (pH=8) y NaOH (1N), durante 16 horas a 95°C. Luego las muestras

fueron extraídas con dos porciones de acetato de etilo y llevadas a sequedad hasta el momento de su análisis en el sistema HPLC-MS.

2 DETERMINACIÓN DE PhIP POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se explicó anteriormente, los resultados de un análisis químico pueden muchas veces estar afectados por la presencia de efectos de matriz ó por errores inherentes al método. En estos casos, se requiere también de la utilización de métodos de calibración que ayuden a minimizar estos inconvenientes. Por tal motivo, una vez elegido el procedimiento de extracción, se elaboró una curva de calibración utilizando el método de "adición de estándar". Para ello, a la orina blanco se agregaron cantidades conocidas de PhIP obteniendo concentraciones finales de 10, 50 , 200 , 1000 , 5000 y 10000 ng/mL (Figura 25), obteniendo una buena linealidad en el rango de 50 a 10000 ng/mL (Figura 26).

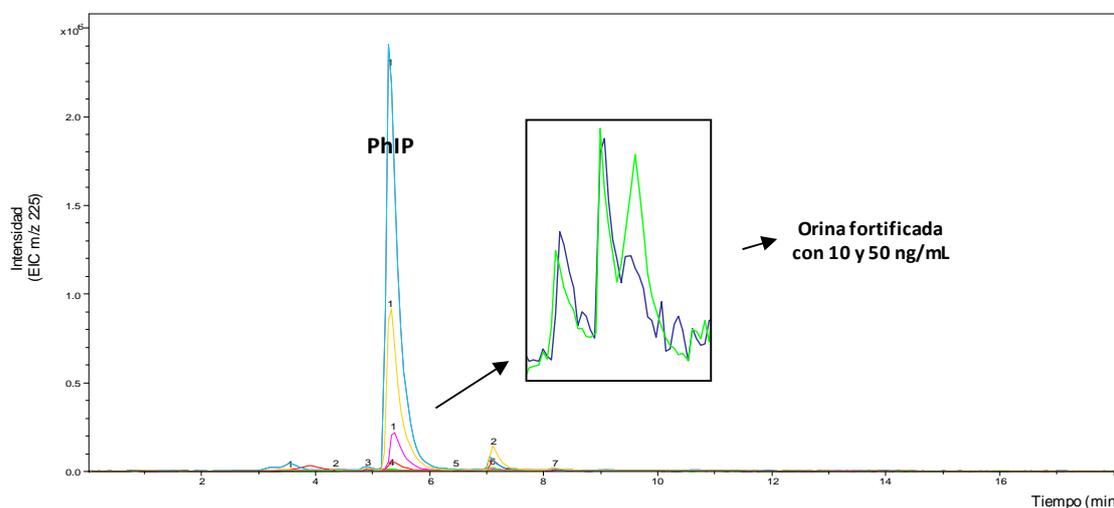


Figura 25: Cromatogramas de ión extraído (EIC) m/z 225. Orina fortificada con PhIP 10 ng/mL (—), 50 ng/mL (---), 200 ng/mL (---), 1000 ng/mL (---), 5000 ng/mL (---) y 10000 ng/mL (---).

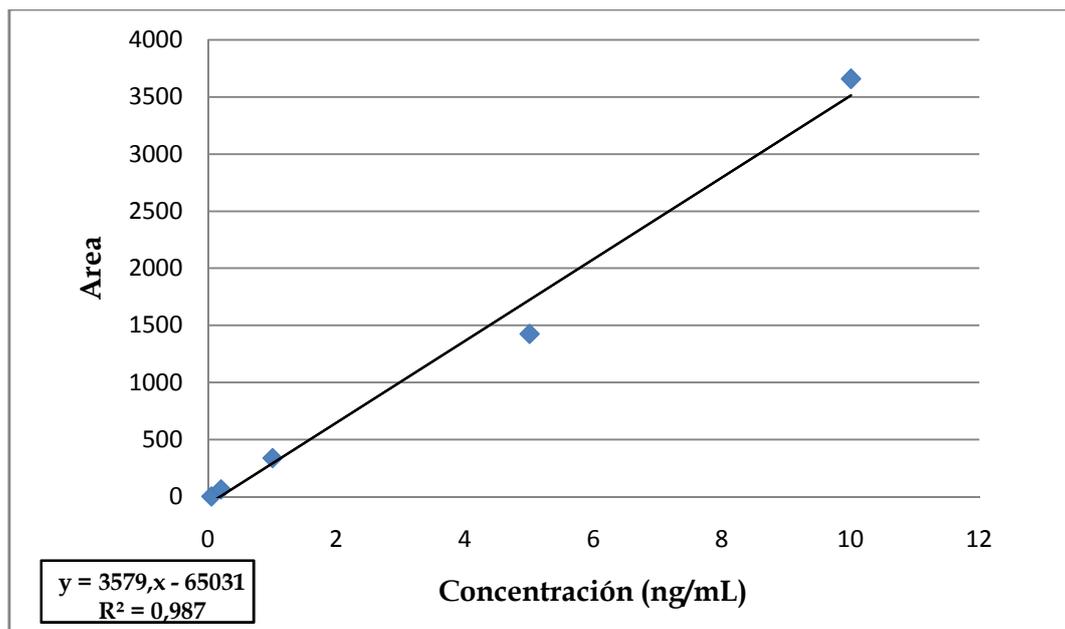


Figura 26: Curva de calibración PhIP en orina utilizando UHPLC-MS(QTOF)

Concentraciones inferiores a 50 ng/mL, no pudieron ser detectadas. Por lo tanto, si bien la metodología de extracción elegida logró eliminar en gran medida interferentes presentes en la matriz; se plantea la necesidad de mejorar la sensibilidad en la detección de PhIP, para lograr medir concentraciones inferiores a los ng/mL, de acuerdo a lo que se espera encontrar en orina de voluntarios que han consumido carnes cocidas (Fede *et al.*, 2009; Gu *et al.*, 2010).

Los espectrómetros de masas con analizador de triple cuadrupolo (QqQ) han sido ampliamente adoptados en combinación con HPLC. Este tipo de detector permite seleccionar un único ión procedente de la ionización ESI en el primer cuadrupolo, fragmentar ese ión en el segundo cuadrupolo por colisión con Ar y la aplicación de un voltaje apropiado, y separar los fragmentos con el tercer cuadrupolo antes de llegar al detector. Este proceso es una de las técnicas de espectrometría de masas en tándem (MS/MS) y permite disminuir hasta niveles mínimos el “ruido” que interfiere en la detección de los iones de interés. Basados en este fundamento, es que se decidió recurrir a un equipo de mayor sensibilidad como es el espectrómetro de masas de triple cuadrupolo, con el fin

IV. Resultados y discusión

de poder medir en rangos de concentración más bajos, obteniendo límites de detección y cuantificación menores.

La cuantificación se llevó a cabo mediante el método MRM, utilizando el ión producto m/z 210. Esta metodología brinda a la determinación una elevada sensibilidad así como selectividad para la detección del compuesto de interés. De esta manera, se logró disminuir el rango de concentraciones de PhIP en tres órdenes de magnitud. Se realizó nuevamente una curva de calibración externa con concentraciones de 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2000, 4000 pg/mL, obteniendo una buena linealidad en el rango estudiado ($R^2 = 0,995$). (Figura 27 y 28). Asimismo, se realizó una curva de calibración por adición de estándar en matriz, agregando PhIP a la orina blanco con concentraciones finales de 25, 50, 100, 250, 500, 1000 y 2000 pg/mL, obteniendo nuevamente una buena linealidad en el rango ensayado ($R^2 = 0,965$) (Figura 29 y 30).

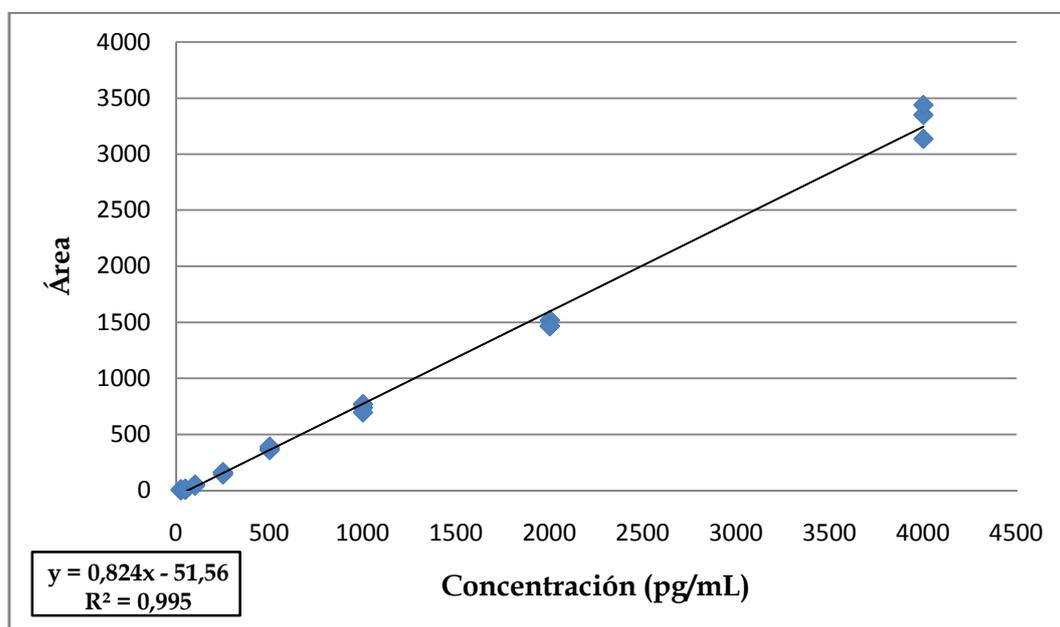


Figura 27: Curva de calibración externa de PhIP utilizando UHPLC-MS(QqQ)

IV. Resultados y discusión

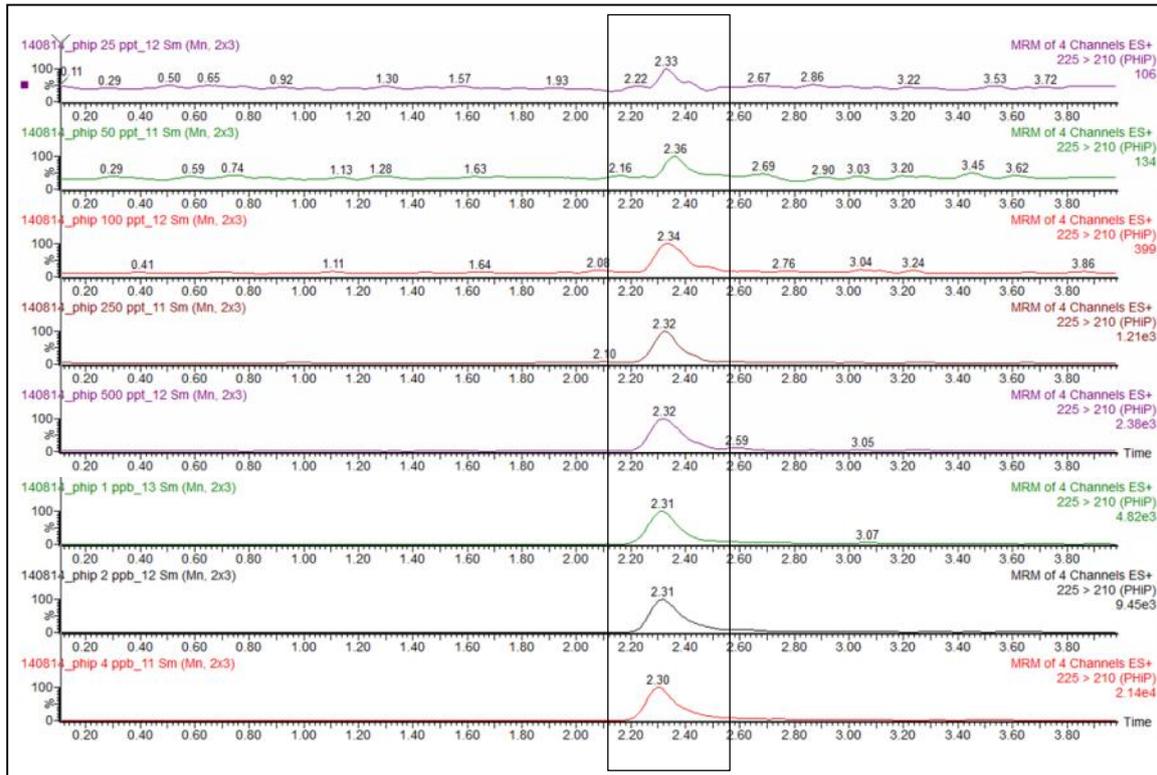


Figura 28: Cromatogramas de estándar de PhIP 25 pg/mL (----), 50 pg/mL (----), 100 pg/mL (----), 250 pg/mL(----), 500 pg/mL(----), 1000 pg/mL(----), 2000 pg/mL(----), 4000 pg/mL(----).

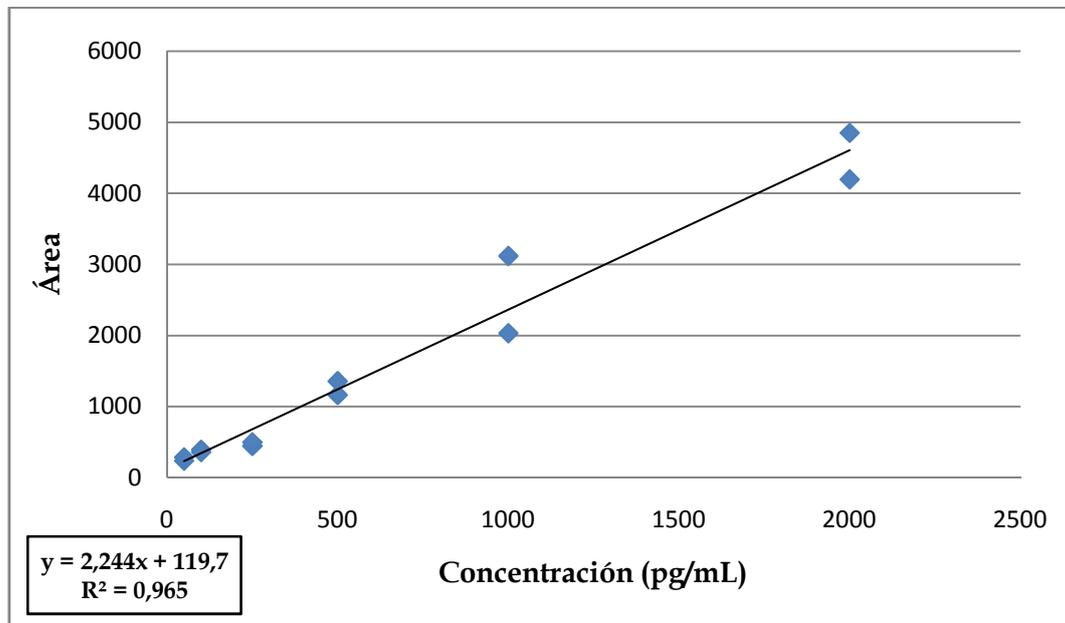


Figura 29: Curva de calibración PhIP en orina blanco utilizando detector de MS(QqQ)

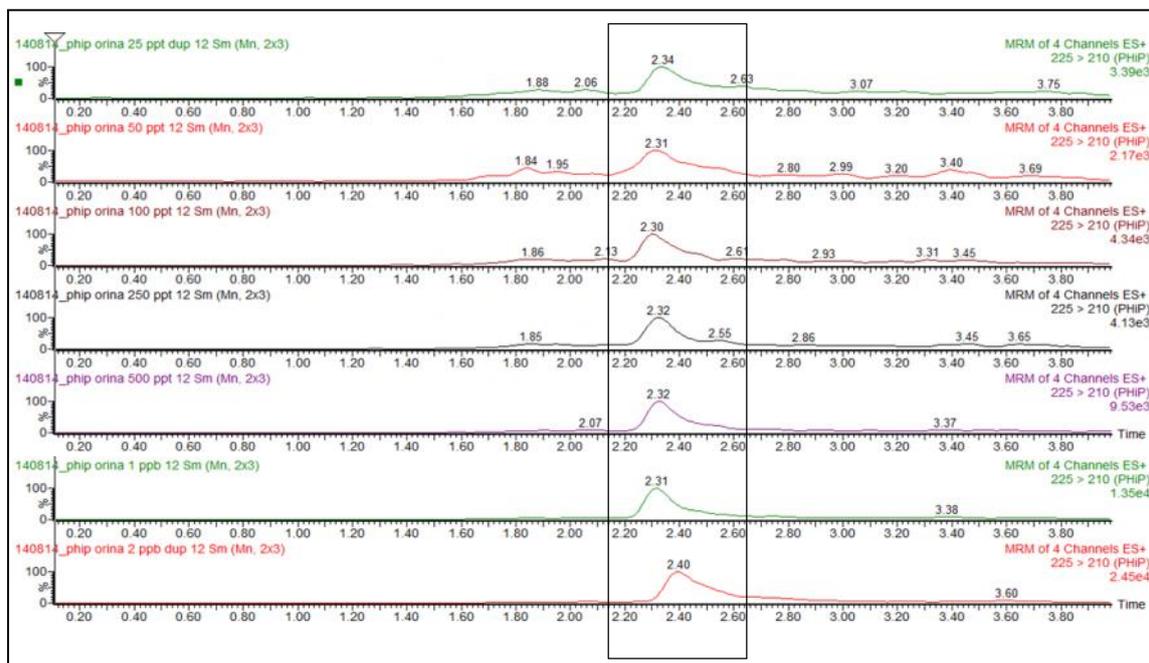


Figura 30: Cromatogramas de orina fortificada con PhIP 25 pg/mL (----), 50 pg/mL (----), 100 pg/mL (----), 250 pg/mL(----), 500 pg/mL(----), 1000 pg/mL(----), 2000 pg/mL(----).

3 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

En el presente estudio se evaluaron como parámetros de validación el rango de linealidad, el límite de detección, el límite de cuantificación y la precisión.

Como se expresó inicialmente, el objetivo del presente estudio consistió en optimizar una metodología para el análisis de PhIP en muestras de orina, ajustando en una primera instancia las condiciones de separación y detección a partir de un estándar comercial de PhIP, y posteriormente el procedimiento de extracción de la misma a partir de orina de voluntarios sanos.

Una vez que las condiciones fueron optimizadas y el procedimiento de extracción seleccionado, se determinaron los parámetros de validación anteriormente mencionados.

A partir del gráfico de área del pico vs concentración, se estableció el rango de linealidad del compuesto, cuyo coeficiente de correlación (R^2) fue superior a 0,97. Asimismo, se determinaron los límites de detección (LD) y de

cuantificación (LQ) del método en base a la relación S/R, obteniendo como resultados valores de 15,02 pg/mL y 50 pg/mL, respectivamente.

Finalmente, se evaluó la precisión del método a partir del coeficiente de variación porcentual (CV%), calculado de un mínimo de ocho determinaciones de dos réplicas, en cuatro niveles de concentración diferentes, obteniendo como valor 10,5%

4 DETERMINACIÓN DE PhIP EN ORINAS DE VOLUNTARIOS SANOS

Una vez desarrollada y validada la metodología, se procedió a la cuantificación de PhIP en muestras de orina obtenidas de voluntarios sanos (ver sección III.3.). Las tablas 5 y 6 presentan los resultados de dicha cuantificación para los seis voluntarios analizados, previa ingestión de carne vacuna magra sometida a dos tratamientos diferentes de cocción: sobre-cocción a la plancha durante 20 minutos, con formación de costra tostada; y cocción a la plancha a 70°C en el centro de la carne. Luego del consumo de carnes, se recolectaron muestras de orina en dos periodos: P1=0-6 hs y P2= 6-12 hs, posteriores a la ingesta.

Los resultados obtenidos (Tabla 5) demostraron que frente a la ingesta de carnes con sobre-cocción, se eliminaron en orina niveles de PhIP superiores, comparados con aquellos que ingirieron carnes con cocción a 70°C (Tabla 6). En la mayoría de los casos la mayor excreción de PhIP ocurrió en el primer periodo (P1), alcanzando niveles promedio de 1,6 y 0,3 ng/mL para ingesta de carnes con sobre-cocción y cocida a 70°C; respectivamente. Asimismo, la eliminación de la amina en el P2 fue significativamente menor, alcanzando valores promedio de 1,2 y 0,1 ng/mL para ingesta de carnes con sobre-cocción y cocida a 70°C; respectivamente. El análisis estadístico demostró diferencias significativas tanto en el método de cocción ($p < 0.001$), como en el momento de medición para cada sujeto ($p < 0.001$). Asimismo, no se detectó presencia de

interacción entre método y periodo de medición (Skrondal y Rabe-Hesketh, 2008).

Finalmente, el nivel de excreción urinaria de PhIP podría ser utilizado para estimar la exposición a estos compuestos en personas que consumen dietas sin restricciones, especialmente en la población de la ciudad de Córdoba, que registra elevado consumo de carne vacuna.

Tabla 5: Concentración de PhIP encontrada en orina de voluntarios sanos, previa ingesta de carne con sobre-cocción (SC). Valores promedios de 4 determinaciones (n.d.= no determinado).

Voluntario	PhIP ng/mL de orina	
	Periodo de recolección	
	P1 (0-6 hs)	P2 (6-12 hs)
JM 1 SC	1,71	1,84
MJ 2 SC	1,93	n.d.
CG 3 SC	1,71	1,11
AB 4 SC	1,39	0,89
FS 5 SC	1,90	1,17
JB 6 SC	0,90	n.d.

Tabla 6: Concentración de PhIP encontrada en orina de voluntarios sanos, previa ingesta de carne con cocción a 70°C. Valores promedios de 4 determinaciones (n.d.= no determinado).

Voluntario	PhIP ng/mL de orina	
	Periodo de recolección	
	P1 (0-6 hs)	P2 (6-12 hs)
JM 1 70°C	0,23	0,13
MJ 2 70°C	0,41	n.d.
CG 3 70°C	0,39	0,11
AB 4 70°C	0,33	0,14
FS 5 70°C	0,40	0,13
JB 6 70°C	0,31	n.d.

V CONCLUSIONES

Los niveles de excreción urinaria de aminas heterocíclicas (AHs) podrían ser utilizados para estimar la exposición a estos compuestos en personas que consumen dietas sin restricciones, especialmente en la población de la ciudad de Córdoba, que registra elevado consumo de carne vacuna. Debido a la complejidad de las matrices biológicas, así como al hecho de que estos compuestos se generan en bajas concentraciones, se plantea la necesidad de disponer de metodologías analíticas altamente sensibles para dicho propósito.

En el presente estudio, se logró validar una metodología para la extracción, identificación y cuantificación de la amina aromática heterocíclica 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo [4,5-b] piridina (PhIP) en muestras de orinas de voluntarios sanos de una población de la ciudad de Córdoba, mediante UHPLC-MS.

Los resultados obtenidos demostraron que frente a la ingesta de carnes con sobrecocción, se eliminaron en orina niveles de PhIP superiores (1,6 ng/mL), comparados con aquellos que ingirieron carnes con cocción a 70°C (0,3 ng/mL). En la mayoría de los casos la mayor excreción de PhIP ocurrió en el primer periodo de excreción, siendo significativamente menor en el segundo periodo.

Este marco de trabajo contribuiría a caracterizar nuestra población de acuerdo a la susceptibilidad a distintos agentes relacionados con enfermedades como el cáncer.

VI BIBLIOGRAFÍA

- Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC). *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*. USA; 1995. 48: 691
- Agudelo Mesa LB, Padró JM, Reta M. *Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-ionic liquid microextraction*. *Food Chemistry*. 2013; 141: 1694-1701.
- Arias González AM, Gil Cañas DM. *Estandarización de la técnica cromatografía de gases capilar para la identificación y cuantificación de fitoesteroles en semillas de luffacylindrica* [Tesis]. Pereira: Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Tecnología; 2012.
- Asociación Argentina de Dietistas y Nutricionistas. *Guías Alimentarias para la Población Argentina*, 2000.
- Aune D, Ronco A, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Barrios E, Acosta G, *et al*. *Meat Consumption and Cancer Risk: a Case-control Study in Uruguay*. *Cancer Therapy*. 2009; Vol 7: 174-187.
- Badoud F, Grata E, Perrenoud L, Saugy M, Rudaz S, Veuthey JL. *Fast analysis of doping agents in urine by ultra-high-pressure liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. II: Confirmatory analysis*. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217: 4109-4119.
- Balogh Z, Gray JI, Gomaa EA, Booren AM. *Formation and Inhibition of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Ground Beef Patties*. *Food and Chemical Toxicology*. 2000; 38: 395-401.
- Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Casanoves F, Di Rienzo JA, Robledo CW. *INFOSTAT, Manual del Usuario*, Editorial Brujas, Córdoba, Argentina; 2008.

- Becerra Herrera M. *Estudio de la composición fenólica del aceite de oliva virgen extra: caracterización y reactividad antioxidante* [Tesis doctoral]. Huelva: Universidad de Huelva. Facultad de Ciencias Experimentales; 2013.
- Bergman J. *Synthesis of a new isomer of creatinine and its use in the preparation of the food mutagen 2-amino-1-methyl-6-phenyl-1H-imidazo[4,5-b]pyridine (PHIP)*. *Tetrahedron Letters*. 2009; 50: 5631–5632.
- Busquets R, Jönsson JA, Frandsen H, Puignou L, Galceran MT, Skog K. *Hollow fibre-supported liquid membrane extraction and LC-MS/MS detection for the analysis of heterocyclic amines in urine samples*. *Mol. Nutr. Food Res*. 2009; 53: 1496–1504.
- Dai Q, Shu X, Jin F, Gao YT, Ruan ZX, Zheng W. *Consumption of Animal Foods, Cooking Methods, and Risk of Breast Cancer*. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev*. 2002; 11: 801-808.
- Damašius J, Venskutonis PR, Ferracane R, Fogliano V. *Assessment of the influence of some spice extracts on the formation of heterocyclic amines in meat*. *Food Chemistry*. 2011; 126: 149–156.
- De la Cruz Rodriguez E, Gutierrez JOH. *Formación de hidrocarburos aromáticos policíclicos y del 3,4-benzopireno en aceites alterados por recalentamiento* [Tesis]. Lima: Universidad Mayor de San Marcos. Facultad de Farmacia y Bioquímica; 2002.
- De Stefani E, Aune D, Boffetta P, Deneo-Pellegrini H, Ronco AL, Acosta G, *et al*. *Salted Meat Consumption and the Risk of Cancer: a Multisite Case-Control Study in Uruguay*. *Asian Pacific J Cancer Prev*. 2009; 10: 853-857.
- De Stefani E, Fierro L, Mendilaharsu M, Ronco A, Larrinaga MT, Balbi JC, *et al*. *Meat intake, 'mate' drinking and renal cell cancer in Uruguay: a case-control study*. *British Journal of Cancer*. 1998; 78(9): 1239-1243.

- Deneo-Pellegrini H, Boffetta P, De Stefani E, Ronco AL, Correa P, Mendilaharsu M. *Meat consumption and risk of colorectal cancer: a case-control study in Uruguay*. *Cancer Therapy*. 2005; Vol 3: 193-200.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. *InfoStat versión 2008*. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- Fede JM, Thakur AP, Gooderham NJ, Turesky RJ. *Biomonitoring of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) and Its Carcinogenic Metabolites in Urine*. *Chem Res Toxicol*. 2009; 22(6): 1096-1105.
- Felton JS, Knize MG, Bennett LM, Malfatti MA, Colvin ME, Kulp KS. *Impact of environmental exposures on the mutagenicity/carcinogenicity of heterocyclic amines*. *Toxicology*. 2004; 198(1-3): 135-145.
- Felton JS, Knize MG, Wu RW, Colvin ME, Hatch FT, Malfatti MA. *Mutagenic potency of food-derived heterocyclic amines*. *Mutation Research*. 2007; 616: 90-94.
- Frandsen H, Alexander J. *N-acetyltransferase-dependent activation of 2-hydroxiamino-1-methyl-PhIP: formation of OH-PhIP, a possible biomarker for the reactive dose of PhIP*. *Carcinogenesis*. 2000; 21: 1197-1203.
- Frandsen H, Frederiksen H, Alexander J. *5-OH-PhIP, a biomarker for the genotoxic dose of the heterocyclic amine PhIP*. *Food Chem. Toxicol*. 2002; 40: 1125-1130.
- Frandsen H. *Biomonitoring of urinary metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b]pyridine (PhIP) following human consumption of cooked chicken*. *Food and Chemical Toxicology*. 2008; 46: 3200-3205.
- Frandsen H. *Deconjugation of N-glucuronide conjugated metabolites with hydrazine hydrate-Biomarkers for exposure to the food-borne carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine(PhIP)*. *Food and Chemical Toxicology*. 2007; 45: 863-870.

- Friesen MD, Rothman N, Strickland PT. *Concentration of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5- b)pyridine (PhIP) in urine and alkali-hydrolyzed urine after consumption of charbroiled beef*. Cancer Letters. 2001; 173: 43–51.
- Fu Y, Zhao G, Wang S, Yu J, Xie F, Wang H, *et al*. *Simultaneous determination of fifteen heterocyclic aromatic amines in the urine of smokers and nonsmokers using ultra-highperformance liquid chromatography–tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A. 2014; 1333: 45–53.
- Galceran MT. *Aminas heterocíclicas en alimentos cocinados*. En: Libro de ponencias: V Congreso Internacional Alimentación, nutrición y dietética. Madrid; 2001.p. 39-47.
- García Fernández AE. *Determinación de elementos de traza y ultratrazas en muestras de suero, orina, sangre mediante ICP-MS [Tesis]*. Oviedo: Universidad de Oviedo. Facultad de Química Física y Analítica; 2012.
- Gema Arribas L. *Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos [Tesis doctoral]*. Madrid: Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Ciencias Químicas; 2013.
- Gerbl U, Cichna M, Zsivkovits M, Knasmüller S, Sontag G. *Determination of heterocyclic aromatic amines in beef extract, cooked meat and rat urine by liquid chromatography with coulometric electrode array detection*. Journal of Chromatography B. 2004; 802: 107–113.
- Gil Hernández F. *The role of biomarkers in human toxicology*. Revista de Toxicología. 2000; 17(1):19-26.
- González CA, Navarro C, Martínez C, Quirós JR, Dorronsoro M, Barricarte A, *et al*. *El estudio prospectivo europeo sobre cáncer y nutrición*. Rev Esp Salud Pública. 2004; 78: 167-176.
- Gooderham NJ, Creton S, Lauber SN, Zhu H. *Mechanisms of action of the carcinogenic heterocyclic amine PhIP*. Toxicology Letters. 2007; 168: 269–277.

VI. Bibliografía

- Gros M, Petrovic M, Barceló D. *Tracing pharmaceutical residues of different therapeutic classes in environmental waters using liquid chromatography quadrupole-linear ion trap mass spectrometry and automated library searching*. *Analytical Chemistry*. 2009; 81: 898-912.
- Gu D, McNaughton L, LeMaster D, Lake BG, Gooderham NJ, Kadlubar FF, *et al.* *A Comprehensive Approach to the Profiling of the Cooked Meat Carcinogens 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline, 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and their Metabolites in Human Urine*. *Chem Res Toxicol*. 2010; 23(4): 788-801.
- Huetos Hidalgo O. *Estudio comparativo y evaluación de diferentes técnicas cromatográficas en el análisis de residuos de corticosteroides en muestras biológicas* [Tesis doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Veterinaria; 2004
- Hwa Shin J, Na YC, Chung JH, Gorinstein S, Ahn YG. *Quantitative analysis of heterocyclic amines in urine by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*. *Analytical Biochemistry*. 2014; 447: 169-176.
- ICH (2005). *Validation of analytical procedures: Methodology*. ICH harmonised tripartite guideline. <http://www.hc-sc.gc.ca/hpb-dgps/therapeut>
[Accessed 11](#). 2009.
- Iwasaki M, Kataoka H, Ishihara J, Takachi R, Hamada GS, Sharma S, *et al.* *Heterocyclic amines content of meat and fish cooked by Brazilian methods*. *J Food Comp An*. 2010; 23: 61-69.
- Jautz U, Gibis M, Morlock GE. *Quantification of Heterocyclic Aromatic Amines in Fried Meat by HPTLC/UV-FLD and HPLC/UV-FLD: A Comparison of Two Methods*. *J. Agric. Food Chem*. 2008; 56: 4311-4319.
- Jiménez Cordon A. *Efecto matriz en la determinación de polifenoles en vino por UPLC-MS* [Tesis doctoral]. La Rioja: Universidad de La Rioja. Facultad de Ciencias, Estudios Agroalimentarios e Informática; 2012.

- Kidd LR, Stillwell WG, Yu MC, Wishnok JS, Skipper PL, Ross RK, *et al.* *Urinary Excretion of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in White, African- American, and Asian-American Men in Los Angeles County.* *Cancer Epidemiol, Biomarkers & Prev.* 1999; 8: 439-445.
- Kizil M, Oz F, Besler HT. *A Review on the Formation of Carcinogenic/Mutagenic Heterocyclic Aromatic Amines.* *J Food Process Technol.* 2011; 2:5.
- Knize MG, Dolbeare FA, Carroll KL, Moore DH, Felton JS. *Effect of cooking time and temperature on the heterocyclic amine content of fried beef patties.* *Fd Chem. Toxic.* 1994; 32(7): 595-003.
- Knize MG, Kulp KS, Malfatti MA, Salmon CP, Felton JS. *Liquid Chromatography-Tandem Mass-Spectrometry Method of Urine Analysis for Determining Human Variation in Carcinogen Metabolism.* *Journal of Chromatography A.* 2001; 914: 95-103
- Knize MG, Kulp KS, Salmon CP, Keating GA, Felton JS. *Factors affecting human heterocyclic amine intake and the metabolism of PhIP.* *Mutation Research.* 2002; 506-507: 153-162.
- Knize MG, Salmon CP, Hopmans EC, Felton JS. *Analysis of foods for heterocyclic aromatic amine carcinogens by solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography.* *Journal of Chromatography A.* 1997; 763: 179-185.
- Kobayashi M, Otani T, Iwasaki M, Natsukawa M, Shaura K, Koizumi Y, *et al.* *Association between dietary heterocyclic amine levels, genetic polymorphisms of NAT2, CYP1A1, and CYP1A2 and risk of stomach cancer: a hospital-based case-control study in Japan.* *Gastric Cancer.* 2009; 12: 198-205.
- Lan CM, Kao TH, Chen BH. *Effects of heating time and antioxidants on the formation of heterocyclic amines in marinated foods.* *Journal of Chromatography B.* 2004; 802: 27-37.
- Lezamiz J, Barri T, Jönsson JÅ, Skog K. *A simplified hollow-fibre supported liquid membrane extraction method for quantification of 2-amino-1- methyl-6-*

- phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in urine and plasma samples. Anal Bioanal Chem.* 2008; 390: 689–696.
- Liu JF, Li N, Jiang GB, Liu JM, Jonsson JA, Wen MJ. *Disposable ionic liquid coating for headspace solid-phase microextraction of benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes in paints followed by gas chromatography-flame ionization detection. J. Chromatogr. A.* 2005; 1066 (1-2): 27-32.
- Mariné A, Vidal MC. *Seguridad y riesgo de toxicidad de los alimentos: un debate actual. Arbor* CLXVIII. 2001; 661: 43-63.
- Martín Calero A. *Desarrollo y optimización de nuevos métodos para el análisis de aminas heterocíclicas* [Tesis doctoral]. Canarias: Servicios de Publicaciones Universidad de La Laguna; 2009.
- Matos E, Brandani A. *Review on meat consumption and cancer in South America. Mutation Research.* 2002; 506–507: 243–249.
- Messner C, Murkovic M. *Evaluation of a new model system for studying the formation of heterocyclic amines. Journal of Chromatography B.* 2004; 802: 19–26.
- Murkovic M. *Formation of heterocyclic aromatic amines in model systems. Journal of Chromatography B.* 2004; 802: 3–10.
- Navarro A, Muñoz SE, Lantieri MJ, Díaz MP, Cristaldo PE, Fabro SP, *et al.* *Meat cooking habits and risk of colorectal cancer in Córdoba, Argentina. Nutrition.* 2004; 20: 873-877.
- Nödler K, Licha T, Bester K, Sauter M. *Development of a multi-residue analytical method, based on liquid chromatography–tandem mass spectrometry, for the simultaneous determination of 46 micro-contaminants in aqueous samples. Journal of Chromatography A.* 2010; 1217: 6511–6521.
- Nöthlings U, Yamamoto JF, Wilkens LR, Murphy SP, Park SY, Henderson BE, *et al.* *Meat and Heterocyclic Amine Intake, Smoking, NAT1 and NAT2*

- Polymorphisms, and Colorectal Cancer Risk in the Multiethnic Cohort Study.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2009; 18(7): 2098-2106.
- Oz F, Kaban G, Kaya M. *Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method.* LWT - Food Science and Technology. 2010; 43: 1345-1350.
- Oz F, Kaban G, Kaya M. *Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout.* Food Chemistry. 2007; 104: 67-72.
- Ptolemy AS, Tzioumis E, Thomke A, Rifai S, Kellogg M. *Quantification of theobromine and caffeine in saliva, plasma and urine via liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A single analytical protocol applicable to cocoa intervention studies.* Journal of Chromatography B. 2010; 878: 409-416.
- Puangsoombat K, Gadgil P, Houser TA, Hunt MC, Smith JS. *Heterocyclic amine content in commercial ready to eat meat products.* Meat Science. 2011; 88: 227-233.
- Rahman U, Sahar A, Khan MI, Nadeem M. *Production of heterocyclic aromatic amines in meat: Chemistry, health risks and inhibition. A review.* LWT - Food Science and Technology. 2014; 59: 229-233.
- Reartes G. *Evaluación de aminas aromáticas heterocíclicas (HAAS) carcinogénicas y/o mutagénicas en carnes sometidas a distintos procesos de cocción y en fluidos biológicos, como potenciales biomarcadores de exposición [Tesis doctoral en curso].* Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba. Facultad de Ciencia Médicas, Escuela de Nutrición; 2015.
- Rohrmann S, Hermann S, Linseisen J. *Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: findings from a prospective European cohort study.* Am J Clin Nutr. 2009; 89: 1418-1424.

- Rohrmann S, Linseisen J, Becker N, Norat T, Sinha R, Skeie G, *et al.* *Cooking of meat and fish in Europe – results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)*. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2002; 56: 1216–1230.
- Rohrmann S, Lukas Jung SU, Linseisen J, Pfau W. *Dietary intake of meat and meat-derived heterocyclic aromatic amines and their correlation with DNA adducts in female breast tissue*. *Mutagenesis* 2008; 1–6.
- Salmon CP, Knize MG, Felton JS. *Effects of Marinating on Heterocyclic Amine Carcinogen Formation in Grilled Chicken*. *Food and Chemical Toxicology*. 1997; 35: 433-441.
- Sanz Alaejos M, Ayala JH, González V, Afonso AM. *Analytical methods applied to the determination of heterocyclic aromatic amines in foods*. *Journal of Chromatography B*. 2008; 862: 15–42.
- Sinha R, Rothman N. *Role of well-done, grilled red meat, heterocyclic amines (HCAs) in the etiology of human cancer*. *Cancer Letters*. 1999; 143: 189-194.
- Sinha R, Knize MG, Salmon CP, Brown ED, Rhodes D, Felton JS, *et al.* *Heterocyclic Amine Content of Pork Products Cooked by Different Methods and to Varying Degrees of Doneness*. *Food Chem. Toxicol.* 1998; 36: 289-297. (B)
- Sinha R, Rothman N, Brown ED, Mark SD, Hoover RN, Caporaso NE, *et al.* *Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans*. *Cancer Res*. 1994; 54: 6154-6159.
- Sinha R, Rothman N, Salmon CP, Knize MG, Brown ED, Swanson CA, *et al.* *Heterocyclic Amine Content in Beef Cooked by Different Methods to Varying Degrees of Doneness and Gravy made from Meat Drippings*. *Food and Chemical Toxicology*. 1998; 36: 279-287. (A)
- Skog K, Augustsson K, Steineck G, Stenberg M, Jagerstad M. *Polar and Non-polar Heterocyclic Amines in ,Cooked Fish and Meat Products and their*

- Corresponding Pan Residues*. Food and Chemical Toxicology. 1997; 35: 555-565.
- Skog K. *Problems associated with the determination of heterocyclic amines in cooked foods and human exposure*. Food and Chemical Toxicology. 2002; 40: 1197-1203.
- Skoog DA, Holler FJ, Nieman TA. *Principios de análisis instrumental*. 5ta ed. Editorial McGraw-Hill/Interamericana de España, S.A.U. Madrid. España 1992.
- Skrondal A, Rabe-Hesketh S. *Multilevel and Longitudinal Modeling using Stata*. Chapman & Hall/ CRC Press. Boca Raton, FL: 2008
- Stavric B, Lau BP, Matula TI, Klassen R, Lewis D, Downie RH. *Heterocyclic Aromatic Amine Content in Pre-processed Meat Cuts Produced in Canada*. Food and Chemical Toxicology. 1997; 35: 199-206.
- Stillwell WG, Kidd LCR, Wishnok JS, Tannenbaum SR, Sinha R. *Urinary Excretion of Unmetabolized and Phase II Conjugates of 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and 2-Amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline in Humans: Relationship to Cytochrome P450iA2 and N-Acetyltransferase Activity*. Cancer research. 1997; 57: 3457-3464.
- Strickland PT, Qian Z, Friesen MD, Rothman N, Sinha R. *Metabolites of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo(4,5-b)pyridine (PhIP) in human urine after consumption of charbroiled or fried beef*. Mutation Research. 2002; 506-507: 163-173.
- Taylor VH, Misra M, Mukherjee SD. *Is red meat intake a risk factor for breast cancer among premenopausal women?*. Breast Cancer Res Treat. 2009; 117: 1-8.
- Teunissen SF, Rosing H, Schinkel AH, Schellens JHM, Beijnen JH. *Review on the analysis of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine and its phase I and phase II metabolites in biological matrices, foodstuff and beverages*. Journal of Chromatography B. 2010; 878: 3199-3216.

- Toribio F, Galceran MT, Puignou L. *Separation of heteroaromatic amines in food products*. Journal of Chromatography B. 2000; 747: 171–202.
- Toribio F, Puignou L, Galceran MT. *Evaluation of different clean-up procedures for the analysis of heterocyclic aromatic amines in a lyophilized meat extract*. Journal of Chromatography A. 1999; 836: 223–233.
- Toribio F. *Desarrollo de metodología analítica basada en el uso de técnicas combinadas para la determinación de aminas heterocíclicas en alimentos [tesis doctoral]*. Barcelona: Universidad de Barcelona. Departamento de Química Analítica; 2003.
- Turesky RJ, Le Marchand L. *Metabolism and Biomarkers of Heterocyclic Aromatic Amines in Molecular Epidemiology Studies: Lessons Learned from Aromatic Amines*. Chem Res Toxicol. 2011; 24(8): 1169–1214.
- Turesky RJ. *Formation and biochemistry of carcinogenic heterocyclic aromatic amines in cooked meats*. Toxicology letters. 2007; 168: 219 - 227.
- Van Dyck MMC, Rollmann B, De Meester C. *Quantitative estimation of heterocyclic aromatic amines by ion-exchange chromatography and electrochemical detection*. Journal of Chromatography A. 1995; 697: 377-382.
- Viberg P, Wahlund KG, Skog K. *On-line capillary based quantitative analysis of a heterocyclic amine in human urine*. Journal of Chromatography A. 2006; 1133: 347–352.
- Walters DG, Young PJ, Agus C, Knize MG, Boobis AR, Gooderham NJ, et al. *Cruciferous vegetable consumption alters the metabolism of the dietary carcinogen 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP) in humans*. Carcinogenesis. 2004; 25(9): 1659-1669.
- Warzecha L, Janoszka B, Błaszczyk B, Strózyk UM, Bodzek D, Dobosz C. *Determination of heterocyclic aromatic amines (HAs) content in samples of household-prepared meat dishes*. Journal of Chromatography B. 2004; 802: 95–106.

Wei Zheng MD, Sang-Ah L. *Well-done Meat Intake, Heterocyclic Amine Exposure, and Cancer Risk*. *Nutr Cancer*. 2009; 61(4): 437–446.

Weisburger JH. *Approaches for chronic disease prevention based on current understanding of underlying mechanisms*. *Am J Clin Nutr*. 2000; 71 (6): 1710S - 4S.

Yao Y, Peng ZQ, Wan KH, Shao B, Shi JM, Zhang YW, *et al*. *Determination of heterocyclic amines in braised sauce beef*. *Food Chemistry*. 2013; 141: 1847–1853.

Zhao XM, Metcalfe CD. *Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization liquid chromatography - Tandem mass spectrometry: Analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater*. *Anal. Chem*. 2008; 80: 2010-2017.

Zöchling S, Murkovic M. *Formation of the heterocyclic aromatic amine PhIP: identification of precursors and intermediates*. *Food Chemistry*. 2002; 79: 125–134.

