



**Somos calidad,
somos USC**

Determinación de nitrosaminas en cervezas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y microextracción en fase sólida

Autores

**Sara López Londoño
Hilari Andrea Estupiñán Alomia**

**Título por el que opta
Químico**

Director

Dr. Jhon Jairo Ríos Acevedo

Grupo de Investigación

Grupo de Investigación en Electroquímica y Medio Ambiente (GIEMA)

**Línea de Investigación
Alimentos y Fármacos**

**Facultad de Ciencias Básicas
Química
Universidad Santiago de Cali
Santiago de Cali - Colombia
2025**

IMPACTOS

IMPACTO	PRODUCTO	BENEFICIARIO(S)
Económico	Disminución en los gastos de los análisis.	Usuarios interesados en aplicar la metodología.
Responsabilidad social	Procedimiento alineado con Química Verde. Con uso reducido de solventes.	Toda la población, por la reducción de impacto ambiental.
Científico	Implementación de un método innovador de microextracción.	Investigadores y Comunidad académica.
Indicadores de Gestión	Capacitación de personal. Calidad y producción científica.	Universidad Santiago de Cali.
Ambiental	Método ambientalmente amigable, Acorde con los principios de la Química Verde.	Toda la población, debido a un menor nivel de contaminación en el ambiente.
Social	Formación de talento humano.	Universidad Santiago de Cali.

DETERMINACIÓN DE NITROSAMINAS EN CERVEZAS POR CROMATROGRAFIA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASAS Y MICROEXTRACCION EN FASE SÓLIDA

Sara Lopez Londoño¹, Hilari Andrea Estupiñan Alomia², PhD Jhon Jairo Rios Acevedo³

Sara.lopez03@usc.edu.co¹; hilari.estupinan00@usc.edu.co²; jhon.rios04@usc.edu.co³
Grupo GIEMA, Facultad de ciencias básicas, Universidad Santiago de Cali

RESUMEN

Las *N*-nitrosaminas son compuestos orgánicos con potenciales carcinogénicos y otros efectos adversos que representa una preocupación para la salud pública por su presencia en alimentos y bebidas. Durante el proceso de malteado y fermentación de la cerveza, precursores como la cebada o el agua pueden favorecer la formación de estas sustancias. En este estudio, se desarrolló una metodología para la cuantificación de cuatro *N*-nitrosaminas en cerveza artesanales e industriales mediante microextracción en fase solida por espacio de cabeza (HS-SPME) acoplada a cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS). Esta técnica se caracteriza por ser poco contaminante, económica y precisa para la determinación de nitrosaminas volátiles. Se aplicó el método experimental simplex del tipo $N + (N + 1)$ Para la optimización de extracción SPME, evaluando diferentes parámetros con el fin de mejorar la separación de picos y la sensibilidad del método. Se obtuvo una mejor respuesta utilizando una fibra de PDMS, un tiempo de extracción de 60 min, un volumen de muestra de 20 ml, una temperatura de 50 °C y una velocidad de agitación de 150 RPM, por otra parte, no se observaron mejoras significativas en la eficiencia de extracción al modificar su fuerza iónica. El método fue validado mediante la determinación de su linealidad, límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), concluyendo que ninguna de las nitrosaminas analizadas se encontraba presente en las muestras de cerveza artesanales e industriales evaluadas.

Palabras clave: HS-SPME, *N*-Nitrosaminas, GC-MS, Validación de métodos, Cerveza.

ABSTRACT

N-nitrosamines are organic compounds with carcinogenic potential and other adverse effects that pose a public health concern due to their presence in food and beverages. During the malting and fermentation process of beer, precursors such as barley or water can promote the formation of these substances. In this study, a methodology was developed for the quantification of four *N*-nitrosamines in craft and industrial beers using headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). This technique is characterized by being low in contamination, economical, and accurate for the determination of volatile nitrosamines. The $N + (N + 1)$ simplex experimental method was applied for SPME extraction optimization, evaluating different parameters in order to improve peak separation and the sensitivity of the method. A better response was obtained using a PDMS fiber, an extraction time of 60 min, a sample volume of 20 ml, a temperature of 50°C, and a stirring speed of 150 RPM. On the other hand, no significant improvements in extraction efficiency were observed when modifying its ionic strength. The method was validated by determining its linearity, limit of detection (LOD), and limit of quantification (LOQ), concluding that none of the nitrosamines analyzed were present in the craft and industrial beer samples evaluated.

Keywords: HS-SPME, *N*-Nitrosamines, GC-MS, Method validation, Beer.

1. INTRODUCCIÓN

Las *N*-nitrosaminas (*N*-NAS) son compuestos orgánicos pertenecientes al grupo de los *N*-nitrosos. Se forman a partir de aminas secundarias cuando el nitrógeno de estas se une a un grupo nitroso, lo que les confiere su estructura característica. Los sustituyentes unidos al nitrógeno pueden variar desde un simple átomo de hidrógeno hasta cadenas alifáticas, anillos aromáticos como el benceno o incluso estructuras heterocíclicas más complejas.^{1,2}

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a las *N*-nitrosaminas como genotóxicas en diversos animales y carcinógenas en humanos.³ Su ingesta excesiva a través de alimentos contaminados puede generar efectos adversos como daño hepático, alteraciones plaquetarias e incluso intoxicación sistémica.⁴ Además, varias *N*-nitrosaminas pueden ser bioactivadas no solo en el hígado, sino también en tejidos extrahepáticos como esófago, colon, vejiga, bronquios y páncreas. Este proceso da lugar a metabolitos capaces de inducir daño genómico en distintos órganos, lo que respalda su clasificación como carcinógenos en múltiples sistemas por parte de la IARC.⁵

La presencia de estos compuestos carcinógenos en diferentes productos genera preocupación en salud pública. Estudios recientes han reportado su detección en plantas de tratamiento de agua potable,⁶ cárnicos procesados (como jamón y embutidos),⁷ pescados procesados,⁸ fármacos (por ejemplo, valsartán o metformina) y bebidas alcohólicas como vino y cerveza.^{9,10} La concentración de estas nitrosaminas varía según el medio y los procesos fisicoquímicos a los que se expongan. Entre los compuestos más detectados en alimentos con potencial carcinogénico destacan la *N*-nitrosodimetilamina (NDMA), *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosometilamina (NMEA), *N*-nitrosopirrolidina (NPyr), *N*-nitrosopiperidina (NPip) y *N*-nitrosodibutilamina (NDBA).⁵

En Colombia, el consumo de cerveza ha mostrado un crecimiento sostenido en los últimos años, reflejado tanto en el aumento de la producción nacional como en el consumo per cápita. En 2023, la producción alcanzó 2,45 mil millones de litros, ubicando al país en el puesto 14 a nivel mundial, de acuerdo con el Global Beer Consumption Report de Kirin Holdings.¹¹ En cuanto al consumo, los colombianos beben actualmente alrededor de 60 litros de cerveza por habitante al año, situándose en el tercer lugar en América Latina, después de Brasil y México.¹²

Estudios han demostrado que la malta de cebada constituye una fuente principal de precursores de *N*-nitrosaminas en cerveza. Durante el proceso de secado (kilning), los óxidos de nitrógeno presentes en el aire pueden reaccionar con aminas y alcaloides formados durante la germinación de la cebada (hordenina y gramina), lo que favorece la formación de *N*-nitrosaminas.^{13,14} La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) reconoce a estos alcaloides como precursores importantes de *N*-NAS en bebidas malteadas, atribuyendo su formación principalmente a la cebada/malta.¹⁵

La determinación de nitrosaminas en alimentos y bebidas se ha abordado mediante diversas técnicas analíticas que han evolucionado con el tiempo. En matrices como cerveza, vino, productos cárnicos procesados y agua, los primeros estudios emplearon extracción líquido-líquido con diclorometano acoplada a cromatografía de gases con analizador de energía térmica,¹⁶ cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) con detección de fotoconductividad y cromatografía líquida de alta resolución con fotohidrólisis poscolumna y detección colorimétrica.^{17,18} También se han desarrollado técnicas más recientes, como la extracción de electromembrana de fibra hueca bifásica con membrana líquida de soporte directo acoplada a GC-MS, así como el uso de fibras huecas de polipropileno combinadas con HPLC y detección con arreglo de diodos.^{19,20}

Con el avance instrumental, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y la cromatografía líquida con detectores más selectivos se han consolidado como técnicas de referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad. Paralelamente, las estrategias de preparación de muestras han evolucionado

hacia métodos más limpios y eficientes. Entre estas destaca la microextracción en fase sólida (SPME), especialmente en combinación con GC–MS, por su capacidad de preconcentrar analitos volátiles y semivolátiles, además de reducir el uso de solventes y simplificar el proceso analítico.^{21,22}

El objetivo de este trabajo es optimizar la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) y validar el método SPME acoplado a cromatografía de gases–espectrometría de masas (GC–MS) para la cuantificación de nitrosaminas en cerveza, con el fin de disponer de un método más eficiente y sensible que permita actualizar el estudio de estas sustancias en una bebida de alto consumo y cada vez más diversa, gracias al crecimiento comercial de las cervezas industriales y artesanales.

2. METODOLOGÍA

2.1 Materiales y reactivos

Las nitrosaminas volátiles (NAs) evaluadas fueron: *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosodi-*n*-butilamina (NDBA), *N*-nitrosodi-*n*-propilamina (NDPA) y *N*-nitrosopiperidina (NPIP), adquiridas de Agilent como mezcla multicomponente (EPA 521). Se preparó una solución estándar a una concentración de 40 µg/mL en metanol grado HPLC, la cual se almacenó en viales de vidrio ámbar a 4 °C en ausencia de luz. El agua tipo I (18.2 MΩ·cm) se obtuvo mediante un sistema de purificación Merck Millipore (Billerica, MA U.S.A.). El NaCl usado se adquirió en Sigma Aldrich Merck (S9888), por otro lado, el gas portador utilizado fue helio grado 5.0.

2.2. Instrumentación

El análisis se realizó en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de cuadrupolo simple (GCMS-QP2020 NX, SHIDMAZU), equipado con una columna capilar HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Las condiciones cromatográficas fueron: inyección en modo splitless, con la rampa que se muestra en la tabla 1. El helio se empleó como gas portador a un flujo de 0.8 mL/min. La temperatura del interfaz y fuentes de iones se fijaron a 220 °C, mientras que la inyección se mantuvo a 250 °C.

Tabla 1. Rampa térmica de la columna cromatográfica

Velocidad (°C/min)	Temperatura (°C)	Tiempo total (min)
-	60	2
5	75	3
10	90	3
5	102	3
5	140	3

2.3. Microextracción en fase sólida (SPME)

Se evaluaron dos fibras de microextracción en fase sólida (SPME) de sílice fundida, recubiertas con Polidimetilsiloxano (PDMS) y carboxeno/ Polidimetilsiloxano (CAR/PDMS), todas adquiridas de Agilent. Para la optimización del método por HS-SPME se emplearon soluciones estándar de los analitos en agua tipo I, preparadas a concentraciones conocidas (10-50 µg/L) en viales de vidrio. La agitación se mantuvo mediante una plancha magnética y la temperatura fue monitoreada con un termómetro. Antes de cada inyección, la fibra se acondiciona en el inyector del cromatógrafo de gases a 250°C con el fin de activarla y la eliminar posibles compuestos residuales. Se evaluaron los parámetros de extracción para optimizar la metodología: temperatura

2.5. Características analíticas del método

Se realizó curvas analíticas obtenidas a partir de estándares de las *N*-NAs en cinco niveles de concentración, cada uno por triplicado, dentro de un rango lineal de 10-50 ug/L. Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) se calcularon según los criterios de la IUPAC, utilizando $LOD = 3SB/m$ y $LOQ = 10SB/m$, donde SB corresponde a la desviación estándar del blanco y *m* a la pendiente de la curva de calibración. Los parámetros de regresión se evaluaron mediante análisis estadístico, aplicando la prueba t-student al coeficiente de correlación, con el fin de verificar la significancia estadística de la relación lineal entre la concentración y la respuesta del instrumento. Por otro lado, la linealidad del método fue corroborada mediante el análisis de varianza evaluando la significancia de la regresión frente a la variabilidad residual, mediante la prueba F con un nivel de confianza del 95% ($\alpha = 0,05$). La precisión se evaluó como la desviación estándar relativa intradía ($n = 5$). La exactitud se determinó mediante pruebas de recuperación ($n = 5$) en muestras de cerveza libres de NAs, adicionadas con cantidades conocidas de los analitos.

2.6. preparación de la muestra

Se analizaron seis muestras de cervezas (tres artesanales y tres industriales). Las muestras fueron desgasificadas y posteriormente almacenadas a 4 °C hasta su análisis. Antes de la determinación las muestras se transfirieron al montaje de extracción aplicando las condiciones establecidas en la etapa de la optimización de método.

2.7. Análisis GC-MS

Una vez realizado la microextracción, la fibra se desorbió en el puerto de inyección del cromatógrafo de gases (GC). El sistema operó con una fuente de ionización por impacto de electrones (EI) y un analizador cuadrupolo simple, en modo de iones positivos. Las temperaturas de la fuente de ionización y de la línea de transferencia se fijaron en 220 °C. La corriente de emisión del filamento se estableció en 250 μ A, con electrones de 70 eV. El voltaje del multiplicador de electrones fue de 2153 V y la tasa de adquisición de datos de 100 Dwells (ms). El tiempo de corte del disolvente se fijó en 3 min. Se empleó el modo de barrido completo en un rango de 50-500 *m/z*, y los espectros obtenidos se compararon con la biblioteca NIST 14.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Optimización de las condiciones experimentales para SPME

En la optimización del método de extracción por SPME, se evaluaron dos fibras: una recubierta con PDMS y otra con CAR/PDMS. Se observó un área mayor para la primera fibra, (ver figura 2). Esta diferencia puede atribuirse principalmente a su composición y mecanismo de extracción. El recubrimiento de la primera al ser monofásico funciona como una fase absorbente donde los analitos se disuelven en el polímero de acuerdo con su polaridad lo que favorece la captura de todas las nitrosaminas de interés. Por otro lado, la fibra CAR/PDMS combina partículas sólidas de carboxen con PDMS (fase mixta), y actúa por adsorción en microporos, lo que limita la extracción.²³

En la evaluación de los parámetros establecidos en el diseño experimental de la Tabla 2, se consideró como ideal para cada variable aquella condición que, según la respuesta analítica, presentara una mayor área en el cromatograma. Esto se fundamenta en que la técnica SPME depende del equilibrio de distribución de los analitos entre la matriz y el recubrimiento de la fibra, de modo que la extracción es satisfactoria cuando dicho equilibrio se alcanza.²⁴

Respecto al tiempo de extracción, se evaluaron 30, 60 y 90 min. Los resultados (Figura 2) mostraron que 60 minutos constituyen la condición óptima, al permitir un equilibrio adecuado y mejor sensibilidad en la extracción de las nitrosaminas. En cuanto a la temperatura, se determinó que 50 °C proporciona un equilibrio térmico que garantiza una mayor intensidad en señales cromatográficas. Para el volumen de muestra, se observó que 20 mL

proporcionan un buen rendimiento; volúmenes mayores afectan el equilibrio entre la fibra y los analitos, reduciendo la eficiencia de la extracción. En cuanto a la agitación, 150 RPM resultó ser la mejor condición, al favorecer el transporte de masa y disminuir el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio. Finalmente, se evaluó el efecto de la fuerza iónica (salting-out) mediante la adición de NaCl,²⁵ sin observarse un impacto significativo en la volatilidad ni en la reproducibilidad de las NAMs, por lo que esta variable no se consideró dentro de las condiciones finales.

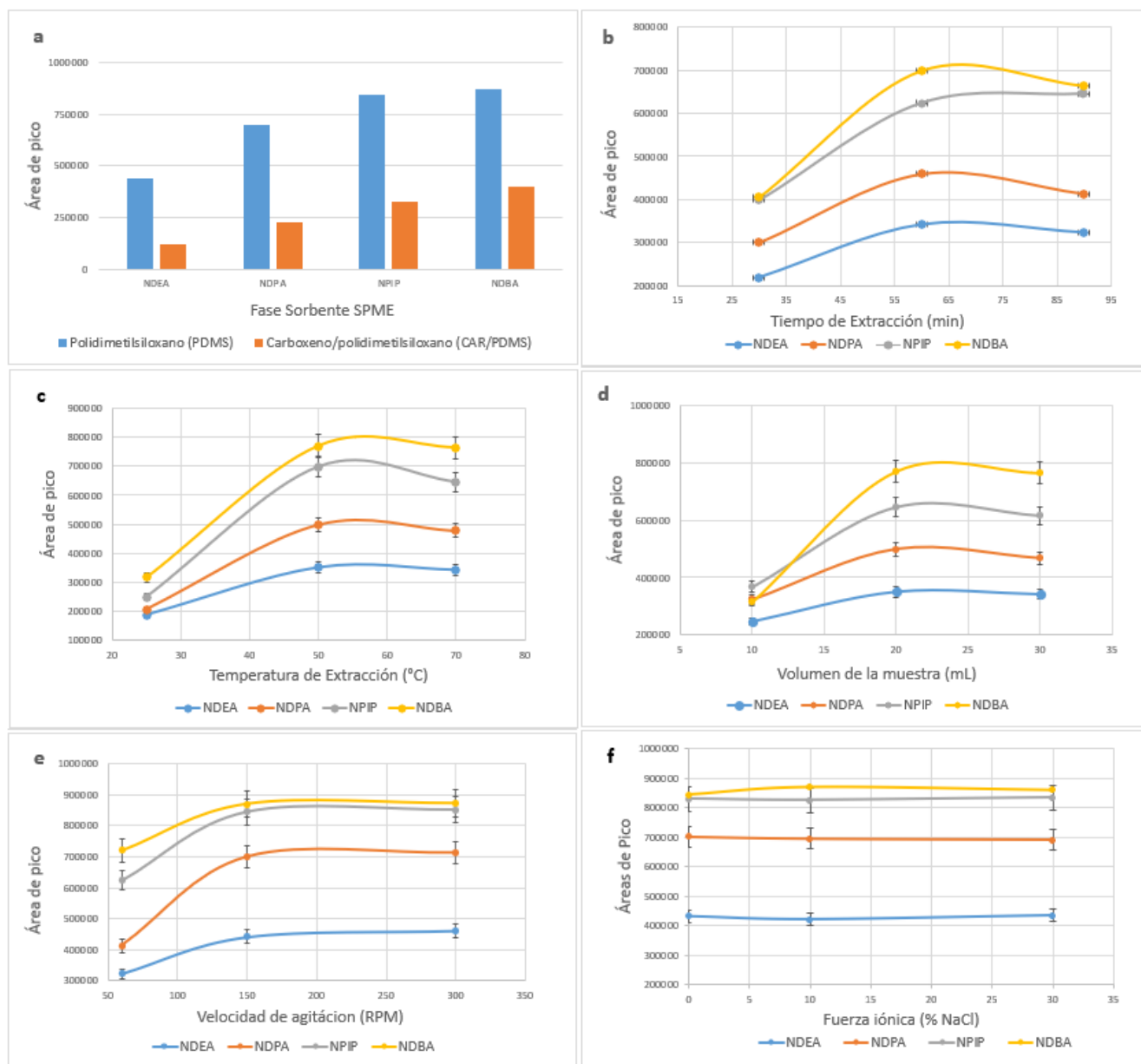


Figura 2. Optimización de los parámetros de SPME. a) Fibra de SPME, b) Temperatura de extracción, c) Tiempo de extracción, d) Volumen de muestra, e) velocidad de agitación f) Fuerza iónica.

Teniendo en cuenta la evaluación de cada variable, así como los criterios de equilibrio y su impacto en la respuesta analítica, se establecieron las condiciones óptimas para la técnica de extracción HS-SPME. En la tabla 3 se presentan los de parámetros ya optimizados.

Tabla 3. Parámetros óptimos para la extracción de HS-SPME.

Parámetro	Valor óptimo
Fibra	PDMS
Tiempo de extracción	60 min.
Temperatura de extracción	50 °C
Volumen de muestra	20 mL
Velocidad de agitación	150 RPM
Fuerza iónica	0% NaCl

El cromatograma de la figura 3 muestra la solución estándar que contenía los 4 compuestos estudiados mediante el método HS-SPME-MS, usando todos los parámetros óptimos establecidos anteriormente, demostrando unos picos cromatográficos con una buena separación y resolución.

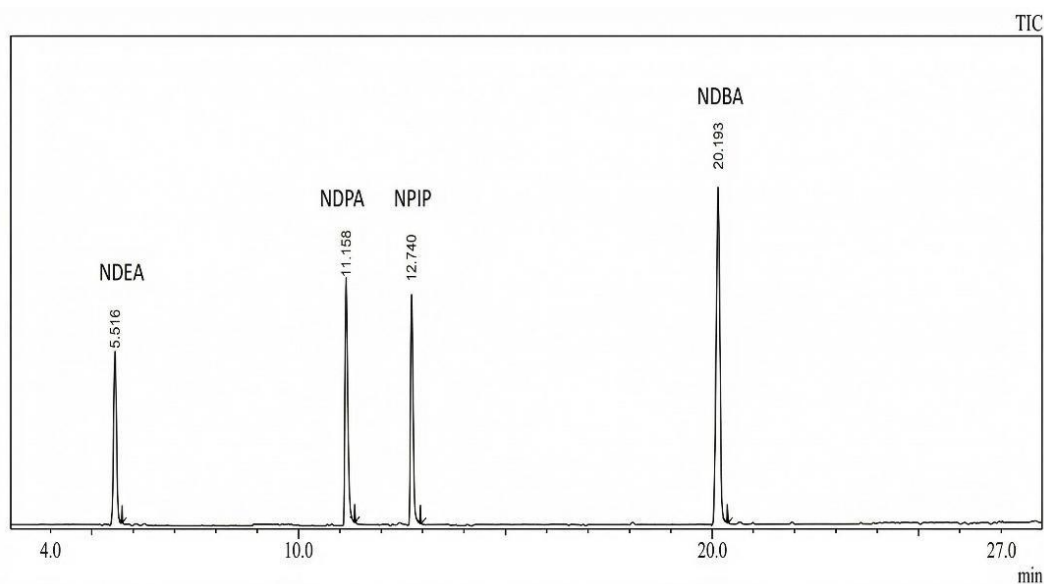


Figura 3. Cromatograma obtenido con las condiciones óptimas de HS-SPME-GC-MS para el análisis de: *N*-nitrosodietilamina (NDEA), *N*-nitrosodi-*n*-butilamina (NDPA), *N*-nitrosodi-*n*-propilamina (NDPA) y *N*-nitrosopiperidina (NPIP)

En las características analíticas del método se tomó en cuenta los lineamientos de la IUPAC (unión internacional de química pura y aplicada), con el fin de garantizar que el procedimiento fuera confiable, reproducible y adecuado para el análisis de nitrosaminas.²⁶ Se estableció el intervalo lineal considerando las concentraciones reportadas en la literatura para alimentos, construyéndose una curva de calibración de cinco puntos en el rango de 10 a 50 ug/L, cada uno analizado por triplicado para incrementar la precisión y minimizar errores aleatorios en la determinación de las cuatro NAMs.

La ecuación de la recta se obtuvo mediante regresión lineal por mínimos cuadrados (Figura 4). La linealidad de cada analito se evaluó a través del coeficiente de correlación (r^2), cuyos valores, presentados en la tabla 4, fueron cercanos a 1, confirmando una buena respuesta del método. Entre ellos se destacó la *N*-nitrosodietilamina (NDEA) con un $r^2 \geq 0,9959$. La significancia estadística de los parámetros de regresión fue evaluada mediante la prueba *t*-student aplicada a coeficiente de correlación, en todos los casos los valores de *t* calculados fueron superiores al valor *t* tabulado, lo que permitió rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alternativa, confirmando la existencia de una relación lineal directa y significativa entre la concentración (variable independiente, eje *x*) y la

respuesta instrumental (variable dependiente, eje y). además, el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión mostro que los valores de F calculados para cada analito fueron mayores que los valores F tabulados, lo que permitió aceptar la hipótesis alternativa y confirmar la significancia del modelo de regresión lineal dentro del rango de concentración evaluado para cada nitrosamina.

Los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOQ) calculados se encontraron dentro del rango de trabajo de las curvas de calibración; nuevamente la NDEA presentó los valores más bajos (LOD: 0.035ug/L); LOQ:0,12ug/L). Por otro lado, la precisión del método se evaluó mediante el porcentaje de desviación estándar relativa (%RSD), calculado a partir de cinco repeticiones a una concentración de 30 µg/L. El valor promedio obtenido fue satisfactorio, destacándose la N-nitrosopropilamina con un RSD de 3,7%. Este resultado se encuentra dentro de los límites establecidos en la guía ICH, que permite valores hasta del 10%.²⁷

Finalmente, la exactitud se evaluó mediante el porcentaje de recuperación, calculado a partir de la comparación entre la concentración teórica adicionada a la matriz y la concentración cuantificada experimentalmente con el método. Los valores obtenidos para tres de las nitrosaminas oscilaron entre 82,8 y 88,3%, confirmando que el método cumple con los criterios aceptables de recuperación para concentraciones bajas, de acuerdo con lo establecido en guías internacionales como CODEX, AOAC y AEFI, que estipulan intervalos de aceptación entre 80–110 % para rangos de concentración <0,001%.²⁸ En el caso particular de la N-nitrosodietilamina (NDEA), se obtuvo una recuperación de 75,4 %. Aunque este valor se encuentra ligeramente por debajo del rango establecido (≥80 %), puede considerarse aceptable debido a la naturaleza en traza del analito, la complejidad de la matriz y el hecho de que esta nitrosamina presentó buena precisión (%RSD) y alta linealidad (r^2), lo que respalda la confiabilidad del método para su determinación. En la Tabla 4 se presentan los resultados obtenidos para los parámetros de validación, donde se resumen los valores de linealidad, límites de detección y cuantificación, precisión y exactitud de cada una de las nitrosaminas evaluadas.

Tabla 4. Características analíticas del método para cada una de las nitrosaminas.

Parámetro	(NDEA)	(NDPA)	(NPIP)	(NDBA)	Criterio
Rango lineal (µg/L)	10-50	10-50	10-50	10-50	
R ²	0,9959	0,9931	0,9946	0,9988	
T _{tabulada}	3,182				
T(R) _{calculado}	26,870	20,635	23,471	16,317	H _a = t _{calculada} > t _{tabulada}
F _{tabulado}	4,67				
F _{calculado}	3130,58	1876,74	2409,46	1151,45	H _a = F _{REG} > F _{tab} H _o = F _{REG} < F _{tab}
LOD (µg/L)	0,035	0,667	0,330	0,172	
LOQ (µg/L)	0,12	2,22	1,10	0,57	
%RSD	8,8 %	3,7 %	5,8 %	6,8 %	
%Recuperación	75,4 %	82,8 %	83,4 %	88,3 %	

Muestras de Cerveza

Con el método HS-SPME-CG-MS ya desarrollado y optimizado, se procedió en la determinación de las 4 Nitrosaminas volátiles: N-nitrosodietilamina (NDEA), N-nitrosodi-n-butilamina (NDBA), N-nitrosodi-n-propilamina (NDPA) y N-nitrosopiperidina (NPIP) en cervezas industriales y artesanales (6) obtenidas en la ciudad de Cali con diferentes procedencias. Estas fueron analizadas con los parámetros optimizados en la microextracción (tabla 3). En las muestras de cerveza se identificaron diversos compuestos volátiles incluyendo alcoholes y ésteres característicos de la matriz cerveza (figura 4). Sin embargo, no se detectaron N-nitrosaminas.

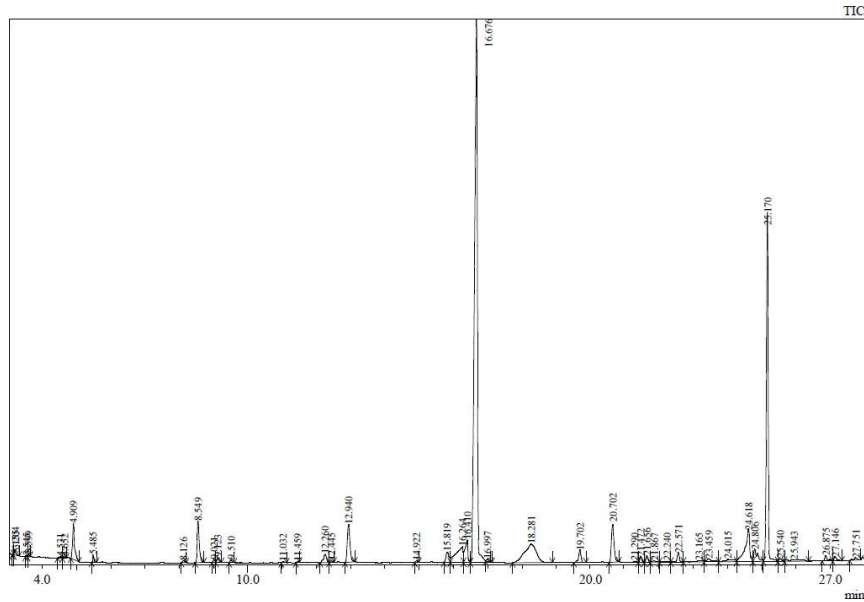


Figura 4. Cromatograma de una de las muestras de cerveza

Los resultados de análisis de N-nitrosaminas en las muestras de cerveza se resumen en la tabla 5. Como se observa, no se detectaron las cuatros nitrosaminas evaluadas en ninguna de las muestras analizadas, bajo las condiciones analíticas y dentro del rango de trabajo del método. Este resultado puede atribuirse a dos escenarios posibles: primero, que las concentraciones de estos compuestos, en caso de estar presentes, se encuentren por debajo de la capacidad de detección del método; o que los procesos de elaboración estén suficientemente controlados, lo que limita o evita la formación de estas especies durante la producción.

Tabla 5. Análisis de muestras de cerveza por HS-SDME-GC-MS

MUESTRA	NDEA	NDBA	NDPA	NPIP
Cerveza 1	n.d	n.d	n.d	n.d
Cerveza 2	n.d	n.d	n.d	n.d
Cerveza 3	n.d	n.d	n.d	n.d
Cerveza 4	n.d	n.d	n.d	n.d
Cerveza 5	n.d	n.d	n.d	n.d
Cerveza 6	n.d	n.d	n.d	n.d

n.d: no detectado

4. CONCLUSIONES

la optimización de la técnica HS-SPME acoplada a GC-MS permitió establecer las condiciones experimentales más adecuadas para la extracción y análisis de N-nitrosaminas en cerveza, definiéndose como óptimos: fibra PDMS, 60 minutos de extracción, 50 °C de temperatura, 20 mL de volumen de muestra y 150 rpm de agitación. Estos parámetros garantizaron un equilibrio eficaz entre la matriz y la fibra, logrando una respuesta cromatográfica reproducible y sensible. En las características analíticas del método se confirmó su confiabilidad evidenciando linealidad satisfactoria en el rango de 10–50 µg/L, con coeficientes de correlación (r^2) superiores a 0,99 en todos los analitos. Los límites de detección y cuantificación obtenidos fueron adecuados para la naturaleza traza de las nitrosaminas, destacándose la NDEA con la mayor sensibilidad (LOD: 0,035 µg/L; LOQ: 0,12 µg/L). La precisión (%RSD < 10 %) se mantuvo dentro de los criterios internacionales, y la exactitud presentó recuperaciones aceptables en tres de las cuatro NAmS evaluadas (82,8–88,3 %). Aunque la NDEA mostró un valor de recuperación ligeramente inferior (75,4 %), su alta sensibilidad, buena repetibilidad y linealidad respaldan la validez del método para su determinación.

La determinación en seis muestras de cerveza no evidenció la presencia de las nitrosaminas analizadas (NDEA, NDPA, NPIP y NDBA), sugiriendo que de encontrarse, estarían en concentraciones por debajo de los límites de detección. Estos hallazgos son coherentes con lo reportado en la literatura, donde se indica que las NAMs suelen estar presentes a niveles de trazas en este tipo de matrices. Los resultados confirman que el método desarrollado es confiable, sensible y reproducible, constituyéndose en una herramienta analítica válida para la determinación de N-nitrosaminas en cerveza y con potencial de aplicación en otras matrices.

5. REFERENCIAS

- (1) National Toxicology Program. 15th Report on Carcinogens. **2021**. <https://doi.org/10.22427/NTP-OTHER-1003>.
- (2) Beard, J. C.; Swager, T. M. An Organic Chemist's Guide to N-Nitrosamines: Their Structure, Reactivity, and Role as Contaminants. *Journal of Organic Chemistry* **2021**, *86* (3), 2037–2057. <https://doi.org/10.1021/ACS.JOC.0C02774>.
- (3) Center for Drug Evaluation and Research (FDA). *Control of Nitrosamine Impurities in Human Drugs*; 2024. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/control-nitrosamine-impurities-human-drugs?utm_source=chatgpt.com (accessed 2025-08-27).
- (4) Huang, S.; Fu, W.; Fang, Q.; Ni, L.; Zheng, R.; Yong, L.; Huang, Z.; Pang, J.; Lin, Z.; Lin, H.; Dai, R. Occurrence and Carcinogenic Risk Assessment of N-Nitrosamines in Some Dried Aquatic Products in China. *Food Control* **2023**, *152*, 109845. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCONT.2023.109845>.
- (5) Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; del Mazo, J.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Leblanc, J. C.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Romualdo, B.; Cristina, F.; Stephen, H.; Iammarino, M.; Mosbach-Schulz, O.; Riolo, F.; Christodoulidou, A.; Grasl-Kraupp, B. Risk Assessment of N-Nitrosamines in Food. *EFSA Journal* **2023**, *21* (3). <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2023.7884>.
- (6) Farré, M. J.; Insa, S.; Lamb, A.; Cojocariu, C.; Gernjak, W. Occurrence of: N -Nitrosamines and Their Precursors in Spanish Drinking Water Treatment Plants and Distribution Systems. *Environ Sci (Camb)* **2020**, *6* (1), 210–220. <https://doi.org/10.1039/C9EW00912D>.
- (7) Deveci, G.; Tek, N. A. N-Nitrosamines: A Potential Hazard in Processed Meat Products. *J Sci Food Agric* **2024**, *104* (5), 2551–2560. <https://doi.org/10.1002/JSFA.13102>.
- (8) Iko Afé, O. H.; Kpoclou, Y. E.; Douny, C.; Anihouvi, V. B.; Igout, A.; Mahillon, J.; Hounhouigan, D. J.; Scippo, M. L. Chemical Hazards in Smoked Meat and Fish. *Food Sci Nutr* **2021**, *9* (12), 6903–6922. <https://doi.org/10.1002/FSN3.2633>.
- (9) Wohlfart, J.; Scherf-Clavel, O.; Kinzig, M.; Sörgel, F.; Holzgrabe, U. The Nitrosamine Contamination of Drugs, Part 3: Quantification of 4-Methyl-1-Nitrosopiperazine in Rifampicin Capsules by LC-MS/HRMS. *J Pharm Biomed Anal* **2021**, *203*. <https://doi.org/10.1016/J.JPBA.2021.114205>.
- (10) Guillermo Gonzalez-Alatorre; Lona-Ramírez, F. J.; Perez-Perez, M. C. I.; Patiño-Herrera, R.; Diaz-Ovalle, C. O. Quantification of N-Nitrosamines in White Wine Using Headspace Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography–Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry* **2020**, *75* (4), 519–525. <https://doi.org/10.1134/S1061934820040048>.
- (11) *Colombia: Beer consumption increases | Verlag W. Sachon*. <https://www.freshlybottled.com/news-2/colombia-beer-consumption-increases> (accessed 2025-08-28).
- (12) *Aporte de Central Cervecera a la industria en Colombia*. <https://www.valoraanalitik.com/aporte-de-central-cervecera-a-la-industria-en-colombia/> (accessed 2025-08-28).
- (13) Pérez-Lucas, G.; Navarro, G.; Navarro, S. Understanding How Chemical Pollutants Arise and Evolve in the Brewing Supply Chain: A Scoping Review. *Foods* **2024**, *13* (11), 1709.

<https://doi.org/10.3390/FOODS13111709>.

- (14) Maver, M.; Miras-Moreno, B.; Lucini, L.; Trevisan, M.; Pii, Y.; Cesco, S.; Mimmo, T. New Insights in the Allelopathic Traits of Different Barley Genotypes: Middle Eastern and Tibetan Wild-Relative Accessions vs. Cultivated Modern Barley. *PLoS One* **2020**, *15* (4), e0231976. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0231976>.
- (15) Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; del Mazo, J.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L.; Leblanc, J. C.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Romualdo, B.; Cristina, F.; Stephen, H.; Iammarino, M.; Mosbach-Schulz, O.; Riolo, F.; Christodoulidou, A.; Grasl-Kraupp, B. Risk Assessment of N-nitrosamines in Food. *EFSA Journal* **2023**, *21* (3), e07884. <https://doi.org/10.2903/J.EFSA.2023.7884>.
- (16) Goff, E. U.; Fine, D. H. Analysis of Volatile N-Nitrosamines in Alcoholic Beverages. *Food Cosmet Toxicol* **1979**, *17* (6), 569–573. [https://doi.org/10.1016/0015-6264\(79\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0015-6264(79)90115-9).
- (17) Jasinski, J. S. Liquid Chromatographic Determination of Nitrosamines in Malt and Beer with a Photoconductivity Detector. *Anal Chem* **1984**, *56* (12), 2214–2218. <https://doi.org/10.1021/AC00276A052>.
- (18) Bellec, G.; Cauvin, J. M.; Salaun, M. C.; Le Calvé, K.; Dréano, Y.; Gouérou, H.; Ménez, J. F.; Berthou, F. Analysis of N-Nitrosamines by High-Performance Liquid Chromatography with Post-Column Photohydrolysis and Colorimetric Detection. *J Chromatogr A* **1996**, *727* (1), 83–92. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)01073-4](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)01073-4).
- (19) Nabizadeh, S.; Aeini, K.; Barzegar, F.; Arabameri, M.; Hosseini, H.; Kamankesh, M.; Mohammadi, A. Volatile N-Nitrosamines in Processed Meat Products: An Approach for Monitoring Dietary Exposure, Assessing Human Risk, and Evaluating Variable Correlations by Principal Component Analysis and Heat Map. *Food and Chemical Toxicology* **2024**, *188*, 114649. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2024.114649>.
- (20) Effting, L.; Turazzi, F. C.; Zardo, N.; Galvan, D.; Carasek, E. An Eco-Friendly Approach Developed for the Microextraction of N-Nitrosamines in Water and Beverage Samples with Deep Eutectic Solvent and Multivariate Optimization. *Microchemical Journal* **2025**, *216*, 114621. <https://doi.org/10.1016/J.MICROC.2025.114621>.
- (21) Chang, S. H.; Ho, H. Y.; Chang, C. C.; Zang, C. Z.; Hsu, Y. H.; Lin, M. C.; Tseng, S. H.; Wang, D. Y. Evaluation and Optimization of a HS-SPME-Assisted GC-MS/MS Method for Monitoring Nitrosamine Impurities in Diverse Pharmaceuticals. *J Pharm Biomed Anal* **2022**, *221*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.115003>.
- (22) Alshehri, Y. M.; Alghamdi, T. S.; Aldawsari, F. S. HS-SPME-GC-MS as an Alternative Method for NDMA Analysis in Ranitidine Products. *J Pharm Biomed Anal* **2020**, *191*. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113582>.
- (23) Lancioni, C.; Castells, C.; Candal, R.; Tascon, M. Headspace Solid-Phase Microextraction: Fundamentals and Recent Advances. *Advances in Sample Preparation* **2022**, *3*, 100035. <https://doi.org/10.1016/J.SAMPRE.2022.100035>.
- (24) Salamero Gil, M.; Ángeles Herrador Morillo M^a Teresa Morales Millán, M. Microextracción En Fase Sólida: Aplicaciones de Interés Farmacéutico. 2017. <http://hdl.handle.net/11441/64943> (accessed 2025-09-27).
- (25) Westland, J.; Technologies, A. Solid Phase Microextraction (SPME) Solid Phase Microextraction Fundamentals. *Agilent Technologies* **2023**.
- (26) Thompson, M.; Ellison, S. L. R.; Wood, R. Harmonized Guidelines for Single-Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* **2002**, *74* (5), 835–855. <https://doi.org/10.1351/PAC200274050835/MACHINEREADABLECITATION/RIS>.
- (27) ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE. VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1). **2005**, *4*.
- (28) Ahumada, D.; Paredes, C.; Abella, J.; Gonzalez, I. *VALIDACIÓN DE MÉTODOS EN ANÁLISIS QUÍMICO CUANTITATIVO*; 2023; Vol. Primera edición.