

ARTÍCULO ORIGINAL**Determinación de acrilamida y furosina en harinas y papillas infantiles****Determination of acrylamide and furosine in flour and infant formulas****Mesías M¹; Guerra-Hernández E; García-Villanova B**

¹Departamento de Nutrición y Bromatología. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Campus Universitario de Cartuja. 18071 Granada. Fax: 34-958249577, Tel.: +34-958240663, E-mail mmesias@ugr.es

RESUMEN

Una de las modificaciones más importantes inducidas en el alimento durante el calentamiento es la reacción de Maillard, donde participan aminoácidos y azúcares reductores, pudiendo producirse mejora de las características organolépticas del alimento pero también pérdida del valor nutritivo y aparición de compuestos tóxicos. Los cereales infantiles son hidrolizados durante el procesado, aumentando los niveles de azúcares reductores, por lo que en el tostado o desecado de estas muestras puede favorecerse el desarrollo de la reacción de Maillard. Los niños son especialmente susceptibles a la disminución del valor nutritivo y al consumo de compuestos potencialmente tóxicos, de ahí la importancia de conocer el grado de desarrollo de esta reacción en dichos productos. En este estudio se determinó el contenido de acrilamida y furosina en harinas crudas y tostadas y en papillas infantiles, con el fin de evaluar la extensión de la reacción de Maillard. El contenido de furosina osciló entre 11,5-34,6 mg/100 g de proteínas en las muestras de harinas y entre 122-1193 mg/100 g de proteínas en las muestras de papillas. No se detectó acrilamida en las muestras de harinas y osciló entre 0,22 y 9,6 µg/kg en las papillas. Las pérdidas de lisina pueden considerarse altas en algunas muestras, pero no suponen riesgo de déficit nutricional al consumirse estos productos con leche. La acrilamida sólo se encontró en niveles cuantificables en cuatro muestras y en concentraciones muy bajas; éstas se encuentran lejos de la dosis máxima permitida y por lo tanto no deberían representar problemas adversos tras su consumo.

PALABRAS CLAVE: Acrilamida, furosina, papillas, cereales infantiles, reacción de Maillard.

ABSTRACT

One of the most important modifications originated in foods during thermal treatment is Maillard reaction, in which amino acids and reducing sugars are participants. This reaction can improve the organoleptic characteristics of foods but, moreover, can lead to nutritional value losses and apparition of toxicological compounds. Infant cereals are hydrolyzed during processing, increasing reducing sugar levels thereby Maillard reaction can be favored in toasted or dried samples. Infants are especially susceptible to the decreased nutritional value and to the toxicological compounds consumption. Thus it is important to know the development rate of this reaction in these products. In this study acrylamide and furosine content in raw and toasted flour and in infant formulas were determined, in order to evaluate Maillard reaction evolution. Furosine content ranged from 11.5 to 34.6 mg/100 g of proteins in toasted flour samples and from 122 to 1193 mg/100 g of proteins in formula samples. Acrylamide was not detected in flour samples ranging from 0.22 and 9.6 µg/kg in formula samples. Lysine losses can be considered to be high in several samples, but it does not suppose a nutritional deficiency risk because these products are consumed together with milk. Acrylamide only was found in quantified levels in four samples and in very low concentrations. These values are lower than the maximum dose allowed and, therefore, they should not represent adverse problems after their consumption.

KEYWORDS: Acrylamide, furosine, infant cereals, infant formulas.

Fecha de recepción (Date received): 15-04-2010

Fecha de aceptación (Date accepted): 10-06-2010

Ars Pharm 2010; 51.Suplemento 3: 135-143.

INTRODUCCIÓN

Una de las modificaciones más importantes inducidas en el alimento durante el calentamiento es la reacción de Maillard, donde participan aminoácidos y azúcares reductores, pudiendo producirse mejora de las características organolépticas del alimento pero también pérdida del valor nutritivo¹ y aparición de compuestos tóxicos como la acrilamida.² La acrilamida ha sido clasificada como “probable carcinógeno para los humanos” clase 2A por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC)³ y como cancerígeno en la categoría 2 de la Unión Europea (sustancias que deben ser tratadas como si fueran cancerígenos en humanos)⁴, de ahí la importancia de estimar las cantidades de este compuesto ingeridas en la dieta. La formación de acrilamida depende del contenido de precursores, glucosa o fructosa y asparagina libres y del binomio temperatura-tiempo del tratamiento térmico al que se ven sometidos los alimentos⁵, asociándose en mayor medida a procesos como horneado, fritura, asado, etc. Se origina principalmente en la superficie, donde se alcanzan con mayor rapidez las temperaturas a partir de las que se forma, correlacionándose con un aumento del color tostado del alimento.⁶ Los alimentos que contienen mayores niveles de acrilamida son las patatas fritas, cereales, café, y pan tostado, estos últimos, además, son las fuentes más relevantes de exposición para el hombre ya que son consumidos de forma regular y ampliamente por la población.^{7,8}

La furosina, por su parte, es un compuesto utilizado como indicador de las primeras etapas de la reacción de Maillard. Se forma durante la hidrólisis ácida de los compuestos de Amadori producidos por la reacción entre grupos ϵ -amino de la lisina con glucosa, lactosa o maltosa.⁹ Su determinación, por tanto, estará relacionada de forma indirecta con la pérdida del valor nutritivo y, consecuentemente, con la disminución de la calidad proteica.¹⁰

En los países mediterráneos, las papillas de cereales son el primer alimento que se introduce después de la leche materna y/o fórmula infantil. Los cereales, para poder ser utilizados por los niños, deben procesarse para mejorar su dispersibilidad en líquidos y su digestibilidad, ya que el páncreas de los niños tiene limitada la capacidad de hidrolizar el almidón.¹¹ Por tanto los cereales durante su procesado son hidrolizados, aumentando los niveles de azúcares reductores, por lo que el tostado o desecado de estas muestras puede favorecer el desarrollo de la reacción de Maillard, que cobra especial importancia en estos productos al ser la lisina el aminoácido limitante.^{12,13}

Estos aspectos cobran especial importancia en la población infantil dado el limitado número de alimentos que los bebés pueden consumir y la alta susceptibilidad de los niños a la disminución del valor nutritivo y al consumo de compuestos potencialmente tóxicos. Por todo ello, el control a través de indicadores químicos de los cambios que se originan durante el procesado y almacenamiento juega un papel esencial en el mantenimiento de la calidad de este tipo de productos.

El objetivo del presente trabajo fue determinar el contenido de furosina y

acrilamida en harinas crudas y tostadas y en papillas infantiles, con el fin de evaluar la extensión de la reacción de Maillard y la consiguiente pérdida del valor nutritivo y formación de compuestos potencialmente tóxicos.

MATERIAL Y MÉTODOS

Muestras. Se analizaron 8 muestras de harina cruda (trigo, sorgo, avena, mijo, arroz, cebada, centeno y maíz), 6 muestras de harina tostada (GHE, arroz, multicereales, semolina y dos harinas sin gluten) y 23 muestras de papillas infantiles (5 papillas de cereales sin gluten, 1 de 8 cereales con gluten, 3 de 8 cereales con miel, 1 de 5 cereales con gluten, 3 de multicereales, 1 de cereales y frutas, 1 de multifrutas, 2 de cereales con cacao, 1 de arroz, 1 de trigo y arroz, 1 de maíz y tapioca, 1 de papilla cremosa, 1 de galleta y 1 de papilla libre de leche). Las muestras fueron cedidas por una fábrica elaboradora de este tipo de productos.

Determinación de proteínas: La determinación de proteínas se realizó mediante la determinación de Nitrógeno total por el método Kjeldahl, utilizando el analizador Büchi Distillation Unit B-324 (Suiza) y conversión a proteína multiplicando por el correspondiente factor.¹⁴

Determinación de Furosina: El análisis de furosina se realizó siguiendo la técnica de Resmini y col.¹⁰ con ligeras modificaciones.

- *Hidrólisis ácida:* Se pesan 180 mg de muestra, se adicionan 8 mL de HCl 7,95 N y se mantienen en la estufa a 110 °C durante 24 horas. Los hidrolizados fueron filtrados con papel.

- *Purificación:* 0,5 mL de filtrado fueron pasados a través de cartuchos Sep-pak C₁₈ (Millipore), previamente acondicionados con 5 mL de metanol y 10 mL de agua, y finalmente se eluyeron con 3 mL de HCl 3 M.

- *Análisis cromatográfico:* La furosina fue determinada mediante cromatografía líquida de alta resolución, utilizando un cromatógrafo Waters 600 controller, con detector espectrofotométrico UV/VIS (Konic modelo 200) y programa integrador Millennium chromatography manager. La columna utilizada fue una C8 furosine-dedicated (250 x 4,60 mm i.d.) (Alltech). La fase móvil estaba compuesta por dos fases, eluyente A: disolución ácido acético 0,4% en agua (V/V) y eluyente B: cloruro potásico 0,27% en eluyente A, que se mezclaron de la siguiente forma: 0-20 min (100% A), 20-23 min (50% A/50%B), 23-32 min (100%A). El flujo fue de 1,2 mL/min. La longitud de onda del detector UV fue de 280 nm y el volumen de inyección de 50 µL. La calibración del sistema cromatográfico fue hecha mediante curva de calibración del estándar externo.

Determinación de Acrilamida: El análisis de acrilamida incluyó extracción, derivatización y análisis cromatográfico.

- *Extracción*: Se pesan 5 g de muestra, se adicionan 0,5 mL de Carrez I, 0,5 mL de Carrez II, 10 mL de agua y 5 mL de una solución del patrón de acrilamida marcada de 100 ppb. Se centrifuga a 9000 rpm durante 10 minutos y se extrae el sobrenadante. Se realizan dos centrifugaciones más con 10 mL de agua, juntándose los sobrenadantes en un solo tubo.

- *Derivatización*: Al sobrenadante obtenido se le adicionan 1,2 g de KBr, 400 µL de HBr 45% y 2 mL de una solución saturada de Br₂. Se lleva a oscuridad durante 3 horas. Transcurrido ese tiempo, se adicionan 0,5 mL de tiosulfato sódico. A continuación se hacen 3 extracciones con 7 mL de acetato de etilo, evaporando el volumen final en el rotavapor. Por último se recupera la muestra en 1 mL de acetato de etilo y 200 µL de trietilamina y se filtra a través de filtros Millipore de 20 µm.

- *Análisis cromatográfico*: La acrilamida fue determinada mediante cromatografía de gases-masas, siguiendo la técnica utilizada por Pittet y col. (2004), utilizando un cromatógrafo de gases Trace 2000 (Thermo Electron Corporation) equipado con una columna capilar TR-Waxms 30 m x 0,25 mm, 0,25 µm (Thermo) y acoplado a un detector de trampa iónica Polaris Q. Se utilizó el modo de inyección splitless. El programa de T^a utilizado fue el siguiente: 1 minuto a 40 °C, rampa de 10 °C/min hasta 100 °C y rampa de 50 °C/min hasta 150 °C. El helio fue utilizado como fase móvil a un flujo de 1,5 mL/min. El método de detección utilizado fue por impacto electrónico con T^a de la fuente a 250 °C. Los datos fueron integrados y cuantificados con el software Xcalibur (Thermo Electron Corporation).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de las 8 harinas crudas y 6 harinas tostadas y de las 23 papillas analizadas se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. La mezcla de harinas crudas en diferentes proporciones es la base para la elaboración de las harinas tostadas, que habitualmente se obtienen a temperaturas entre 140 y 150°C.¹³

La hidrólisis de estas harinas tostadas o sus mezclas y el secado por rodillos es lo que constituye la muestra de papilla final. Las muestras de harina cruda no contienen furosina, sin embargo sí apareció durante el tostado de las harinas en valores que oscilaron entre 11,5 y 34,65 mg/100 g de proteína, similares a los encontrados en bibliografía¹³. El contenido de furosina en papillas fue mucho mayor, entre 122 mg/100 g para la papilla de maíz y tapioca y 1193 mg/100 g de proteína en una papilla de 8 cereales y miel. La hidrólisis que sigue al tostado de las harinas produce una gran cantidad de azúcares reductores que reaccionan con la lisina de las proteínas en condiciones idóneas de temperatura y humedad. Estos resultados son similares a los obtenidos por Guerra-Hernández y Corzo¹² y Guerra-Hernández y col.¹³ en papillas infantiles y por Rada-Mendoza y col. en cereales y derivados.¹⁵ Nuestro grupo de investigación estableció que estos valores de furosina suponen pérdidas de lisina entre un 5 y un 50%,¹⁶ pérdidas que en nuestra sociedad no deberían representar problemas nutricionales al prepararse estas papillas con leche, producto rico en lisina.

Tabla 1. Contenido de furosina y acrilamida en harinas crudas y tostadas.

Muestra	Furosina (mg/100 g proteínas)	Acrilamida (µg/kg)
Harinas crudas		
Trigo	n.d.	n.d.
Sorgo	n.d.	n.d.
Avena	n.d.	n.d.
Mijo	n.d.	n.d.
Arroz	n.d.	n.d.
Cebada	n.d.	n.d.
Centeno	n.d.	n.d.
Maiz	n.d.	n.d.
Harinas tostadas		
GHE	34,6 ± 1,38	n.d.
Arroz	14,8 ± 0,15	n.d.
Multicereales	19,8 ± 1,19	n.d.
Semolina	18,7 ± 2,64	n.d.
Sin gluten 1	27,4 ± 0,75	n.d.
Sin gluten 2	11,5 ± 3,04	n.d.

n.d.: no detectado.

Tabla 2. Contenido de furosina y acrilamida en papillas

Muestra	Furosina (mg/100 g proteínas)	Acrilamida (µg/kg)
Cereales sin gluten 1	325 ± 5,93	n.d.
Cereales sin gluten 2	342 ± 34,5	n.d.
Cereales sin gluten 3	505 ± 16,4	n.d.
Cereales sin gluten 4	265 ± 4,74	n.d.
Cereales sin gluten 5	417 ± 53,5	n.d.
8 cereales con gluten	169 ± 27,6	2,25 ± 0,20
8 cereales con miel 1	776 ± 9,58	n.d.
8 cereales con miel 2	1193 ± 59	9,20 ± 0,07
8 cereales con miel 3	220 ± 21,6	n.d.
5 cereales con gluten	361 ± 19,3	n.d.
Multicereales 1	716 ± 21,6	n.d.
Multicereales 2	895 ± 75,4	9,60 ± 1,35
Multicereales 3	164 ± 4,89	0,22 (< LQ)
Cereales y frutas	894 ± 43,5	0,33 (< LQ)
Multifrutas	409 ± 12,8	n.d.
Cereales con cacao 1	766 ± 58,8	n.d.
Cereales con cacao 2	123 ± 7,88	n.d.
Arroz	783 ± 17	n.d.
Trigo y arroz	661 ± 19,0	n.d.
Maiz y tapioca	122 ± 3,65	n.d.
Papilla cremosa	320 ± 9,77	n.d.
Galleta	230 ± 9,33	2,42 ± 0,02
Libre de leche	426 ± 44,3	n.d.

n.d.: no detectado. LQ: límite de cuantificación.

Es difícil establecer una relación entre los valores de furosina y los cereales utilizados en las papillas, ya que no se conoce el proceso de elaboración ni la proporción de ingredientes utilizados. El valor más bajo fue para la papilla de maíz y tapioca, lo que puede justificarse por el bajo contenido de lisina de estos ingredientes. El valor más alto correspondió a la papilla de 8 cereales con miel, lo que podría deberse al contenido mayor de azúcares que proporciona la miel. Estos datos son similares a los obtenidos por Guerra-Hernández y Corzo¹². El valor relativamente alto obtenido en muestras de cereales sin gluten (arroz y maíz) se pudo justificar por el contenido relativamente alto de lisina que presenta el arroz.

En las muestras de harinas, tanto tostadas como crudas, no se detectó acrilamida,

ientras que en las papillas únicamente 4 muestras presentaron niveles detectables, con un intervalo entre 2,25-9,60 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos valores resultaron similares o incluso inferiores a los observados por otros autores en muestras de papillas de cereales; así Roach y col.¹⁷ encontraron valores inferiores a 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Pittet y col.,¹⁸ entre 5 y 62 $\mu\text{g}/\text{kg}$, Croft y col.¹⁹ inferiores a 25 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y la Agencia de Seguridad Europea en 2009 recoge valores medios de 55 $\mu\text{g}/\text{kg}$.^{20,21} Sólo se cuantificó acrilamida en las muestras que contienen cereales con gluten, aunque otros autores como Pittet y col.¹⁸ han encontrado acrilamida en muestras de arroz. En los cereales, el factor limitante en cuanto a los precursores es el contenido de asparagina y no el de azúcares reductores; el contenido del primero puede presentar una alta variabilidad en los diferentes cereales y también dentro del mismo cereal.²²

La relación entre furosina y acrilamida fue de $r^2=0,4639$ y si no se tienen en cuenta los dos valores que están por debajo del límite de cuantificación ésta llega a 0,9303. Esto parece demostrar que en los cereales y cuando el nivel de asparagina es suficiente para formar acrilamida, la vía de Maillard es la principal ruta de formación y podría utilizarse como indicador indirecto de tratamiento térmico para el control de elaboración de las papillas en muestras que tengan un contenido adecuado de aminoácido libre.

La OMS²³ estableció para la acrilamida una dosis sin efecto adverso (NOAEL) de 0,5 mg/Kg de peso corporal para la neuropatía, unos 5 mg para un niño de 10 kg. Teniendo en cuenta el posible consumo de papillas de un niño, entre 50 y 75 g en sólido, correspondería a una ingesta de aproximadamente entre 0,5 y 0,75 $\mu\text{g}/\text{día}$ si consumiera las papillas analizadas, lejos del valor mínimo establecido. Por tanto, los niveles de acrilamida estimados en las muestras se consideran bajos, por lo que se estima que no van a producir efectos adversos tras su consumo. Sin embargo, ya que los productos de la reacción de Maillard pueden suponer un peligro para la salud humana, es conveniente seguir profundizando en el tema y considerar ciertas acciones preventivas del desarrollo de la reacción de Maillard, tal y como indica Slayne y Lineback.²⁴

CONCLUSIONES

Los valores de furosina encontrados en las muestras son muy variables, algunos de ellos altos, aunque no deben presentar problemas nutricionales si se consumen con leche, que es rica en lisina. La acrilamida sólo se encontró en niveles cuantificables en cuatro muestras y a niveles muy bajos, que no deberían representar problemas adversos tras su consumo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado bajo el proyecto de investigación AGL-2006-12656/ALI, financiado por el Ministerio de Ciencia y Tecnología.

BIBLIOGRAFIA

1. Henle, T.; Walter, H.; Krause, I.; Klostermeyer, H. (1991). Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int Dairy J* 1: 125-135.
2. Scientific Committee on Food (2002). <http://www.europa.eu.int>.
3. International Agency for Research on Cancer (1994). IARC monographs on the evaluation of carcinogens risk of chemical to humans. Lyon, France.
4. European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection, 2002. European Union Risk Assessment Report Acrylamide. O. O.Publications of the European Communities, Luxembourg. (ISBN 92-894-1250-X).
5. Brathan, E.; Knutsen, S.H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chem* 92: 693-700.
6. Ehling, S.; Shibamoto, T. (2005). Correlation of acrylamide generation in thermally processed model systems of asparagines and glucose with colour formation, amounts of pyrazines formed, and antioxidative properties of extracts. *J Agric Food Chem* 53: 4813-4819.
7. Konings, E.J.M.; Baars, A.J.; Van Klaveren, J.D.; Spanjer, M.C.; Rensen, P.M.; Hiemstra, M.; Van Kooij, J.A.; Peters, P.W. (2003). Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risk. *Food Chem Toxicol* 41: 1569-1579.
8. Svensson, K.; Abramsson, L.; Becker, W.; Glynn, A.; Hellenäs, K.E.; Lind, Y.; Rosén, J. (2003). Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem Toxicol* 41: 1581-1586.
9. Erbersdobler, H.F.; Hupe, A. (1991). Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z Ernährugswiss* 30: 46-49.
10. Resmini, P.; Pellegrino, L.; Battelli, G. (1990). Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital J Food Sci Nutr* 3: 173-183.
11. De Vizia, B.; Ciccimarra, F.; De Cicco, N.; Auricchio, S. (1975). Digestibility of starches in infants and children. *J Pediatr* 86: 50-55.
12. Guerra-Hernández, E.; Corzo, N. (1996). Furosine determination in baby cereals by ion-pair reversed-phase liquid chromatography. *Cereal Chem* 73: 729-731
13. Guerra-Hernández, E.; Corzo, N.; García-Villanova, B.(1999). Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J Cereal Sci* 29: 171-176.
14. AOAC. (1980). Official Methods of Analysis. Association of Official Analytical Chemists. Washington, D.C.
15. Rada-Mendoza, M.; García Baños, J.L.; Villamiel, M.; Olano, A. (2004) Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulosa and furosine determination. *J Cereal Sci* 39: 167-173.
16. Fernández Artigas, P.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. (1999). Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *J Sci Food Agric* 79: 851-854.
17. Roach, J.A.G.; Andrzejewski, D.; Gay, M.L.; Nortrup, D.; Musser, S.M. (2003). Rugged LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. *J Agric Food Chem* 51: 7547-7554.
18. Pittet, A.; Périsset, A.; Oberson, J.M. (2004). Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry *J Chromatogr A* 1035: 123-130.
19. Croft, M.; Tong, P.; Fuentes, D.; Hambridge, T. (2004). Australian survey of acrylamide in carbohydrate-based foods. *Food Addit Contam* 21: 721-736.
20. EFSA (European Food Safety Authority) (2009) Results on the monitoring of acrylamide levels in food. In the EFSA Scientific Report, nº 285, pp 1-26, Parma, Italy:EFSA.
21. Erkekoglu, P.; Baydar, T, (2010). Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutr Res Rev* 1-11.
22. Claus, A.; Carla, R.; Schieber, A. (2008). Acrylamide in cereal products: A review. *J Cereal Sci* 47: 118-133.
23. WHO (World Health Organization) (2002) Health implications of acrylamide in food. Joint FAO/WHO consultation, Geneva, Switzerland, 25–27 June 2002.

http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/acrylamide_june2002/en/index.html
(accessed 25 January 2010).

24. Slayne, M.A.; Lineback, D.R. (2005). Acrylamide: considerations for risk management. J AOAC Int 88: 227-233.
-