

UNIVERSIDAD DE GRANADA

FACULTAD DE FARMACIA

Departamento de Nutrición y Bromatología



TESIS DOCTORAL

**DETERMINACIÓN, VALORACIÓN Y REDUCCIÓN DE
ACRILAMIDA EN ALIMENTOS HIDROCARBONADOS**

Rosa María Plata Guerrero

Granada, Noviembre de 2015

Editor: Universidad de Granada. Tesis doctorales

Autora: Rosa María Plata Guerrero

ISBN: 978-84-9125-595-4

URI: <http://hdl.handle.net/10481/43007>

MEMORIA para aspirar al Grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de
Alimentos que presenta la licenciada en Bioquímica

ROSA MARÍA PLATA GUERRERO

Directores de esta Tesis:

Profesores:

Dr. D Eduardo Guerra Hernández

Dra. D^a Belén García-Villanova Ruíz

Rosa María Plata Guerrero

Aspirante al Grado de Doctora en Ciencias y Tecnología de Alimentos

Granada, Noviembre de 2015

La doctorando ROSA M^a PLATA GUERRERO y los directores de la tesis EDUARDO JESÚS GUERRA HERNÁNDEZ Y BELEN GARCIA-VILLANOVA RUIZ. Garantizamos, al firmar esta tesis doctoral, que el trabajo ha sido realizado por el doctorando bajo la dirección de los directores de la tesis y hasta donde nuestro conocimiento alcanza, en la realización del trabajo, se han respetado los derechos de otros autores a ser citados, cuando se han utilizado sus resultados o publicaciones.

Granda, 12 de noviembre de 2016

Director/es de la Tesis



Fdo.: Eduardo J. Guerra Hernández:



Fdo.: Belén García-Villanova Ruíz

Doctorando



Fdo.: Rosa M^a Plata Guerrero

La parte de la investigación relacionada con la determinación y reducción del contenido en acrilamida en patatas fritas que recoge esta memoria de Tesis Doctoral se ha llevado a cabo gracias a una beca concedida por la Fundación Grupo Eroski para la formación y la investigación científica en los campos de la bioética y la empresa, la nutrición, la salud y la seguridad alimentaria.

Licenciada Rosa María Plata Guerrero

Granada, Noviembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

Esta Tesis Doctoral ha sido un proyecto paralelo a mi proyecto de vida, lo que ha supuesto alargar en el tiempo su realización y finalización.

Por esto debo agradecer a mis directores de tesis, Eduardo y Belén, su comprensión y paciencia y todo el tiempo dedicado. Sin vosotros esta tesis no habría sido posible. Gracias, Eduardo, por resolver mis dudas y estar siempre dispuesto en cualquier momento a atenderme y sacar adelante este trabajo; por tus instrucciones, tu insistencia, buenos consejos y por tu cariño.

Gracias al Instituto del Frío del CSIC, en Madrid, por acogerme y permitirme el uso de sus instalaciones y material. A Francisco J. Morales por recibirme en su laboratorio y por el tiempo dedicado.

A José del Carmen por su ayuda en el laboratorio, por los ratos de risas y por su incomparable amistad.

A Marta por su compañía y amistad. Gracias por tu aportación.

A los compañeros con los que durante este tiempo he compartido mi lugar de trabajo: Melquiades, Verónica, José Ángel, Cristina, Rosa..... y a todos los que siempre han tenido una palabra de ánimo conmigo.

A mi familia y a mi marido, Nacho, que siempre me han animado y dado motivos para seguir adelante con este proyecto de mi vida profesional. A mi hija Martina por el tiempo que le he robado en su tierna edad.

Gracias a Dios y a la Vida por haber puesto en mi camino a grandes personas.

A Martina

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS

1. REVISION BIBLIOGRÁFICA

- 1.1. Reacción de Maillard
 - 1.1.1. Química de la Reacción de Maillard
 - 1.1.2. Variables que intervienen en la Reacción de Maillard
 - 1.1.3. Consecuencias de la Reacción de Maillard
 - 1.1.3.1. Consecuencias Tecnológicas
 - 1.1.3.2. Consecuencias Toxicológicas
 - 1.1.4. Indicadores de la reacción de Maillard
 - 1.1.5. Acrilamida
 - 1.1.5.1. Sustratos de formación de acrilamida
 - 1.1.5.2. Mecanismos de formación de acrilamida
 - 1.1.5.2.1. Vía Principal: Reacción de Maillard
 - 1.1.5.2.2. Vías minoritarias
 - 1.1.5.3. Factores implicados en la formación y reducción de acrilamida en alimentos
 - 1.1.5.3.1. Patatas
 - 1.1.5.3.2. Cereales y derivados
 - 1.1.5.3.3. Café
 - 1.1.5.4. Niveles de acrilamida en alimentos
 - 1.1.5.5. Toxicología de la acrilamida
 - 1.1.5.6. Actividades de Regulación de la acrilamida
 - 1.1.5.6.1. Recomendaciones relativas a la acrilamida de la Unión Europea
 - 1.1.5.6.2. Guía para la reducción de acrilamida en la industria alimentaria (Caja de herramientas)

2. MATERIAL Y MÉTODOS.

2.1 Muestras

- 2.1.1 Patatas
 - 2.1.1.1 Estudio del contenido en precursores
 - 2.1.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés

- 2.1.1.3 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo chips
- 2.1.2 Cereales
 - 2.1.2.1 Estudio de acrilamida en rebozados con harina y pan rallado
 - 2.1.2.2 Estudio de acrilamida y furosina en papillas de cereales infantiles
 - 2.1.2.2.1 Papillas cedidas por una industria elaboradora
 - 2.1.2.2.2 Muestras comerciales
 - 2.1.2.3 Estudio de acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería

2.2 Métodos

- 2.2.1 Elaboración de patatas fritas tipo francés.
- 2.2.2 Elaboración de rebozados y empanados.
- 2.2.3 Elaboración de picatostes (pan frito), panes tostados y productos de bollería con diferente grado de tostación.
- 2.2.4 Encuesta.

2.3 Determinaciones analíticas

- 2.3.1 Análisis de acrilamida por HPLC-MS en patatas fritas tipo francés
- 2.3.2 Análisis de acrilamida por UPLC-MS/MS en rebozados con harina y pan rallado y picatostes
- 2.3.3 Análisis de acrilamida en patatas fritas tipo chips por GC-MS
- 2.3.4 Análisis de acrilamida en papillas por GC-MS
- 2.3.5 Análisis de precursores
 - 2.3.5.1 Azúcares
 - 2.3.5.2 Aminoácido
- 2.3.6. Color
- 2.3.7. Furosina
- 2.3.8. Determinación de hidroximetilfurfural, furfural y glucosilisomaltol
- 2.3.9. Determinación de productos finales de pardeamiento
- 2.3.10. Análisis complementarios
 - 2.3.10.1. Determinación de extracto seco
 - 2.3.10.2 Determinación de grasa
 - 2.3.10.3. Determinación de proteínas

2.4 Análisis estadístico

3. RESULTADOS

3.1 Patatas

- 3.1.1 Análisis de precursores en patatas crudas: azúcares reductores y aminoácidos
 - 3.1.1.1. Puesta a punto de los métodos
 - 3.1.1.2. Determinación en muestras
- 3.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés
 - 3.1.2.1 Contenido de precursores tras los diferentes tratamientos de remojo
 - 3.1.2.2 Distribución de azúcares en la patata
 - 3.1.2.3 Contenido de azúcares reductores en patatas fritas
 - 3.1.2.4 Determinación de acrilamida en patatas fritas tipo francés tras los diferentes remojos
 - 3.1.2.5 Determinación de color en patatas fritas tipo francés tras los diferentes remojos
 - 3.1.2.6 Preparación de patatas fritas caseras
- 3.1.3 Determinación de acrilamida en patatas tipo chips
- 3.2 Cereales
 - 3.2.1 Determinación de acrilamida en rebozados con harina y pan rallado.
 - 3.2.2 Determinación de acrilamida y furosina en harinas y papillas de cereales infantiles
 - 3.2.3 Determinación de acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería

4. DISCUSIÓN

- 4.1 Patatas
 - 4.1.1 Precursores de acrilamida en patatas crudas
 - 4.1.1.1 Puesta a punto de métodos
 - 4.1.1.2 Determinación en muestras
 - 4.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés
 - 4.1.2.1 Contenido de precursores en patata cruda tras los diferentes tratamientos de remojo
 - 4.1.2.2 Distribución de azúcares en patatas crudas
 - 4.1.2.3 Contenido de azúcares reductores en patatas fritas
 - 4.1.2.4 Contenido de acrilamida en patatas fritas tras los remojos
 - 4.1.2.5 Color en patatas fritas tras los remojos
 - 4.1.2.6 Preparación de patatas caseras
 - 4.1.3 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo “chips”
- 4.2 Cereales

- 4.2.1 Acrilamida en rebozados y pan rallado
- 4.2.2 Acrilamida y furosina en harina y papillas de cereales infantiles
- 4.2.3 Acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería
 - 4.2.3.1. Panes
 - 4.2.3.2. Productos de bollería

5. CONCLUSIONES

6. BIBLIOGRAFÍA

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Título
1.1.	Esquema general de la reacción de Maillard
1.2.	Ruta propuesta por Jägerstad y Skog, (1991) para la formación de aminas heterocíclicas (IQ)
1.3.	Indicadores de la Reacción de Maillard
1.4.	Formación de furosina a partir de la ϵ -fructosilisina (Finot y Mauron, 1972)
1.5	Mecanismo de formación de acrilamida a partir de productos de descarboxilación de amadori o dicarbonilos de asparragina (Yaylayan y col., 2003; Zyzak y col., 2003; Stadler y col., 2004; Yaylayan y Stadler, 2005).
1.6	Rutas alternativas de formación de acrilamida (Eriksson y Karlsson, 2005)
1.7	Metabolismo de la acrilamida (tomado de Arribas Lorenzo, 2013)
4.1	Cromatograma representativo de azúcares en patata
4.2	Cromatograma tipo de asparragina libre en patata
4.3	Contenido de glucosa (%) en patata cruda y tras remojo
4.4	Contenido de fructosa (%) en patata cruda y tras remojo
4.5	Contenido de azúcares reductores (%) en patata cruda y tras remojo
4.6	Contenido de asparragina (%) en patata cruda y tras remojo
4.7	Contenido de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en patata frita a 170°C para cada tratamiento
4.8	Contenido de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en patata frita a 190°C para cada tratamiento
4.9	Comparación de acrilamida según temperatura de fritura para cada tratamiento
4.10	Color de las patatas fritas
4.11	Acrilamida frente a luminosidad en patatas fritas a 170°
4.12	Acrilamida frente a valor de color a en patatas fritas a 170°
4.13	Acrilamida frente a luminosidad en patatas fritas a 190°
4.14	Acrilamida frente a valor de color a en patatas fritas a 190°
4.15	Sexo de los encuestados.
4.16	Edad de los encuestados
4.17	Número de personas para las que cocina.
4.18	Días a la semana que comen patatas fritas.
4.19	Selección del tipo de patatas en la compra.
4.20	Porcentaje de personas según el remojo de la patata cruda
4.21	Tiempo de remojo de las patatas crudas antes de la fritura.
4.22	Modo de fritura
4.23	Grado de fritura
4.24	Cromatograma y espectro de masas de acrilamida y acrilamida marcada patrón
4.25	Cromatograma de acrilamida en cereales
4.26	Relación entre acrilamida y tiempo de tostado
4.27	Relación entre acrilamida y humedad durante el tostado del pan
4.28	Relación entre acrilamida y GIM durante el tostado del pan
4.29	Relación entre acrilamida y URF durante el tostado del pan
4.30	Relación entre acrilamida y GIM en productos de bollería
4.31	Relación entre furosina y GIM en productos de bollería

1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1. Reacción de Maillard

La reacción de Maillard ha jugado un papel esencial en el desarrollo de las características sensoriales de los alimentos tratados térmicamente. El aroma, sabor y color de los alimentos sometidos a procesos tradicionales de tostación, horneado, cocción y fritura son debidos a esta reacción.

En 1912 el bioquímico francés Louis-Camille Maillard, publicó los primeros estudios sistemáticos en los que se indicaba que los aminoácidos y azúcares reductores bajo complejas reacciones producidas durante el calentamiento, dan finalmente lugar a la formación de sustancias denominadas melanoidinas, vía condensación, eliminación y otros mecanismos de degradación. Las aportaciones posteriores de Amadori (1929), Heyns (1953), Hodge (1953) y otros muchos han llevado a considerar que la "Reacción de Maillard" está constituida por una serie de reacciones consecutivas y paralelas, que son influenciadas unas por otras así como por gran número de factores.

Los productos de Maillard están presentes en cantidades considerables en la dieta diaria debido a que la mayor parte de los alimentos contienen proteínas y carbohidratos.

La industria alimentaria selecciona las condiciones de procesado adecuadas para mejorar las características sensoriales de los alimentos y como consecuencia su aceptabilidad y seguridad. Sin embargo, el reto actual de la industria, organismos responsables de la seguridad alimentaria y de los consumidores es que, la reacción de Maillard puede también estar implicada en la formación de compuestos tóxicos.

1.1.1. Química de la Reacción de Maillard

La reacción de Maillard está integrada por un conjunto de reacciones en cadena que conducen a la formación de pigmentos pardos con modificaciones del color, olor y sabor de diversos alimentos. Se desarrolla generalmente a a_w bajas y pH básico necesitando un aporte de calor moderado. En 1953 Hodge propuso un esquema de las diversas etapas, que se incluye a continuación. (Figura 1.1).

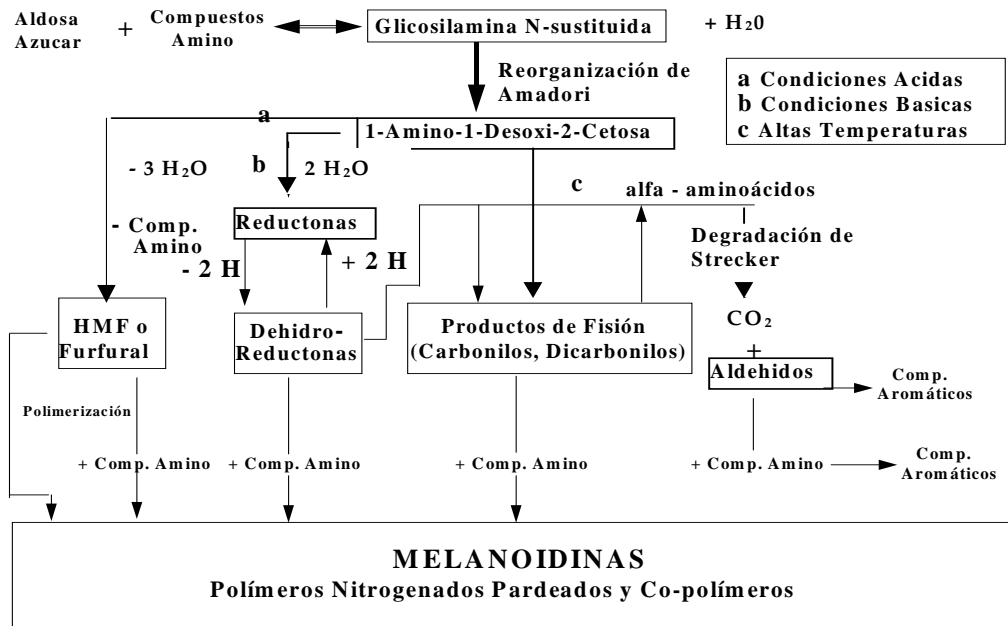
La etapa inicial de la reacción de Maillard comprende la condensación de un grupo carbonilo libre y un grupo amino, que tras deshidratación da lugar a una base de Schiff inestable que se transforma en la glicosilamina-N-sustituida. Esta reacción es reversible ya que en un medio fuertemente ácido se regenera el azúcar y el aminoácido. Las glicosilaminas son más estables si proceden de aminas aromáticas en lugar de aminoácidos (Rosen y col., 1953; Pigman y Johnson, 1953; Finot y Magnenat, 1981).

El siguiente paso supone la inmediata reorganización irreversible de la glicosilamina-N-sustituida. Cuando se parte de una aldósilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Amadori**, se genera 1-amino-1-desoxi-2-cetosa, mientras que cuando se parte de una cetósilamina-N-sustituida, mediante la **transposición de Heyns** se genera 2-amino-2-desoxialdosa. Los compuestos de Amadori (Mauron, 1981)

y de Heyns (McPherson y col., 1988) han sido encontrados en diversos alimentos y en el organismo humano.

La importancia de la transposición de Amadori para la producción de colores pardos, fue demostrada por Hodge y Rist (1953). Con estos conocimientos se pudo controlar las reacciones de pardeamiento en alimentos desecados.

Figura 1.1. Esquema general de la reacción de Maillard



Los compuestos de Amadori y de Heyns sufren una serie de descomposiciones que varían en función del pH o de la temperatura del medio. Estas reacciones comprenden las etapas intermedias de la reacción de Maillard y dan lugar a compuestos con color y olor.

A pH bajos ($pH \leq 7$) se produce una **enolización en posición 1,2** que origina compuestos dicarbonílicos (potentes precursores del pardeamiento) que dan lugar a 5-hidroxiacetilfurfural (HMF) cuando el carbohidrato implicado es una hexosa o furfural cuando es una pentosa (Moye y Krzeminski, 1963). Por el contrario, a pH básicos ($pH \geq 7$) se produce una **enolización en posición 2,3** que da lugar a reductonas (Cheftel y Cheftel, 1980) las cuales pueden deshidrogenarse para generar dehidroreductonas y estas a su vez en etapas más avanzadas pueden reaccionar con grupos amino y polimerizar.

Los compuestos de Amadori pueden escindirse dando lugar a diversos productos de fisión (compuestos dicarbonílicos) como el acetal o el diacetaldehído (Nursten, 1989).

La interacción de aminoácidos con los compuestos dicarbonílicos, ya sean dehidroreductonas o productos de fisión, se conoce como **degradación de Strecker** y supone la pérdida de aminoácidos del alimento (Cheftel y Cheftel, 1980). Como resultado de esta degradación se formarán nuevos aldehídos con un carbono menos que se elimina como CO₂ (Stadman y col., 1952).

Las etapas finales de la reacción de Maillard son complejas y dan lugar a dos tipos de compuestos: melanoidinas y compuestos aromáticos volátiles.

Los compuestos aromáticos volátiles de bajo peso molecular se producen sin la intervención de grupos amino a través de compuestos de Amadori, pero también puede realizarse sin formar estos compuestos (Guangyuan y col., 1997) a partir de la reacción de 2-desoxiglucosa con aminoácidos, lo cual aporta un 1% de dichos compuestos.

Cientos de productos volátiles de la reacción de Maillard han sido identificados en alimentos y sistemas modelo (Ferretti y Flanagan, 1971, 1972; Hayase y col., 1982; Milic y Piletic, 1984; Danehy, 1986) y pueden ser clasificados en tres grupos (Nursten, 1980):

- *Compuestos simples* generados a partir de la deshidratación de azúcares y/o productos de fragmentación: furanonas, pironas, ciclopentenos, carbonilos y ácidos.

- *Compuestos complejos*: productos de degradación de aminoácidos, aldehídos y compuestos azufrados.

- *Compuestos volátiles* producidos por nuevas reacciones: pirroles, piridinas, imidazoles, pirazinas, oxazoles, tiazoles, y productos de condensación de aldol.

Las melanoidinas son polímeros nitrogenados pardos y copolímeros producidos mediante la condensación de compuestos aminados procedentes de las etapas intermedias de la reacción de Maillard (O'Reilly, 1982) como son pirroles N-sustituídos, 2-formilpirroles N-sustituídos y 2-furaldehído (Tressl y col., 1988; Martins y col., 2001). Las melanoidinas varían ampliamente en peso molecular y poseen rasgos distintivos en la región visible del espectro (Richards, 1956; Clark y Tannenbaum, 1970).

1.1.2. Variables que intervienen en la reacción de Maillard

Sustratos

Los sustratos que intervienen en la reacción de Maillard son el grupo carbonilo, principalmente de azúcares reductores, y el grupo amino de aminoácidos y proteínas. Grupos carbonilo procedentes de la oxidación de grasas y de procesos de fermentación y grupos amino de distinto origen al anterior también contribuyen, aunque en menor medida.

Los **carbohidratos** de bajo peso molecular son más reactivos que los de alto peso molecular debido al menor impedimento estérico (Stepanenko y Serbyuk, 1950; Rubenthaler y col., 1963). La reactividad de los azúcares es proporcional a la cantidad de forma abierta (Burton y McWeeny, 1963). En los isómeros, la configuración esteroquímica determina su reactividad. De forma general, el grado de pardeamiento en los azúcares decrece en el siguiente orden: (1) pentosas, ribosa > xilosa > arabinosa; (2) hexosas (galactosa > manosa, glucosa > fructosa); (3) disacáridos (maltosa > lactosa). Hay que tener en cuenta que el azúcar no tienen un grado de reactividad absoluta y su comportamiento depende también del estado y naturaleza de las proteínas con las que reacciona. A mayor complejidad menor reactividad. La naturaleza del azúcar también condiciona la composición de las premelanoidinas. Las hexosas producen hidroximetilfurfural y las pentosas una mezcla de furfural e hidroximetilfurfural.

Cuando el pardeamiento por vía RM no es deseado, puede prevenirse eliminando uno de los sustratos, normalmente el azúcar.

Otras **moléculas con grupos carbonilo** (Pokorny, 1981), como las formadas por degradación de Strecker (formaldehído, acetal, propional) o las producidas durante la degradación de los compuestos de Amadori (Furfural e HMF) (Obretenov y col., 1983) pueden reaccionar con los grupos amino e iniciar otra vez la reacción.

Todas las **proteínas**, excepto las insolubles (queratina) son susceptibles de reaccionar con los azúcares. Los α -aminoácidos, que forman junto al grupo carbonilo el enlace peptídico, son poco accesibles durante los tratamientos por calor, no así los α -aminoácidos terminales y las proteínas que tienen un segundo grupo amino en estado libre. La intensidad de pardeamiento es proporcional a la concentración de lisina en los alimentos proteicos. Así, las proteínas lácteas producen una mayor velocidad de pardeamiento que las proteínas de soja (Hackler y Stillings, 1967; Wolf y col., 1977). La destrucción de lisina en productos lácteos es más rápida cuando la lactosa es hidrolizada o sustituida por glucosa. Por el contrario las proteínas de los cereales, que son pobres en lisina, son más resistentes a la reacción de Maillard (Frangne y Adrian, 1966).

Los **aminoácidos básicos libres** no reaccionan con los azúcares a una velocidad marcadamente superior al resto de aminoácidos, sino que es la configuración esteroquímica la que determina su comportamiento. Por otra parte, la presencia de aminoácidos libres condiciona el desarrollo de la reacción de Maillard entre lisina y azúcar; la valina acelera la velocidad de la reacción entre lisina-azúcar mientras que la arginina la disminuye.

La **mezcla de proteínas completas y aminoácidos libres** produce una mayor pérdida nutricional; a la pérdida de lisina en proteínas intactas hay que unir la de los otros aminoácidos (Adrian y Frangne, 1973).

En cuanto a la prevención, la transformación del grupo amino en amido mediante las transglutaminasas impide la 1ª etapa de la reacción (Friedman y Finot, 1990).

En alimentos, una mayor proporción de azúcares reductores respecto a grupos amino acelera el pardeamiento. Esto puede ser debido a diferentes mecanismos de destrucción de azúcares y aminoácidos. El pardeamiento en sistemas modelo aminoácido/azúcar también es máximo cuando los azúcares están en exceso. Dworschak y Orsi (1977) comprobaron que la proporción molar óptima en un sistema

metionina/glucosa era de 2:3. El efecto que sobre el pardeamiento ejerce la concentración de azúcares reductores depende, así mismo, de la temperatura de reacción.

Los sustratos implicados en las reacciones de pardeamiento definen algunos aspectos específicos del aroma y sabor, efectos antioxidantes, antimicrobianos, mutagénicos, etc. Mediante sistemas modelo se han podido identificar compuestos volátiles resultantes de la reacción de carbohidratos y grupos amino. En la degradación de Strecker cada aminoácido da lugar a un aldéhidido específico (Danehy, 1986).

pH

El pH inicial de los productos y la capacidad tampón del sistema influyen en el tipo e intensidad de las reacciones (Ellis, 1959; Nursten, 1980). Los efectos del pH son complejos, ya que cada una de las etapas de pardeamiento tiene un pH óptimo. A $\text{pH} < 3$ el pardeamiento es bajo y se incrementa conforme aumenta el pH hasta un máximo de 10 (Ashoor y Zent, 1984). En zonas más ácidas o alcalinas la degradación de azúcares se produce sin el consumo de aminoácidos. La reactividad del grupo amino es mayor cuando el aminoácido está en forma aniónica y este valor depende del carácter ácido-base del aminoácido.

Si estudiamos el efecto del pH en los alimentos, podemos distinguir:

- Alimentos cuyo pH está comprendido entre 6 y 8 (leche, huevos, cereales, carnes), en los que las condiciones son favorables a la reacción de Maillard. Un descenso del pH permite atenuar el pardeamiento durante la deshidratación, pero modifica desfavorablemente los caracteres organolépticos.

- Alimentos cuyo pH está comprendido entre 2.5 y 3.5 (zumos y concentrados de frutas ácidas). Estos productos son pobres en aminoácidos y la reacción de Maillard aparece de forma muy débil. Es la degradación del ácido ascórbico, así como la caramelización de los azúcares, la responsable del pardeamiento.

- Alimentos de pH intermedio (conservas vegetales, alimentos fermentados, miel, salsas, sopas), la reacción de Maillard y la degradación del ácido ascórbico pueden ocurrir simultáneamente.

Actividad de agua

La intensidad de la reacción de Maillard depende de la hidratación del medio. La máxima actividad se logra a humedad relativa del 50 y 70% (10-15% de agua en el producto). A niveles de humedad más altos se produce una disminución de la velocidad y se considera que no existe en ausencia de agua. La estabilidad de los alimentos deshidratados es grande, aunque la reacción se puede producir.

Temperatura

La reacción de Maillard se produce tanto a temperatura ambiente como a altas temperaturas. La energía de activación tiene valores que se encuentran entre 10-160Kj/mol; dependiendo de esta energía se favorecen unas etapas de la reacción frente a otras. Sin embargo, si relacionamos la reacción con otros criterios, la temperatura que se alcanza, y que nos proporciona una determinada energía de activación, marcará el camino a seguir por las reacciones. Diferentes aminoácidos con un mismo azúcar producirán diferentes aromas para una misma y distinta temperatura (Mabrouk, 1979) como se observa en la siguiente tabla (Tabla 1.1).

Tabla 1.1. Generación de aromas a partir de aminoácidos calentados a distintas temperaturas

aminoácido	100°C	120°C	180°C
leucina	chocolate dulce	corteza de pan	queso quemado
treonina	chocolate	trigo	quemado
valina	pan de centeno	corteza de pan	chocolate penetrante

Otros factores

La presencia o ausencia de cationes metálicos afecta a la reacción de Maillard. Las sales de cobre e hierro parece que aceleran la reacción, mientras que el manganeso la inhibe (Bohart y Carson, 1955). El hierro es considerado como catalizador del pardeamiento en la salsa de soja y también como constituyente de cromóforos melanoidínicos (Hashiba y col., 1981).

Compuestos como el etilmalonato, fenilacetona, sales de aminas terciarias, ácido acético, y trifluoruro de boro catalizan la reacción de Maillard y la transposición de Amadori (Yoshimura y col., 1969).

La presencia o ausencia de oxígeno no debería afectar a la reacción de Maillard. La intensidad de pardeamiento a veces varía con la atmósfera. El oxígeno tiende a incrementar la coloración (Webb, 1935; Volgunov y Pokhno, 1950; Kraft y Morgan, 1952), sin embargo este pardeamiento depende de factores más complejos, en los cuales, puede no darse la reacción de Maillard (Bohart y Carson, 1955).

Compuestos aceleradores/inhibidores

La presencia o ausencia de cationes metálicos afecta a la reacción de Maillard. Las sales de cobre e hierro aceleran la reacción mientras que el manganeso y estaño la inhibe (Bohart y Carson, 1955; Kato y col., 1981; Alais y Linden, 1990). El hierro es considerado como catalizador del pardeamiento en la salsa de soja y también como constituyente de cromóforos melanoidínicos (Hashiba y col., 1981). Hay que hacer notar que los primeros estudios atribuyen efectos a los cationes metálicos debidos al

descenso del pH que se produce en su incorporación al sistema (Powell y Spark, 1971). La influencia de los iones sobre la reacción depende de la concentración y del pH del sistema (Rendleman y Inglett, 1990). Ellis (1959) admitió que elementos como cobre, hierro y zinc inhibían el pardeamiento a pH ácido y que el cobalto sólo aceleraba la reacción en soluciones ácidas, pero no lo hacía en soluciones neutras.

Los compuestos carbonilos procedentes de los lípidos oxidados, son también capaces de reaccionar con los grupos amino favoreciendo el desarrollo de la reacción de Maillard (Zamora y Hidalgo, 1995; Seiquer y Navarro, 2003). Cuando los lípidos participan en la reacción, es posible que la presencia de vitamina E, debido a su carácter antioxidante reduzca la velocidad (Hermosin y col., 1992).

Compuestos como el etilmalonato, fenilacetona, sales de aminas terciarias, ácido acético y trifluoruro de boro catalizan la reacción de Maillard y la transposición de Amadori (Yoshimura y col., 1969).

La adición de ácido glutámico o aspártico en sistemas modelo con lisina/hexosa a pH constante, produce una disminución del pardeamiento (Nafisi y Markakis, 1983). Estos efectos pueden ser asociados a la estabilidad de los compuestos de Amadori formados con el ácido glutámico o aspártico, ya que se ha demostrado que el pardeamiento aparece más lentamente que con otros compuestos de Amadori (Eichner y Ciner-Doruk, 1981).

La presencia o ausencia de oxígeno no debería afectar a la reacción de Maillard. La intensidad de pardeamiento a veces varía con la atmósfera. El oxígeno tiende a incrementar la coloración (Webb, 1935; Volgunov y Pokhno, 1950; Kraft y Morgan, 1952) sin embargo este pardeamiento depende de factores más complejos, en los cuales, puede no darse la reacción de Maillard (Bohart y Carson, 1955). No obstante durante la conservación de cereales infantiles se observó un ligero incremento de los indicadores de pardeamiento, furosina, HMF y color, en los conservados en atmósfera de nitrógeno que en los conservados en atmósfera de oxígeno (Ramirez-Jimenez y col., 2003 y 2004).

Los compuestos químicos más utilizados para la inhibición del pardeamiento son los sulfitos, que reaccionan con los compuestos carbonilos, bases de Schiff y compuestos carbonilos no saturados para dar sulfonatos muy estables. Los sulfitos fijan así los productos intermedios más reactivos del pardeamiento no enzimático, con lo que alargan el período de inducción y retardan mucho la aparición de pigmentos. Algunas veces, cuando desaparecen los sulfitos libres, se reinicia el proceso de pardeamiento.

Friedman y Molnar-Perl (1990a) realizaron un estudio sobre la posible inhibición o minimización de la reacción de Maillard, producida por aminoácidos azufrados. Trataron a diferentes temperaturas y concentraciones mezclas de glucosa y β -alanina, N-acetil-L-lisina, glicilglicina y una mezcla de aminoácidos, en ausencia y presencia de los siguientes inhibidores potenciales: N-acetil-L-cisteína, L-cisteína, glutatión reducido, bisulfito sódico y urea. Los resultados indicaron que los compuestos que contienen grupos SH, tales como la cisteína, L-acetil-L-cisteína y glutatión reducido son casi tan efectivos en la prevención de la reacción de Maillard en mezclas calentadas de aminoácidos y glucosa, como el bisulfito de sodio. La urea es menos eficaz pero puede tener un importante papel en productos para alimentación animal por ser una importante fuente de nitrógeno para rumiantes como ovejas y vacas (Friedman y col., 1982).

Los sucesivos trabajos de Friedman y Molnar-Perl han demostrado que los aminoácidos azufrados pueden prevenir el pardeamiento en varios productos alimenticios. En zumos frescos, zumos de frutas comerciales y alimentos proteicos, la N-acetil-L-cisteína tiene la misma eficacia que el bisulfito de sodio (Friedman y Molnar-Perl, 1990b).

1.1.3. Consecuencias de la Reacción de Maillard

1.1.3.1 Consecuencias Tecnológicas.

Desde el punto de vista tecnológico la compleja secuencia de reacciones de Maillard influye sobre las características y calidad de los alimentos de muy distinta forma.

Los aspectos más destacables de la reacción se pueden sintetizar en los siguientes apartados:

A. Mejora de las propiedades organolépticas de determinados productos alimenticios elaborados desarrollando aromas, sabores y colores deseables.

B. Síntesis de aromas y aplicación como aditivos alimentarios.

C. Formación de productos con efectos antimicrobianos y antioxidantes que mejoran la conservabilidad de los alimentos elaborados.

D. Deterioro de la calidad sensorial del alimento como consecuencia de métodos de procesado y conservación inapropiados de gran trascendencia en productos elaborados.

Los tratamientos tecnológicos a que son sometidos los alimentos son responsables de la producción de aromas y colores deseables o indeseables. Los tratamientos térmicos incluyen tostado, asado, horneado, concentrado y deshidratado. Cuantitativamente, los aromas formados en estos tratamientos suponen menos del 0,2% de los productos aparecidos; sin embargo el umbral de percepción es extremadamente pequeño. Actualmente se han identificado unos 5.000 compuestos aromáticos y aproximadamente la mitad se forman en esta reacción.

Los alimentos cuyas propiedades organolépticas mejoran con estas reacciones son: café, horneado de productos de bollería, cacao, procesado de carne y pescado, patatas y cerveza. El tostado a 220°C del grano verde de café origina un producto pardo adecuado para el consumo. El azúcar, proteínas y ácido clorogénico intervienen en esta reacción, bien por reacciones de pirólisis de azúcar o Maillard (Hurrell, 1990). El procesado del cacao trae consigo ciertas fermentaciones que transforman el azúcar en glucosa y fructosa, y se liberan aminoácidos. Las pirazinas y compuestos carbonílicos se encuentran entre los más importantes (Hurrell, 1990). El aroma de la carne se origina en la degradación térmica de las proteínas, azúcares y nucleótidos, productos de Maillard y oxidación de las grasas. Los aminoácidos azufrados son los que contribuyen a la principal de las reacciones del aroma (reacción de Maillard) (Hurrell,

1990). En las patatas los compuestos responsables del aroma dependen del procesado: cocción, asado y fritura. En otros productos como la cerveza, la reacción de Maillard interviene en el tostado de la malta. En el tostado de frutos secos se producen aldéhdos y pirazinas con aromas característicos (Hurrell, 1990).

La formación de compuestos responsables del sabor depende de: (1) tipo de azúcares y aminoácidos implicados, y, (2) de la temperatura de reacción, tiempo, pH y contenido de agua (Jousse y col., 2002). En general, el primer factor mencionado determina el tipo de compuestos formados, mientras que el segundo factor influye en la cinética. En el caso de la carne, los compuestos proceden de aminoácidos con azufre (cisteína) y ribosa (nucleótidos), mientras que el aminoácido prolina da lugar a pan, arroz y palomitas de maíz con sabores típicos. La siguiente tabla (Tabla 1.2.) recoge los aromas generados por diferentes compuestos derivados de la reacción de Maillard en alimentos tratados térmicamente (Van Boekel, 2006).

La formación de compuestos aromáticos procedentes de reacción de Maillard es muy complicada. Las vías que conducen a estas clases de compuestos son más o menos conocidas, pero aún se desconoce como controlar o dirigir una vía de producción. Además, la mayoría de los trabajos publicados utilizan sistemas modelo en lugar de alimentos. Los efectos de la matriz alimentaria, incluidos los efectos de pH, contenido de agua, la catálisis específica, aún se desconocen (Van Boekel, 2006).

Las reacciones de Maillard producen deterioro sensorial de los alimentos como consecuencia de procesados y conservación inapropiados en productos como leche, frutas deshidratadas, mermeladas, zumos de frutas etc.

Tabla 1.2. Compuestos formados en la reacción de Maillard relacionados con los aromas de los alimentos tratados térmicamente.

Clase de compuesto	Asociación sabor/aroma	Alimento
Pirazinas	Cereales horneados, sabor a tostado, asado, cocinado	Alimentos calentados en general
Alkilpirazinas	Sabor a nuez. sabor a asado	Café
Alkilpiridinas	Sabor a hierba, amargo, astringente, a quemado	Café, cebada, malta
Acilpiridinas	Sabor a galleta	Cereales
Pirroles	Sabor a cereal	Cereales, café
Furanos, furanonas, piranonas	Sabor dulce, a quemado, pungente, a caramelo	Alimentos calentados en general
Oxazoles	Sabor a hierba, a nuez, a dulce	Cacao, café, carne
Tiofenos	Sabor a carne	Carne cocinada

1.1.3.2. Consecuencias Toxicológicas

La reacción de Maillard se extiende a gran número de alimentos y sistemas de procesado por lo que la evaluación de la toxicidad de los productos de esta reacción es de gran importancia si bien los estudios toxicológicos realizados en este campo son difíciles de evaluar.

Cuanto más avanzada esté la reacción los efectos tóxicos son menores ya que las melanoidinas insolubles son menos activas fisiológicamente (Adrian y col., 1966). La presencia de estos compuestos produce diarreas al incrementar la osmolaridad del lumen (Lee y col., 1982). Las melanoidinas no absorbidas producen una hipertrofia de las células del intestino y un descenso de los niveles de colesterol, triglicéridos y glucosa en suero (Adrian, 1974; Wise y col., 1984). El grado de hipertrofia depende de la especie ensayada.

El aislamiento y la identificación de mutágenos en alimentos comenzaron a finales de los años 70. En 1977 se encontraron altos niveles de mutagenicidad en las partes quemadas de carnes y pescados a la parrilla (Kasai y col., 1979). Alimentos con bajo contenido en agua y alto contenido en proteína inducen una alta mutagenicidad. En ellos, se encontraron aminas heterocíclicas aromáticas que posteriormente, a finales de los 80 pudieron ser identificadas y cuantificadas en alimentos procesados con métodos más efectivos como GC/MS o LC/MS (Gooderham y col., 1987; Edmonds y col., 1986; Yamaizumi y col., 1986).

La formación de las aminas heterocíclicas durante el procesado industrial y/o culinario de los alimentos cárnicos puede estar influida por algunos factores composicionales como la creatina presente en el tejido muscular, la grasa o el agua así como los azúcares y los aminoácidos. Diversos estudios han puesto de manifiesto que la creatina es necesaria para la formación de los aminoimidazoarenos y que existe una relación directa entre la cantidad de aminoácidos o péptidos de cadena corta y la actividad mutagénica resultante. En cuanto a los azúcares, se ha demostrado que su presencia es necesaria para la formación de las aminas heterocíclicas, aunque algunos autores han puesto de manifiesto que la adición de glucosa o lactosa a la carne inhibe en parte la formación de estas y en consecuencia, disminuye la actividad mutagénica generada por la cocción (Galceran, 2002).

A finales de los años 70, Sugimura y colaboradores (Nagao y col., 1977) descubrieron que en determinadas condiciones, el humo procedente de la cocción de alimentos ricos en proteínas contenía cantidades apreciables de sustancias mutágenas. Estudios posteriores pusieron de manifiesto que las partes más tostadas de carnes y pescados asados presentaban una actividad mutágena notable debida a la presencia de unas sustancias básicas. Actualmente se han identificado 23 de estas sustancias, todas ellas pertenecientes al grupo genérico de las aminas heterocíclicas (AHs). Dependiendo del mecanismo de generación y de los precursores, las AHs se pueden clasificar en dos grandes grupos, las carbolinas y los aminoimidazoarenos. Las carbolinas también conocidas como aminas pirolíticas, se forman a temperaturas superiores a los 300°C por pirólisis de aminoácidos o proteínas vía reacciones radicalarias. Estas aminas contienen en su estructura grupos piridoindol o

piridoimidazol. El segundo gran grupo, los aminoimidazoazarenos (AIA), reciben el nombre genérico de aminas térmicas ya que se forman al cocinar alimentos ricos en proteínas, como la carne o el pescado, a temperaturas inferiores a los 300°C. Todas ellas contienen en su estructura el grupo 2-aminoimidazo y una quinolina (IQ, MeIQ), una quinoxalina (MeIQx, DiMeIQx) o un anillo de piridina (PhIP, DMIP). En general, los imidoazoazarenos son compuestos algo más polares que las carbolinas, característica que se utiliza para la agrupación de las aminas heterocíclicas en dos familias (Galceran, 2002).

Desde el punto de vista de su actividad mutagénica, y por tanto de su potencial cancerígeno, se ha establecido, utilizando el test de Ames, que algunas de las aminas presentan un índice de mutagenicidad más de 1.000 veces superior al del benzopireno lo que pone de manifiesto su elevada toxicidad potencial. De hecho, existen datos que demuestran que estos compuestos son cancerígenos en ratones, ratas y primates en los que se han detectado tumores en diversos órganos como por ejemplo el hígado, los intestinos, el estómago, el pulmón, la piel y las glándulas mamarias (Pence y col., 1998). En la Tabla 1.3 se indican los principales precursores de algunas de las aminas heterocíclicas.

Los productos mutagénicos y carcinogénicos que se forman en alimentos cocinados ricos en proteína lo hacen por mecanismos diferentes que incluyen: caramelización, pirólisis de proteína, reacciones aminoácidos-creatinina y reacciones amino-carbonilo (Maillard) en la que se producen furanos, gran variedad de aminas heterocíclicas y melanoidinas (Friedman y Cuq, 1988; Friedman y col., 1990a,b; Friedman y Henica, 1991; Vagnerelli y col., 1991).

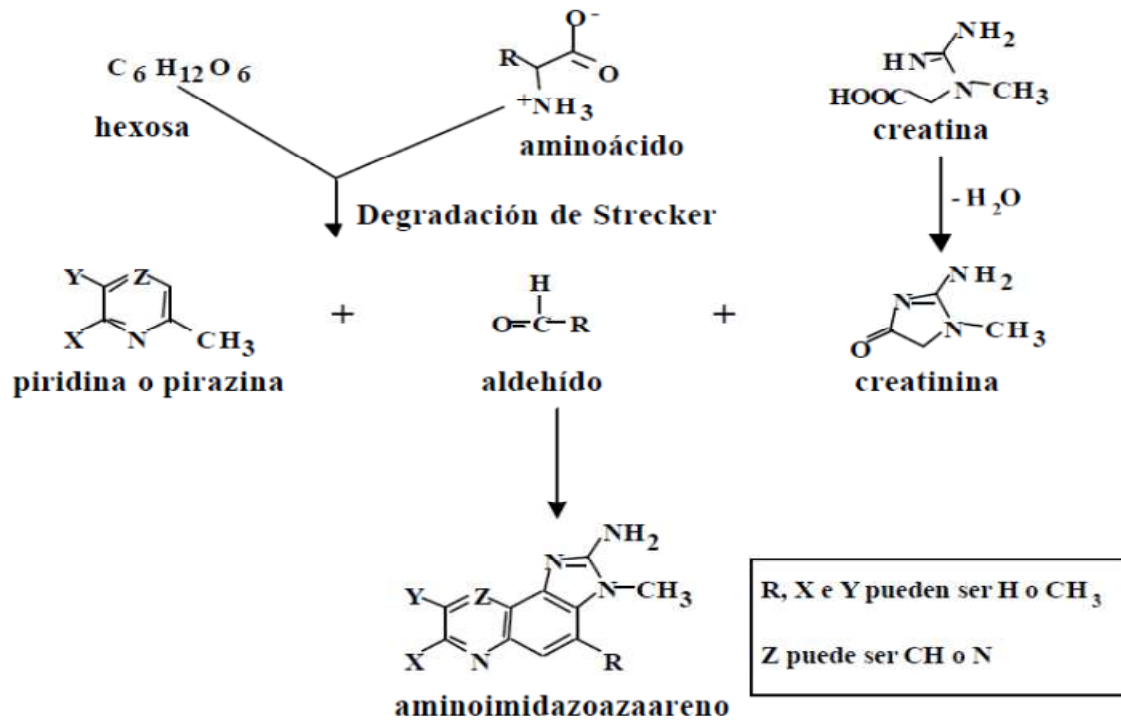
Tabla 1.3. Principales precursores de algunas de las aminas heterocíclicas

Acrónimo	Precursores
IQ	Creatina, glicina, fenilalanina, serina, prolina, fructosa, glucosa
MeIQ	Creatina, alanina, glucosa
MeIQx	Creatina, glicina, alanina, treonina, lisina, fructosa, glucosa, ribosa
4,8-DiMeIQx	Creatina, alanina, treosina, lisina, fructosa, glucosa, ribosa
7,8-DiMeIQx	Creatina, glicina, glucosa
PhIP	Creatina, fenilalanina, glucosa

IQ: 2-amino-3-metilimidazo[4,5-f]quinolina, MeIQ: 2-amino-3,4-dimetilimidazo-[4,5-f]quinolina, MeIQx: 2-amino-3,8-dimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina, 4,8-DiMeIQx: 2-amino-3,4,8-trimetilimidazo[4,5-f]quinoxalina, 7,8-DiMeIQx isómero de 4,8-DiMeIQx, PhIP: 2-amino-1-metil-6-fenilimidazo[4,5-b]piridina

En la Figura 1.2 se muestra el proceso de formación de estos compuestos propuesto por Jägerstad y Skog, (1991) donde se sugiere que la parte aminoimidazólica de la amina es aportada por la creatinina originada por ciclación de la creatina mientras que el resto de la molécula proviene de la condensación aldólica de una piridina o una piracina con un aldehído, ambos generados a partir de la degradación de Strecker de una hexosa y un aminoácido.

Figura 1.2. Ruta propuesta por Jägerstad y Skog, (1991) para la formación de aminas heterocíclicas (IQ)



Además de los factores composicionales, la aparición de estos contaminantes en el tratamiento térmico de los alimentos proteicos está influida por el material en el que se lleva a cabo el tratamiento, el tiempo, la temperatura y el tipo de cocción. Se ha observado que las aminas heterocíclicas se empiezan a formar a los 100°C y que la actividad mutagénica aumenta con la temperatura hasta los 170-200°C. Así en general, los tipos de cocción que implican temperaturas alrededor de los 100°C como hervir en agua, hacer al vapor o estofar generan pocos agentes mutagénicos. Sin embargo, los tratamientos térmicos que implican un calentamiento mediante procesos conductivos como freír o asar conducen a un aumento de la actividad mutagénica (Keating y col., 2000; Galceran, 2002).

La carcinogenicidad de las aminas heterocíclicas y otros carcinógenos representativos fueron ensayados sobre las cepas TA98 y TA100 de salmonella (*S. typhimurium*). Algunas de las aminas heterocíclicas muestran una actividad carcinogénica mayor que carcinógenos tan importantes como la aflatoxina o el benzopireno.

Las aminas heterocíclicas contribuyen al desarrollo de varios tipos de cáncer causados por mutación genética y crecimiento celular anormal. Nobuyuki y col. (1997) demostraron en que las AHs causan cáncer de colon y de la glándula mamaria en ratas. Rohrmann y col. (2009) encontraron que la probabilidad de padecer cáncer colorrectal aumentaba si la ingesta de AHs excedía de 41,4 ng al día. Archer y col. (2000) probaron que la ingesta crónica de AHs conduce al desarrollo de cáncer de colon, próstata y mama. Anderson y col. (2002) revelaron que el riesgo de cáncer pancreático es mayor

en personas que ingieren carne roja en su dieta de forma rutinaria que en aquellas que incluyen frutas y verduras de forma regular. Los alimentos ricos en proteína muscular (carne y pescado) poseen AHs que han mostrado ser hepatocancerígenas en roedores y primates (Negishi y col., 1990; Weisburger, 1991; Stavric, 1994). Sin embargo, hay otros autores que afirman que estos tipos de cáncer no solo están ligados a la presencia de AHs (Barrett y col., 2003) ya que la carne muy cocinada contiene otros carcinógenos como hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros componentes pro-oxidantes. Por tanto, puede decirse que la carcinogenicidad se debe no solo a las AHs sino a la compleja mezcla de componentes genotóxicos en carnes muy cocinadas (Cross y Sinha, 2004).

Pese a todo, las concentraciones de aminos heterocíclicos en las carnes muy cocinadas pueden ser reducidas añadiendo componentes con actividad antioxidante (Balogh y col., 2000) como los concentrados de proteína de soja (Wang y col., 1982). También se han encontrado efectos positivos en aderezantes utilizados al cocinar la carne, como el ajo, el tomillo, romero o pimienta que reducen la formación de AHs (Puangsombat y col., 2011; Balogh y col., 2000; Oz y Kaya, 2011).

La mutagenicidad de compuestos puros de la reacción de Maillard también ha sido objeto de estudio. Algunas pirazinas y furanos (2-metilpirazina, 2-etilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, alcohol furílico, 2,5-dimetilfurano, 2-metilfurano, 5-metilfurano y 2-acetilfurano) ensayados no poseen mutagenicidad (Stich y col., 1980; Gómez-Arroyo y Souza, 1985); sin embargo si se ha encontrado en la 2-metiltiazolidina y la ϵ -[2-formil-5-(hidroximetil)pirrol-1-il] norleucina (Omura y col., 1983).

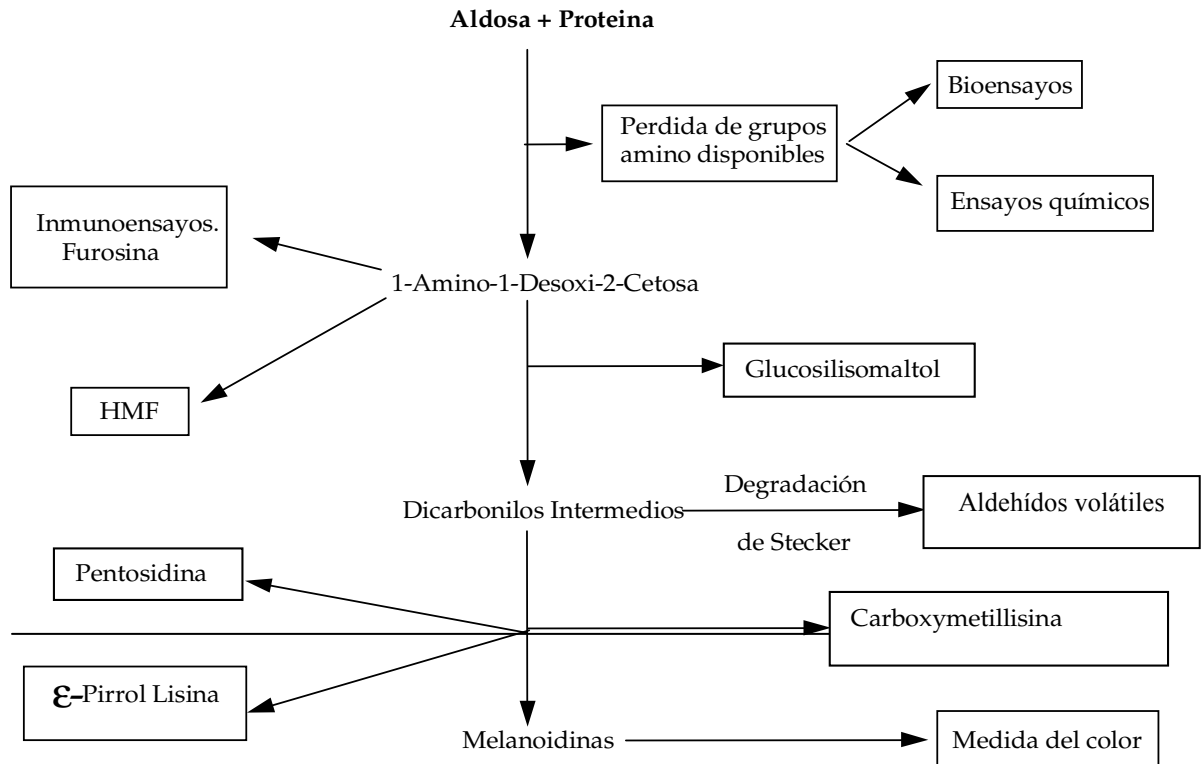
Las aminos heterocíclicos se han detectado en carnes de distinto origen (bovino, ovino, porcino y aves de corral) y en pescados fritos, a la plancha o a la parrilla y procedentes tanto de restaurantes como de casas particulares así como en productos precocinados, en extractos de carne, en aromatizantes comerciales y en los residuos que quedan en las sartenes o las planchas después de la cocción. También se ha descrito su presencia en muestras medioambientales y en algunas bebidas alcohólicas como el vino o la cerveza aunque lo más frecuente es encontrarlas en alimentos proteicos que han sido sometidos a tratamientos térmicos a elevadas temperaturas (Galceran, 2002).

1.1.4. Indicadores de la reacción de Maillard

La extensión de la reacción de Maillard en alimentos puede seguirse con numerosos métodos que incluyen desde ensayos químicos clásicos a los ensayos biológicos. Los objetivos principales son definir, en el alimento, el estado nutricional, características organolépticas y su posible toxicidad después del procesado y/o almacenamiento, para así optimizar los procesos de elaboración y conservación y conseguir productos con una buena calidad final y un alto valor nutritivo.

Según el indicador ensayado se obtendrá información de las diferentes etapas de la reacción (inicial, intermedia y final) (Figura 1.3)

Figura 1.3. Indicadores de la Reacción de Maillard



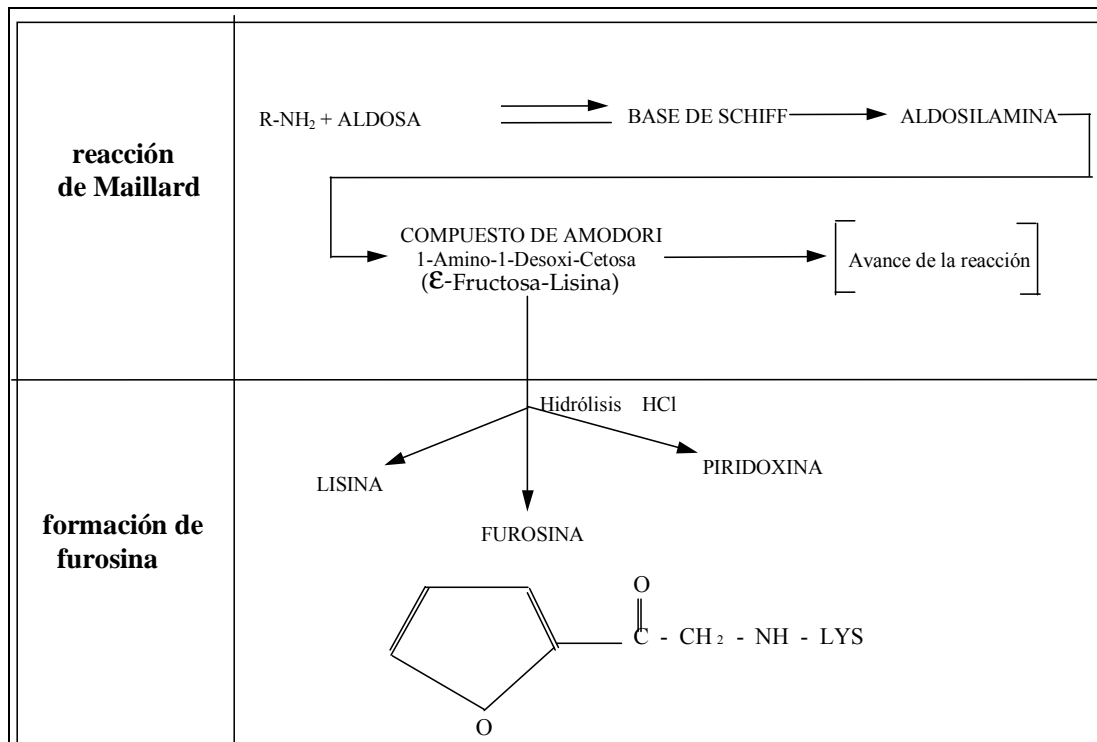
La furosina, carboximetilisina (CML), hidroximetilfurfural (HMF), pirralina y pentosidina, son indicadores utilizados ampliamente para la evaluación nutricional de los alimentos tratados térmicamente (Erbersdobler y Somoza, 2007).

Furosina

La furosina fue uno de los primeros productos identificados de la RM, el cual fue cuantificada en alimentos hace 50 años como un indicador químico de los compuestos de Amadori (N^{ϵ} -fructosilisina) (Erbersdobler y Somoza, 2007).

La ϵ -fructosilisina (compuesto de Amadori), libre o combinada a proteínas, libera, por hidrólisis ácida, dos nuevos aminoácidos, furosina (20%) y piridosina (10%) y se recupera el 50% de la lisina bloqueada (Finot y Mauron, 1972) (Figura 1.4). En condiciones similares la ϵ -lactulosa-lisina genera un 32% de furosina y un 40% de lisina (Bujard y Finot, 1978). Hay que tener en cuenta que la cantidad de furosina generada puede variar al depender de las condiciones de hidrólisis utilizadas (Finot y Mauron, 1972).

Figura 1.4. Formación de furosina a partir de la ε-fructosilisina (Finot y Mauron, 1972)



La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica más utilizada para la determinación de furosina. Mediante esta técnica se ha evaluado la modificación de la lisina en numerosos alimentos: leche (Lopez-Fandiño y col., 1993), formulas infantiles (Evangelisti y col., 1994; Birlouez-Aragon y col., 1999; Sarriá y col., 2001; Guerra-Hernández y col., 2002a y b), galletas (Harris y Johnson, 1987), pasta (Resmini y Pellegrino, 1994), pan (Ramírez-Jiménez y col., 2001; Cárdenas y col., 2004) huevos (Hidalgo y col., 1995) y cereales infantiles (Guerra-Hernández y Corzo, 1996; Guerra-Hernández y col., 1999; Ramírez-Jiménez y col., 2003), miel (Cárdenas y col., 2003; Villamiel y col., 2001), cereales de desayuno (Rufian-Henares y col., 2006a), fórmulas enterales (Rufián-Henares y col., 2002a,b), sistemas modelo (Rufián-Henares y col., 2004), e ingredientes proteicos (Contreras-Calderón y col., 2008).

5-Hidroximetilfurfural (HMF)

Etapas más avanzadas de la reacción de Maillard pueden seguirse mediante la detección de HMF. La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es la técnica que más se utiliza en la actualidad. Así, se han conseguido resultados satisfactorios analizando HMF en leches (Van Boekel y Zia-Ur-Rehman, 1987; Morales y col., 1992, 1995 y 1997), cereales de desayuno (García-Villanova y col., 1993; Rufian-Henares y col., 2006a), zumos y concentrados de frutas (Porretta y Sandei, 1991), café (Dauberte y col., 1990), cerveza (Morawski y col., 1989), vino (Williams y col., 1983) y cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 1992, Fernández-Artigas y col., 1999a, b).

Este indicador también proviene de las reacciones de caramelización y como control de este proceso se ha utilizado en miel (Jeuring y Koppers, 1980) y zumos de frutas (Lee y col., 1986), entre otros.

Furfural

El furfural es un compuesto furánico que se produce en las reacciones de degradación del ácido ascórbico, caramelización y reacción de Maillard (etapas intermedias). Este compuesto es formado durante tratamientos térmicos, deshidratación o almacenamiento a temperaturas inadecuadas de alimentos como batatas (Sun y col., 1993), mermelada de fresa (Gomis y col., 1991), zumos de fruta (Lo Coco y Novelli, 1997), bebidas alcohólicas (Lo Coco y col., 1995), café (Kanjahn y col., 1996; Kanjahn y Maier, 1997 a,b), cereales de desayuno (Rufián-Henares y col., 2006 a,b) y fórmulas infantiles sólidas y líquidas (Albalá-Hurtado y col., 1997, 1999; Guerra-Hernández y col., 2002a,b; Ferrer y col., 2002, 2005; Chávez-Servín y col., 2006).

En la actualidad la determinación de furfural se realiza casi exclusivamente por HPLC ya que esta técnica permite la cuantificación de forma individual. Se separa en columnas de fase reversa y se mide a 277 nm aprovechando el alto coeficiente de absorptividad molar.

Glucosilisomaltol

El glucosilisomaltol (glucopiranosil-oxi-2-furil-metil-cetona o 2-acetil-3-D-glucopiranosil-furano) es un compuesto que se forma en el calentamiento de maltosa con aminas primarias y secundarias (Kramhöller y col., 1992). Estos mismos autores demuestran que existe relación entre la formación de este compuesto y la temperatura y tiempo de reacción de los sustratos. Resmini y col. (1993) en estudios sobre sistemas modelo realizados con azúcares y azúcares-aminoácidos detectan glucosilisomaltol únicamente en el sistema que contiene maltosa y glutamina. Estos mismos autores proponen este compuesto como indicador de sobrecalentamiento de pasta durante el secado. Recientemente este compuesto ha sido identificado en productos panarios (Cárdenas y col., 2004), papillas de cereales durante el proceso de elaboración y conservación de estos productos (Ramírez-Jiménez, 2001), cereales infantiles (Guerra-Hernández y col., 2002c), cereales de desayuno (Rufián-Henares y col., 2006a,b,c) y galletas (Rufián-Henares y col., 2008).

Color

La medida del color es un indicador de la etapas finales de la reacciones de pardeamiento químico y es un importante indicador de la intensidad de la reacción. La coloración se puede producir con el concurso o no del aminoácido. Durante la caramelización el color proviene de la degradación del azúcar y esta depende sobre todo del pH y temperatura (Schroeder y col., 1955). El color se relaciona con el tratamiento térmico, aunque no es un criterio sensible para el estudio de la reacción

de Maillard, comparado con otros métodos (Friedman y Kline, 1950; Bookwalter y Kwolek, 1981).

El color desarrollado en las reacciones de pardeamiento químico en sistemas modelo (Hidalgo y Zamora, 1993), alimentos líquidos (Bertelli y col., 1996) y alimentos sólidos (Resmini y col., 1993; Fernández-Artigas y col., 1999b) también puede seguirse mediante medida de los parámetros de color L^* (luminosidad), a^* (rojo-verde) y b^* (amarillo-azul) que nos proporciona el fotómetro de reflexión.

Azúcares reductores

Los azúcares son sustrato de las reacciones de pardeamiento químico. La reducción de azúcares reductores puede ser indicador de estas. Sin embargo, en alimentos que sufren calentamientos muy drásticos, la medida de la disminución del poder reductor, basado en la disminución de azúcares, no es adecuada. En condiciones extremas las reacciones de Maillard y caramelización producen sustancias reductoras que alcanzan las 2/3 partes del poder reductor total determinado (Adrian y Frangne, 1966).

Aminoácidos

La determinación de la lisina útil o lisina disponible es un buen indicador de la reacción de Maillard y de la pérdida nutricional. El grupo ϵ -amino libre puede reaccionar con agentes específicos y esto da lugar a los diferentes métodos. El 2,4 dinitrofluorobenceno (FDNB) es el reactivo clásico que se utiliza para reaccionar con el grupo amino. Carpenter y Ellinger (Carpenter y Ellinger, 1955; Carpenter, 1960) lo aplicaron con éxito para determinar el grupo ϵ -amino de la lisina por medida colorimétrica (435 nm) del derivado formado (dinitrofenil-lisina, DNP-lisina) tras hidrólisis de la muestra con ácido clorhídrico. La separación de DNP-lisina de otros DNP-aminoácidos que se logra con éter y el paso por columnas cromatográficas tipo Amberlita, mejoran la especificidad del método (Nielsen y Weidner, 1966). En alimentos ricos en carbohidratos y/o fuertemente calentados, este método, posee discrepancias con los métodos de "lisina útil" biológicos (Baliga y col., 1959; Miller y col., 1965; Boctor y Harper, 1968). Las discrepancias observadas en alimentos con alto contenido en carbohidratos se compensan, en parte, multiplicando por factores (1,05 y 1,1) que corrigen la pérdida de DNP-lisina sufrida por la presencia de sustancias reductoras (Carpenter, 1960; Kakade y Evans, 1966; Booth, 1971).

El DNP-lisina puede ser determinado mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), lo que permite realizar el análisis de forma más específica. Por otra parte la hidrólisis de las muestras en autoclave permite reducir considerablemente el tiempo de análisis (Rabasseda y col., 1988).

De forma indirecta la lisina útil puede determinarse midiendo el aminoácido antes y después del tratamiento con fluorodinitrobenzoceno.

El método con el ácido trinitrobenzenosulfónico (TNBS) presenta la ventaja de ser más rápido que el ensayo con FDNB (2 horas de reacción con TNBS, seguido de 1

hora de hidrólisis). Sin embargo, la técnica sobrevalora la concentración de lisina disponible (Holsinger y Posati, 1975) debido a la reacción del TNBS con los compuestos de Amadori (Mauron, 1981).

El *o*-ftaldialdehído (OPA) es un reactivo fluorigénico que se utiliza para determinar grupos amino, principalmente lisina (Vigo y col., 1992). El método es muy sensible, requiere poca muestra, un tiempo de análisis reducido y no necesita hidrólisis de proteínas (Goodno y col., 1981). La pérdida de fluorescencia que ocurre tras el tratamiento de los alimentos ha sido usada para el control del procesado térmico de leches (Morales y col., 1996).

1.1.5. Acrilamida

La acrilamida (AA) (2-propenamida), es una amida acrílica con la siguiente fórmula empírica C_3H_5NO . Es una sustancia blanca incolora e inodora. Debido a su capacidad para polimerizarse espontáneamente a T^a superiores a $84,5^{\circ}C$ es utilizada en la industria desde 1950 para elaborar poliacrilamida. Se utiliza como floculante, para la purificación de agua, en productos cosméticos y como coadyuvante en el sellado de túneles. Esta última aplicación fue la que llevó a su descubrimiento en 1997 en Suecia, al filtrarse por accidente agua contaminada a arroyos y aguas subterráneas próximos al lugar donde se estaba construyendo un túnel ferroviario (Pedreschi y col., 2014). Los primeros efectos fueron la aparición de síntomas de parálisis en ganado y peces, además de síntomas neurotóxicos en los trabajadores del túnel (Reynolds, 2002). La determinación de aductos de acrilamida-hemoglobina (Hagmar y col., 2001), en el ganado y peces del entorno y en personas que vivían fuera de la zona contaminada (Tareke y col., 2002) llevaron a pensar en la existencia de otras fuentes de contaminación.

En Abril de 2002, la Administración Nacional de Alimentos y la Universidad de Estocolmo de Suecia comunicaron la presencia de acrilamida en una amplia variedad de alimentos fritos y horneados. A partir de esa fecha la FDA, 2002 confirmó la presencia en alimentos de concentraciones elevadas; resultados confirmados por un gran número de investigadores. Estos hallazgos, impulsaron a la comunidad internacional a conocer las vías y condiciones de formación, diseñar sistemas de reducción y evaluar el riesgo de la presencia de acrilamida en alimentos.

1.1.5.1. Sustratos de formación de acrilamida

Los sustratos capaces de formar acrilamida fueron ensayados en un gran número de sistemas modelo. Los sistemas que contenían asparragina y alguno de los siguientes compuestos, glucosa, fructosa, sacarosa, sorbitol, gliceraldehído, glicolaldehído y 2,3 pentanodiona calentados a $250^{\circ}C$ generaban acrilamida y la cantidad aumentaba con la temperatura. A $250^{\circ}C$, el sistema asparragina/glicolaldehído fue más eficiente en la generación que el sistema de asparragina/glucosa; y a $350^{\circ}C$ el sistema asparragina/sacarosa. El menos eficiente a ambas T^a fue el de asparragina/2,3-pentanodiona que solo produjo trazas de acrilamida (Yaylayan y col., 2003). Las comparaciones entre diferentes azúcares fueron

también estudiadas por Stadler y col., (2002) y encontraron que la fructosa, galactosa, lactosa y sacarosa liberaban acrilamida con rendimientos comparables. Sin embargo, Biedermann y col. (2002) y Pollien y col. (2003) demostraron en un sistema modelo con patata que la fructosa es más eficiente que la glucosa. Mottram y col. (2002); Stadler y col. (2002); Becalski y col. (2003) confirmaron que la reacción de formación de acrilamida implica la reacción específica del aminoácido con un azúcar reductor en presencia de calor. En el caso de la sacarosa (azúcar no reductor) el calor hidroliza el azúcar y genera los correspondientes azúcares reductores (glucosa y fructosa). Por otro lado, mientras que la glucosa es muy buena fuente de formación de acrilamida, la 2-desoxiglucosa al no tener el grupo hidroxilo adyacente al carbonilo sólo puede formar un aducto con base de Schiff pero no la transposición de Amadori, que conduce a la formación de compuestos dicarbonilo, por ejemplo 3-desoxiglucosona (Zyzak y col., 2003).

En resumen, la acrilamida puede formarse en distintas cantidades con mono y disacáridos capaces de reaccionar con el grupo α -NH₂ de la asparragina vía Maillard tras un tratamiento térmico que permita la hidrólisis de los disacáridos.

La asparragina es el principal aminoácido que interviene en la formación de acrilamida (Mottram y col., 2002; Stadler y col., 2002). Otros aminoácidos como, alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, glutamina, metionina, treonina y valina también producen acrilamida, pero en bajas cantidades (Xu y col., 2014).

La formación de acrilamida también se ve afectada por la matriz y por los parámetros que influyen en su generación. Los estudios sobre matrices y parámetros que afectan en cada matriz incluyen, las patatas, cereales, pan, almendras y café entre otras (Zhang y Zhang, 2007).

1.1.5.2. Mecanismos de Formación de Acrilamida

Numerosos grupos de investigación iniciaron los estudios sobre las posibles fuentes y mecanismos de formación de acrilamida tras el descubrimiento de la acrilamida en los alimentos tratados térmicamente (SNFA, 2002; Tareke y col., 2002). Varias hipótesis sobre las vías de formación fueron discutidas en las primeras etapas de las investigaciones, centrándose inicialmente en los aceites vegetales o lípidos, ya que el problema abarca principalmente alimentos ricos en carbohidratos que eran fritos u horneados. Se demostró que la 3-aminopropionamida, la base de Schiff descarboxilada (Zyzak y col., 2003), producto de Amadori descarboxilado (Yaylayan y col., 2003), ácido acrílico (Becalski y col., 2003; Stadler, 2003), y la acroleína (Yasuhara y col., 2003) eran precursores críticos en la formación de acrilamida (Figura 1.5).

Las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento demuestran que la reacción de Maillard es la principal vía de formación y la asparragina el principal aminoácido implicado (Mottram y col., 2002; Stadler y col., 2002). Los ensayos con isótopos estables marcados demostraron, que la asparragina, proporcionaba la cadena principal de la molécula de acrilamida y los estudios de espectrometría de masas confirmaron que los tres átomos de carbono y el átomo de nitrógeno de la acrilamida

son todos derivados de asparragina. La asparragina por si sola podría dar lugar a la formación de acrilamida, pero la reacción es ineficiente y con muy bajo rendimiento (Granvogl y Schieberle, 2006). Sin embargo, el rendimiento aumenta considerablemente cuando la asparragina reacciona con grupos carbonilo procedentes de azúcares reductores (Stadler y col., 2004).

La formación de un producto de Amadori descarboxilado de asparragina se muestra en la Figura 2. Por otra parte, los lípidos oxidados se han sugerido como una vía menor, con el ácido acrílico formado a partir de la acroleína por la degradación oxidativa de los lípidos como precursor (Gertz y Klostermann, 2002).

1.1.5.2.1. Vía Principal: Reacción de Maillard

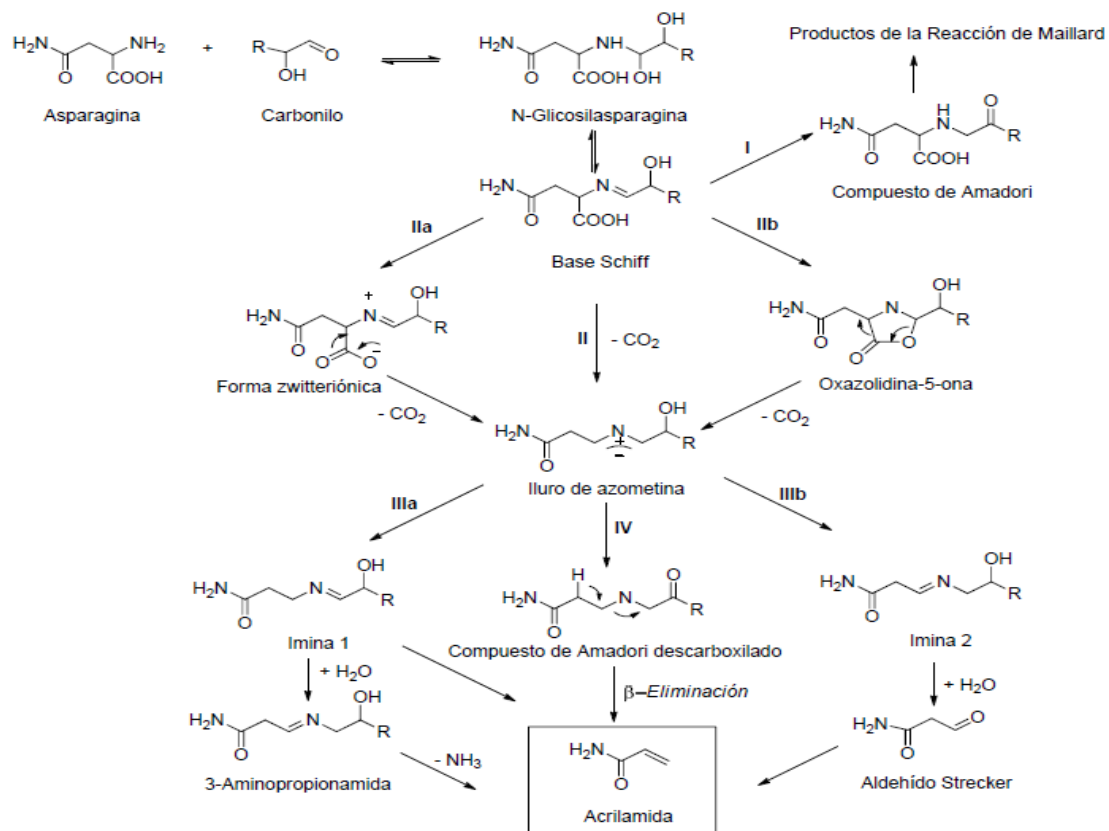
El primer paso de la RM conlleva la condensación de un aminoácido (por ejemplo, asparragina) con el grupo carbonilo de un azúcar reductor para formar un conjugado N-glicosil (por ej., N-glicosilasparragina) compuesto que está en equilibrio con su base de Schiff; intermediario clave tras deshidrataciones a elevadas temperaturas. En condiciones de baja humedad, tanto el conjugado N-glicosilo como la base de Schiff son relativamente estables. En sistemas acuosos, sin embargo, la base de Schiff puede hidrolizarse y dar lugar a precursores o reorganizarse en el correspondiente compuesto de Amadori, el cual no es un eficiente precursor en la formación de acrilamida (Yaylayan y col., 2003) (Figura 1.5).

La N-glicosilasparragina genera grandes cantidades de acrilamida, lo que sugiere que esta etapa inicial es clave (Stadler y col., 2002). A partir de la base de Schiff, la RM ocurrirá preferentemente a través del producto de Amadori dando lugar a la formación de compuestos con color y sabor, en lugar de acrilamida. Dado que el compuesto de Amadori no se descarboxila fácilmente, es decir no es un intermedio favorable, se puede concluir que la formación de acrilamida sigue otros caminos en la RM (Yaylayan y col., 2003; Stadler y col., 2004). La base de Schiff puede descarboxilarse ya sea directamente a través de la Schiff betaina o vía el intermediario oxazolidina-5-ona para generar el iluro de azometino I, que suministra el producto Amadori descarboxilado después de tautomerización (Yaylayan y col., 2003) (Figura 1.5).

En resumen, la acrilamida puede producirse por las siguientes vías: (a) directamente desde el iluro de azometino (Zyzak y col., 2003); (b) (reacciones de β -eliminación a partir de intermediarios de Maillard, por ej, producto de Amadori descarboxilado (Yaylayan et al., 2003); y (c) la pérdida de amoníaco de la 3-aminopropionamida procedente de derivado imina I del iluro de azometino. Esta última reacción se produce preferentemente bajo condiciones acuosas en ausencia de azúcares (Granvogl y col., 2004).

Además de los principales precursores de la reacción (azúcares reductores y aminoácidos) y productos intermedios, los lípidos (grasa o aceites) también pueden desempeñar un papel importante en la formación de acrilamida (Zhang y Zhang, 2007).

Figura 1.5. Mecanismo de formación de acrilamida a partir de productos de descarboxilación de amadori o dicarbonilos de asparagina (Yaylayan y col., 2003; Zyzak y col., 2003; Stadler y col., 2004; Yaylayan y Stadler, 2005).



1.1.5.2.2. Vías minoritarias

Los lípidos oxidados, la acroleína, el ácido acrílico y la 3-aminopropionamida pueden generar acrilamida en cantidades mucho más reducidas.

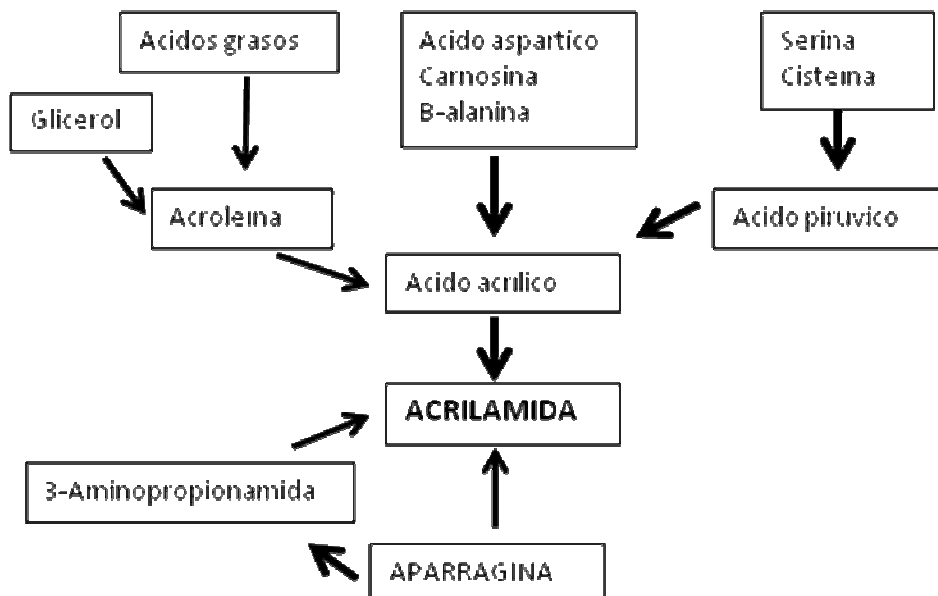
Varias rutas no dependientes de la asparagina se han publicado en los últimos años.

El ácido acrílico es estructuralmente un buen candidato, reacciona con amoniac liberado en la degradación térmica de aminoácidos o proteínas y generar acrilamida (Yaylayan y col., 2005) (Figura 1.4.). El ácido acrílico puede formarse bien por vía Maillard, similar a la acrilamida pero partiendo del ácido aspártico (Stadler y col., 2003), o acroleína, compuesto producido en la degradación térmica lipídica. (Zhang y col., 2005). Pequeñas moléculas (acetaldehído, formaldehído) producidas en el calentamiento de monosacáridos, bajo condiciones adecuadas pueden dar lugar a acroleína y posteriormente acrilamida (Vattem y Shetty, 2003). La acroleína puede reaccionar con la asparagina, aportando un grupo carbonilo (Yasuhara y col., 2003). El ácido acrílico se puede formar por la descomposición térmica del ácido aspártico, carnosina y β-alanina (Stadler y col., 2003; Yaylayan y Stadler, 2005). Se puede generar indirectamente a partir de la serina y la cisteína a través de la formación de ácido pirúvico

Una amplia gama de lípidos oxidados son capaces de degradar los aminoácidos a sus correspondientes aldehídos de Strecker (Hidalgo y col., 2005; Zamora y col., 2007). Entre ellos, el 2,4-decadienal es el que presenta un grado de reactividad mayor para convertir la asparragina en acrilamida. El mecanismo de esta reacción parece tener lugar en dos etapas principales, la descarboxilación del aminoácido asparragina (Hidalgo y col., 2010) y la posterior desaminación de la 3-aminopropionamida (Zamora y col., 2009).

Sin embargo, las vías no dependientes de la asparragina se consideran marginales ya que los estudios realizados en alimentos cuya base son la patata o los cereales han demostrado la gran importancia de la asparragina como sustrato selectivo de la asparraginasa y la efectiva reducción de la acrilamida (Lineback y col., 2012)

Figura.1.6. Rutas alternativas de formación de acrilamida (Eriksson y Karlsson, 2005)



1.1.5.3. Factores implicados en la formación y reducción de acrilamida en alimentos

En la actualidad, se dispone de una gran información sobre la formación de acrilamida en los alimentos. Diversos parámetros endógenos y exógenos influyen en su formación. Entre ellos se encuentra la temperatura y tiempo de calentamiento, pH, concentración y reactividad de los componentes presentes y contenido en agua (Rydberg y col., 2003, Blank y col., 2005; Anese y col., 2009; Halford y col., 2012a,b; Pedreschi y col., 2014). Desde el descubrimiento de la acrilamida en los alimentos estos factores han sido ampliamente estudiados. Generalmente, la acrilamida incrementa con el aumento de la temperatura y con el tiempo de calentamiento. Alcanza un máximo de formación a 190°C (Rydberg y col., 2003). La AA también depende del pH del contenido en agua. Este compuesto no se detecta en alimentos crudos ni en los hervidos. La acrilamida es una sustancia reactiva y volátil y puede reaccionar y autodegradarse después de su formación (Stadler y col., 2002). Los

factores endógenos que afectan a la formación de acrilamida, son la presencia de precursores. Estos son como ya se indicó anteriormente principalmente aminoácidos libres especialmente la asparragina y con mucha menor reactividad otros como la alanina, arginina, ácido aspártico, cisteína, metionina, glutamina, treonina y valina y azúcares reductores (mono y disacáridos); los niveles de estos compuestos depende de la genética y de factores medioambientales. Por tanto, las especies, cultivos, sistemas agronómicos, tiempo y temperatura de maduración y de almacenamiento influyen en los niveles de precursores (Zhang y Zhang, 2007; Halford y col., 2012a,b; Pedreschi y col., 2014)

Los mayores niveles de acrilamida se han encontrado en alimentos amiláceos (patatas y cereales). También se ha detectado acrilamida en café, chocolate, carnes, productos lácteos, almendras, alimentos infantiles. Los tratamientos térmicos que más afectan son, fritura, horneado, asado, grill y tostado (Tareke y col., 2002)

Cada categoría de alimentos puede mostrar una gran variabilidad en los niveles de acrilamida. Además, dicha variación se ha detectado incluso en productos del mismo lote (Roach y col., 2003; Sanny y col., 2010). Factores tales como: la variabilidad de los precursores de acrilamida en la materia prima, la diferencia en la composición de alimentos, las diferencias en los parámetros del proceso y las condiciones de cocción finales podrían ser fuente de fluctuaciones.

Además, las concentraciones de acrilamida en los alimentos son el resultado de la formación de acrilamida y de la simultánea eliminación (Claeys y col., 2005a,b; Gökmen y Senyuva, 2006). Esta gran variabilidad de los niveles de acrilamida en los alimentos se convierte en importante cuando se considera la exposición alimentaria a la acrilamida y, además, cuando se evalúa posibles estrategias de mitigación, que se discutirán a continuación junto con los factores de formación.

1.1.5.3.1. Patatas

Las patatas son susceptibles de formación de acrilamida por la presencia en este producto de precursores como la asparragina y los azúcares reductores y, por las condiciones tradiciones de cocinado (temperaturas > a 120°C), tales como la fritura, tostado y horneado; procesos que favorecen la reacción de Maillard.

Los factores más relevantes que determinan la cinética de formación de acrilamida y su posterior degradación son:

- A. Composición de la patata: la concentración de precursores para la formación de acrilamida en la patata depende de la variedad, de las condiciones del suelo, periodo de cosecha y de las condiciones de almacenamiento poscosecha (Low y col., 2006).
- B. Variables del procesado: las variables fundamentales son la temperatura del aceite, o del horno, el tiempo de fritura u horneado y ciertas propiedades de la patata como pH, actividad del agua, capilaridad y porosidad (Surdyk y col., 2004; Gertz y col., 2003)

Variedad de patata

La composición de la patata varía ampliamente dependiendo de las variedades. La tabla 1.4 recoge los márgenes de valores entre los que oscila la composición de las diferentes variedades (Torres y Parreño, 2009).

Tabla 1.4. Rango de composición de los macronutrientes de la patata (g/100g)

Agua	Ext. seco	Carbohidratos	Proteínas	Lípidos	Fibra	Cenizas
63-87	13-37	13-30	0,7-4,6	0,02-0,96	0,2-3,5	0,4-2

Los estudios realizados con sistemas modelo de azúcares reductores y aminoácidos, demuestran que la cantidad de acrilamida aumenta considerablemente cuando la asparragina se calienta en presencia de glucosa o fructosa (Weisshaar y Gutsche, 2002). Las investigaciones llevadas a cabo hasta la fecha muestran claramente que el aminoácido asparragina es el principal responsable de la formación de acrilamida (Becalski y col., 2003). Los niveles de asparragina en las patatas son similares en las distintas variedades, mientras que los de glucosa y fructosa varían en un amplio rango. Un estudio sobre los precursores de acrilamida en patatas producidas en Italia y Estados Unidos demostró que no existe correlación entre niveles crecientes de asparragina y azúcares reductores en las diferentes variedades (Vivanti y col., 2006). Así mismo, Amrein y col. (2003) también encontraron según variedad y formas de cultivo, que las cantidades de asparragina libre eran siempre mayores que las de azúcares y que no existe correlación entre ellas. En ello, también coinciden estudios más recientes realizados en variedades de patatas irlandesas (Brunton y col., 2007). Por tanto, si los niveles de asparragina son similares en las distintas variedades, la formación de acrilamida va a depender mayoritariamente de las cantidades de azúcares reductores. Becalski y col. (2004), midieron la cantidad de azúcares reductores y aminoácidos libres en patatas crudas y hallaron correlación con los niveles de acrilamida producidos tras la fritura. Además de la asparragina y azúcares reductores (principales precursores de la acrilamida), la patata también contiene otras moléculas de estructura amida, que podrían reaccionar dando lugar a la aparición de este carcinógeno como son la acroleína o la 3-aminopropionamida (3-APA). Esta última, aunque no es muy abundante en la patata, si se ha considerado como un potente precursor en la formación de acrilamida. Se ha observado que la 3-APA se forma a partir de la asparragina por degradación térmica mediante decarboxilasas presentes en el producto fresco; la acrilamida aparece entonces por desaminación no siendo necesaria la presencia de azúcares reductores (Granvogl y col., 2004). La formación de acrilamida a partir de 3-APA es cinco veces mayor que a partir de asparragina. Sin embargo, estos autores también afirman que aún no hay una evidencia concreta de la presencia de 3-APA en los alimentos. Estudios más recientes confirman que la formación de este precursor en las patatas y su aparición va a depender de las condiciones y tiempo de almacenamiento así como de las condiciones de crecimiento de los tubérculos (Bagdonaite y col., 2006).

La calidad de las patatas fritas tipo frances depende entre otros aspectos de la variedad. Las variedades que producen tubérculos grandes, largos y ovals y que

contienen moderadamente alto contenido en materia seca y bajo en azúcares reductores son las más adecuadas. Respecto a la producción de patatas chips, las variedades con más bajo contenido en azúcares reductores y, mas alto en materia seca y moderado tamaño de tubérculos ovales, son preferibles (Torres y Parreño, 2009). De Wilde y col., (2006) demostraron una correlación alta ($R^2 = 0,82$, $n = 96$), entre niveles de acrilamida y contenido en azúcares reductores de patatas fritas procedentes de 16 variedades. Esta correlación ha sido también demostrada en otros estudios mientras que la sacarosa (azúcar no reductor) y la asparragina no mostraron correlación (Amrein y col., 2003; Medeiros Vinci y col., 2010) entre otros.

Propiedades del suelo y fertilización

El *tipo de suelo* puede influir en la gravedad específica de los tubérculos debido a su capacidad de retener agua, drenaje, aireación, estructura, temperatura y fertilidad. (Torres y Parreño, 2009). Sin embargo, mínimas diferencias en la formación de acrilamida fueron detectadas en 16 variedades de patatas cultivadas en suelo arenoso respecto al arcilloso (De Wilde y col., 2006). La localización de los cultivos tiene influencia en la composición mineral de los tubérculos y el contenido en azúcares reductores fue negativamente correlacionado con el contenido en calcio y potasio y positivamente con el zinc y cobre (Whittaker y col., 2010).

La *fertilización*, es un factor estudiado en la formación de acrilamida. La patata es un cultivo que presenta altos requerimientos nutricionales. Sin embargo, actualmente los niveles de nitrógeno aplicados durante la fertilización deben disminuirse por motivos medioambientales. Por ello, De Wilde y col. (2006) estudian cómo podría afectar esta disminución y encuentran una reducción significativa en el contenido de aminoácidos libres entre los que se encuentra asparragina, mientras que otros componentes nitrogenados no se ven afectados. La fertilización con nitrógeno afecta a las concentraciones de azúcares reductores. Un descenso en la fertilización incrementa la formación de azúcares reductores y por tanto de acrilamida (De Wilde y col., 2006). Fertilizaciones moderadas con nitrógeno combinadas con un aporte de potasio puede dar lugar a bajos niveles de asparragina y de azúcares reductores en los tubérculos. La combinación de alto aporte de fósforo y bajo de potasio incrementan el contenido de asparragina y azúcares reductores (Gerendas y col., 2007). La composición del suelo y la fertilización influye en el desarrollo de los tubérculos y puede tener un impacto en la concentración de los precursores de acrilamida.

En cuanto a la producción de acrilamida se puede concluir que las patatas fritas que crecieron con fertilizantes bajos en nitrógeno presentaban menor contenido en acrilamida. Sin embargo, las cantidades de nitrógeno en los fertilizantes sólo afectan a la acrilamida hasta un cierto nivel, a partir del cual una mayor reducción de nitrógeno no implica un menor contenido en acrilamida; incluso puede aumentar cuando los niveles de fertilización son muy bajos o nulos.

También se ha realizado estudios con otros elementos como el azufre. Se ha comprobado que patatas que han crecido en condiciones severas de falta de azufre dan lugar a patatas fritas con un menor contenido en acrilamida respecto a las que crecieron con azufre, aunque los tubérculos presentaran altos niveles de azúcares reductores (Elmore y col., 2007).

Condiciones climatológicas y madurez de los tubérculos

Las condiciones climatológicas durante el desarrollo del tubérculo y cerca de la madurez pueden afectar a la susceptibilidad de las patatas a la formación de acrilamida. De Meulenaer y col. (2008) encontraron que las condiciones climatológicas afectan a los contenidos de azúcares reductores, materia seca, aminoácidos libres y asparragina de los tubérculos. Veranos excepcionalmente calurosos dan lugar a contenidos más bajos en azúcares reductores. Durante la madurez del tubérculo, los nutrientes son transportados desde las hojas al tubérculo, y durante la senescencia y antes de la cosecha, normalmente se produce un descenso de azúcares, indicativo de que se ha alcanzado la madurez química lo que sugiere una mayor probabilidad de mantener una calidad máxima durante el almacenamiento (Torres y Parreño, 2009).

Condiciones de almacenamiento

Los tubérculos se almacenan hasta varios meses con el fin de mantener el abastecimiento de patatas a lo largo del año. Durante este periodo, ciertas condiciones de almacenamiento pueden dar lugar a patatas con cantidades inaceptables de azúcares, a pesar de los niveles adecuados en la cosecha.

Las proporciones de sacarosa, glucosa, fructosa y almidón varían con los tratamientos posrecolección. Estos compuestos intervienen en el denominado endulzamiento por frío que se genera por reacciones de hidrólisis y epimerización (inversión) de almidón y azúcares. Por encima de los 10°, los azúcares y el almidón se mantienen en equilibrio, transformándose los azúcares libres en almidón o usándose estos en otras reacciones. Por debajo de 10°C, los azúcares reductores comienzan a acumularse. Las condiciones de almacenamiento afectan considerablemente al contenido de azúcares reductores. Diferentes estudios (Haase y col., 2004; De Wilde y col., 2005) han mostrado que las patatas almacenadas a 4°C y 8°C durante 24 semanas varían en su contenido en azúcares reductores. A 8°C no se detectaron cambios significativos mientras que a 4°C los niveles de glucosa y fructosa aumentaron significativamente durante las 8 primeras semanas, a partir de las cuales las variaciones eran mucho menores. Estudios recientes han mostrado una buena correlación entre el contenido en azúcares reductores y acrilamida cuando la ratio fructosa/asparragina es inferior a 2. Cuando la ratio es superior a 2 el factor limitante pasa a ser la asparragina (Matsuura-Endo y col., 2006). No obstante, los estudios llevados a cabo muestran diferentes susceptibilidades a los cambios de composición de las patatas de acuerdo con los diferentes lugares de cultivo y la existencia de variedades con mayor tendencia a incrementar los azúcares durante el almacenamiento. Por otro lado, hay que considerar que si bien, las patatas almacenadas a bajas temperaturas acumulan azúcares, el almacenamiento a temperaturas superiores puede favorecer la germinación del tubérculo. Una solución alternativa para evitar la germinación de los tubérculos es conseguir tubérculos menos susceptibles a las enfermedades, o aplicar temperaturas de almacenamiento inferior a 8°C (Blenkinsop y col., 2002). Sin embargo, esta alternativa tiene mayor impacto en la acumulación de azúcares reductores y posteriormente en la formación de acrilamida en las patatas fritas. El "sweetening" o endulzamiento, producido por el frío es presumiblemente un mecanismo de defensa de los tubérculos para protegerse de las heladas movilizándolo los azúcares a partir del almidón a temperaturas inferiores a 8°C

Otros autores sin embargo Ohara-Takada y col. (2005) consideran que las bajas temperaturas son más aconsejables en el almacenamiento de las patatas, ya que así se inhibe la germinación. Por tanto, la temperatura idónea de almacenamiento se sitúa entre 8-12°C (Noti y col., 2003); de esta forma se evita la acumulación de azúcares que dan lugar al endulzamiento y a un color indeseable en la patata frita.

El contenido en proteínas, aminoácidos libres y asparragina parecen no ser susceptibles a diferentes temperaturas y largo tiempo de almacenamiento (De Wilde y col., 2005).

También se estudiaron los cambios en el contenido de aminoácidos durante el almacenamiento a diferentes temperaturas (3°C y 10°C) (Olsson y col., 2004). Para los aminoácidos, asparragina y glutamina, la temperatura no es un factor que afecte a los cambios de concentración en la patata. Sin embargo, a 3°C durante 8 meses aumento la glucosa 4 veces y 5 veces la fructosa, mientras que a 10°C sólo se detectaron pequeñas variaciones en las concentraciones. Estos autores también opinan que el almacenamiento a 8-10°C junto con la aplicación de inhibidores de la germinación podría constituir un modo muy efectivo para reducir los niveles de acrilamida en patatas fritas.

El incremento de azúcares reductores también se ha observado en patatas prefabricadas (patatas preparadas para freír) almacenadas a temperaturas próximas a 4°C. Esto se evita al almacenarlas a temperaturas de congelación (Fiselier y Grob, 2005).

El contenido de azúcares reductores va a depender también de la especificación genética de cada tubérculo en particular, junto con las condiciones medioambientales, prácticas de cultivo y otros factores posrecolección (el almacenamiento entre otros). Este contenido es muy diferente para cada variedad (Medeiros Vinci y col., 2012).

Control de calidad de las patatas nuevas

Los azúcares reductores son un parámetro importante en el control de calidad de patatas crudas no solo por su influencia en la formación de acrilamida sino por el color alcanzado tras el procesado (Amrein y col., 2004a; De Wilde y col., 2005).

Los criterios actuales para aceptar los lotes de patatas que van a ser procesadas comprenden, la clasificación por tamaños (los tubérculos mas pequeños acumulan mayor cantidad de azúcares reductores), determinación de materia seca y evaluación del color con un USDA/carta de color Munsell (después de una prueba típica de fritura corta a 180°C/3min (EUPPA, 2007).

Un control de calidad efectivo de la patata cruda permitiría identificar lotes de patatas con mas susceptibilidad a la formación de acrilamida y evitar la formación de acrilamida en el inicio del proceso de producción (Medeiros Vinci y col., 2010).

La determinación de color y la determinación de azúcares reductores en la materia prima permiten una mejor identificación de las patatas propensas a la formación de acrilamida en comparación con el sistema de control actual. Potencialmente, esto permite a la industria implementar medidas preventivas con el

fin de minimizar el riesgo de acrilamida en sus productos. Desde el punto de vista de la implementación, la medición del color con un analizador Agtron como un predictor de acrilamida en materia prima es, probablemente, más práctico que la determinación de azúcares reductores. Por otra parte, el color es una de las especificaciones de calidad más importantes exigida por los clientes (Medeiros Vinci y col., 2010).

Factores que afectan a la formación de acrilamida en el proceso de fritura

Las variables del procesado que fundamentalmente afectan a la formación de acrilamida son: la temperatura del aceite, el tiempo de fritura u horneado y ciertas propiedades de la patata como pH, actividad del agua, capilaridad y porosidad (Surdyk y col., 2004; Gertz y col., 2003)

Tipo de aceite. El tipo de aceite y su estado de oxidación e hidrólisis (mono y diglicéridos), no influyen significativamente en el contenido final de acrilamida. Sin embargo, debido a la hidrólisis del aceite, elevados contenidos de glicéridos parciales de carácter anfifílico, pueden modificar la tensión superficial entre el agua de la superficie del alimento y el aceite no polar, modificando la transferencia de calor del aceite al alimento en un periodo de tiempo fijo (Gertz, 2004; Gertz y Klostermann, 2002; Gertz y col., 2003). El contenido en acrilamida incremento 10 en patatas chips fritas a 150°C en aceite usado en relación al mismo producto frito en aceite crudo a la misma temperatura (Dunovska y col., 2004).

Temperatura y tiempo. La T^a y el tiempo son los factores que mas afectan a la cantidad de acrilamida en las patatas (Pedreschi y col., 2005); si bien la cantidad final depende del contenido en precursores (asparragina y azúcares reductores) (Olsson y col., 2004; Williams, 2005). El limite de temperatura para la formación de acrilamida es de 120°C (Mottran y col., 2002; Stadler y col., 2002). La resistencia de la matriz a la transferencia por calor variara dependiendo del grosor de la patata de ahí las diferencias entre patatas tipo francés y patatas chips. Cuando la temperatura del aceite es alta, la deshidratación es más rápida y, por tanto la T^a elevada y la baja humedad favorecen la formación de acrilamida (Gökmen y col., 2006). El pardeamiento de la patata tipo francés empieza cuando disminuye el contenido interno de agua y se incrementa la temperatura de fritura en la superficie; en este caso el tiempo es un factor determinante para controlar la formación (Ishihara y col., 2006). A temperaturas por encima de 150°C la formación de acrilamida aumenta significativamente (Dunovska y col., 2004), otros autores establecen la temperatura alrededor de 175°C (Gertz y col., 2002; Yasuhara y col., 2003). Haase y col. (2003) encontraron la reducción de la T^a de 185°C a 165°C, reducía a la mitad el contenido en acrilamida. El almacenamiento de las patatas chips en congelación con nitrógeno líquido da lugar a una reducción de la acrilamida por eliminación del calor remanente después de la fritura, comparado con las patatas almacenadas a temperatura ambiente (Ishihara y col., 2006)

Pretratamientos de cortado, lavado, escaldado, inmersión y acidificación

La combinación de ciertos pretratamientos con distintas temperaturas de fritura, han permitido reducir el contenido de acrilamida en patatas chips

Cortado. La acrilamida se forma en la capa superficial de la patata y por lo tanto, el tamaño y la forma de cortado del producto (ratio superficie/volumen) influirá en el contenido final de acrilamida. A mayor superficie, mayor formación en el proceso de fritura, horneado o tostado (Matthäus y col., 2004). Además, dado que la región periférica de los tubérculos tiene mayor contenido en azúcares reductores, estos finos cortes de la esfera exterior tienden a sobrecalentarse al freírse. Por lo tanto, la eliminación de estas partes puede contribuir a una reducción de acrilamida.

Lavado. Las rodajas de patatas cortadas se adhieren por la presencia de almidón en la superficie, se requiere por tanto el lavado para eliminar el almidón. El lavado puede realizarse con agua fría o caliente

El lavado de las patatas supone una reducción de los azúcares reductores. Ishihara y col. (2006), realizaron estudios de remojo a 20°C, 40°C, 60°C y 80°C. Los azúcares reductores descendieron a 60°C y 80°C aunque no a 40°C. Los autores sugieren que a 40°C pudo actuar la invertasa nativa de la patata.

Remojo en agua caliente (blanqueado). El remojo de las patatas en agua previo al proceso de elaboración produce una reducción de los precursores y por tanto de acrilamida. Con agua fría se eliminan el 10% de los azúcares y de la asparragina liberados por la ruptura celular en el troceado.

El blanqueo es una operación importante en el proceso industrial de la producción de patatas fritas y su complejidad puede diferir entre líneas de producción. Durante este paso las enzimas se inactivan y se forma una capa de almidón gelatinizado, que limita la absorción de aceite y mejora la textura (Moreira y col., 1999). Además, el escaldado también contribuye a dar un color uniforme a la patata frita. Por tanto, el objetivo del escaldado es mejorar el color final de las patatas chips.

A 80°C se llega a extraer más de la mitad de los precursores en apenas 2 minutos y en agua hirviendo la extracción aumenta hasta un 63% (Tabla 1.5.) (Grob y col., 2003). Las patatas remojadas en agua a 80°C durante 2 minutos reducen la acrilamida pero se obtiene un producto poco crujiente, pálido y de sabor inaceptable. Al contrario ocurre con las que fueron remojadas en agua a otras temperaturas, las patatas mostraron una calidad óptima, crujientes, de buen sabor e incluso con menor pardeamiento que las patatas sin remojo. El contenido en acrilamida de estas patatas se reduce a la mitad; lo que lleva a concluir que el remojo en agua a 60°C reduce el contenido de acrilamida de un modo más eficiente. Para otros autores sin embargo los niveles de acrilamida en patatas fritas son menores en las que han sido remojadas a mayor temperatura y durante más tiempo (Ishihara y col., 2006), pero pueden plantear el problema de baja calidad sensorial.

Otro estudio realizado a diferentes Tª de remojo y fritura mostró que el remojo con agua caliente redujo el contenido de glucosa y asparragina en un 76 y 68% respectivamente y el remojo a 50°C/70 min redujo sorprendentemente el contenido en acrilamida a 27 µg/kg incluso tras fritura a 190°C (Pedreschi y col., 2009).

Todos los tratamientos de remojo en agua caliente disminuyeron la cantidad de precursores de acrilamida en las patatas crudas. Ambos, glucosa y asparragina, disminuyen drásticamente al aumentar la temperatura y el tiempo de remojo. Otros

autores que además incorporan ácido cítrico y glicina en el remojo obtienen resultados positivos en la reducción de acrilamida obteniendo un mejor efecto cuando utilizan una combinación de ambos reactivos (Low y col., 2006).

Tabla 1.5. Porcentaje de eliminación de precursores de acrilamida en el tratamiento con agua

	% de extracción		
	Asparragina	Fructosa	Glucosa
30 min agua fría	10	12	6
15 min agua 60º	14	14	8
2 min agua 80º	53	54	51
2 min agua hirviendo	63	61	61

La inmersión de las rodajas de patata contribuye además de a la reducción de azúcares reductores a la de asparragina. La reducción de los precursores de acrilamida aumentan con la temperatura y tiempo de remojo, pero este pretratamiento conlleva el riesgo de alterar la calidad sensorial del producto final (Masson y col., 2007). La inmersión de patatas a 70°C durante 8 minutos y posterior fritura a 150°C, 170°C y 190°C, redujo el contenido de acrilamida (Pedreschi y col., 2004).

Remojo en disoluciones acidificadas. La industria de procesamiento de patatas fritas utiliza frecuentemente dos sustancias: pirofosfato ácido de sodio (E-450) y glucosa. El pirofosfato se añade (a nivel de pH≈4,7) para reducir el oscurecimiento de los cortes de patata blanqueada (causada por la formación del complejo ácido ferri-diclorogenico durante el cocinado y exposición al aire), mientras la glucosa contribuye a estandarizar y dar uniformidad al color del producto final, de acuerdo con las demandas del cliente. Los tratamientos de inmersión en disoluciones de glucosa de la patata puede afectar a la formación de acrilamida. Estados Unidos ha permitido el uso de colorantes (caramelo y achiote) en lugar de la glucosa para prevenir la formación de acrilamida en un nivel del hasta un 86% y el 93% con caramelo y achiote respectivamente (Patentes US, 2005; US 2010; citado por Mereiros-Vinci y col., 2012). En Europa estos aditivos están restringidos para este uso.

Los ácidos orgánicos reducen la formación de acrilamida debido a la protonación de los grupos amino de la asparragina a bajo pH, lo cual bloquea la adicción nucleofílica de la asparragina con un compuesto carbonilo, previniendo la formación de la correspondiente base de Schiff.

El escaldado con remojo en disoluciones de ácido cítrico redujeron considerablemente el contenido de acrilamida (Masson, 2005). (Tabla 1.6)

Tabla 1.6. Porcentaje de reducción de acrilamida de patatas chips remojadas y fritas a 120°C

Condiciones de remojo	% de reducción de acrilamida
Escaldado en agua destilada a 90°C/1 minuto con agitación	26,8
Inmersión en ácido cítrico 1% p/p durante 1 hora. Agitación ocasional	61,5
Escaldado en agua destilada a 90°C durante 1 minuto, seguido de inmersión en ácido cítrico 1% p/p por 1 hora	71,4

Jung y col. (2003) mostraron también la efectividad del ácido cítrico antes de la fritura para reducir la formación de acrilamida, aproximadamente un 73% en patatas tipo francés cuando se fríen 6 minutos a 190°C a presión atmosférica. Sin embargo se percibió un ligero sabor amargo y una textura mas dura con disoluciones del 2%. La concentración del 1% de ácido cítrico es el límite máximo para ser aplicado como pretratamiento.

El pH de las patatas puede jugar un papel importante en la formación de acrilamida. Los estudios de Rydberg y col. (2003) demostraron, que una reducción del pH de las patatas de 5,7 a 2,9 produce un descenso de la acrilamida del 70% y que la adición de ácido cítrico producía un descenso por encima del 50%, pero este dependía de la concentración. El ensayo con otros ácidos como fosfórico, fumárico y tartárico también redujo los niveles con porcentajes del 25%, 28% y 29% respectivamente. Otros acidulantes correspondientes al grupo de aditivos conservadores (ácido benzoico, propiónico y sórbico), también indujeron una reducción de la acrilamida (Pedreschi y col., 2007; Gama-Baumgartner y col., 2004). El pirofosfato ácido de sodio, ácido cítrico, acético y láctico no sólo reducen el contenido final de acrilamida, sino que también disminuyen la absorción de aceite en la patata frita. Pero hay que tener en cuenta que los aditivos utilizados y su concentración pueden generar productos de sabores extraños o colores no deseados (Mestdagh y col., 2008).

El ácido cítrico, tiene como efecto la disminución de la formación de compuestos característicos de la reacción de Maillard, los aldehídos procedentes de la degradación de Strecker, metilpropanal y 2 y 3-metilbutanal, y de las alquilpirazinas, 2-etil-3,5-dimetilpirazina, 2-etil-3,6-dimetilpirazina y 2,3-dietil-5-metilpirazina, lo cual afecta al desarrollo de aromas y sabores (Wagner y Grosch, 1998).

A escala industrial, las patatas se lavan, se escaldan y algunas veces se les añade ácido cítrico para mejorar la estabilidad del color. Por lo tanto, la aplicación de ácido cítrico para reducir el contenido de acrilamida no implica un paso adicional en el proceso de elaboración de este producto (Masson y col., 2007).

Secado. El secado de la patata cortada remojada o blanqueada previo a la fritura, reduce la absorción y la hidrólisis del aceite y la formación de la acrilamida en

patatas fritas debido a la reducción del tiempo de fritura (Franke y col., 2005; Gökmen y col., 2006).

Utilización de presiones reducidas en la fritura. Esta técnica es una alternativa para elaborar patatas chips con bajo contenido graso. El efecto de la temperatura sobre la formación de acrilamida es menos dramático para fritura a presión reducida si bien las temperaturas aplicadas en las experiencias realizadas son bajas (118°C, 125°C, 140°C) (Granda y col., 2004). La aplicación de presión reducida en la fritura de patatas chips comparada con la atmosférica produce una menor absorción de grasa en el producto final, y las patatas se encogen más y son más ligeras y suaves (Garayo y Moreira, 2002). La utilización de presión reducida y Tª de 118°C da lugar a patatas con una reducción de acrilamida del 94% y unas características sensoriales, textura y color deseables (Masson y col., 2007). En la práctica este proceso solo puede utilizarse para la producción de patatas chips.

Otros compuestos que pueden reducir la formación de acrilamida. La adición de *cationes mono y divalentes (ej. Na⁺ y Ca²⁺)*, fue muy eficiente en la reducción de acrilamida. Se considera que estos iones podrían interaccionar con la asparragina, evitando la formación de la base de Schiff (Gökmen y Senyuva, 2007a). Estos estudios demuestran que un incremento de la acidez por debajo del pH 6 puede ser utilizada para reducir la formación de acrilamida en patatas. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que el descenso del pH puede producir la hidrólisis de sacarosa a glucosa y fructosa y favorecer la formación de acrilamida y puede afectar al sabor de la patatas y por tanto a la calidad del producto (Mestdagh y col., 2008). El NaCl también se ha propuesto para acelerar la eliminación de acrilamida vía polimerización, en un sistema modelo (Kolek y col., 2006).

La adición de *aminoácidos libres* como la glicina, cisteína y lisina también reducen la formación de acrilamida, al promover reacciones competitivas y/o enlazarse covalentemente a la acrilamida formada a través de reacciones de adición tipo Michael (Anese y col., 2009; Low y col., 2006; De Wilde y col., 2005), dando lugar a la formación de aductos (Friedman, 2003). Por tanto, la presencia de otros aminoácidos libres distintos a la asparragina puede tener un efecto en la cinética de formación y/o eliminación de la acrilamida (Claeys y col., 2005a,b).

La incorporación de glutamina, alanina ác. aminobutírico, lisina, glicina redujo los niveles de acrilamida en un 50-90% y la incorporación de fructosa o glucosa a baja y alta concentración incremento la formación especialmente cuando aumentaba la concentración de fructosa (Rydberg y col., 2003).

Los hidrocoloides, *agentes de recubrimiento*, son muy eficientes para reducir la captación de grasa en patatas y otros aperitivos fritos (García y col., 2004; Kowalczyk y Gustaw, 2009). Tratamientos de recubrimiento con ácido algínico y pectinas reducen la formación de acrilamida; mientras que los tratamientos con goma de algarroba, carragenatos, hidroxipropil dialmidón fosfato, y goma xantana favorece la formación de acrilamida (Zeng y col., 2010).

El efecto protector de los *antioxidantes* frente a la formación de acrilamida se debe a la capacidad para inhibir la formación de productos de oxidación lipídica que

intervienen en la formación de acrilamida. Los antioxidantes influyen en la reacción de Maillard y por tanto afectan positiva o negativamente a la formación de acrilamida (Medeiros Vinci y col., 2012). La aplicación en patatas cortadas, de extracto de hojas bambú y extracto fenólico de orégano redujo la formación de acrilamida. Kotsiou y col. (2010) indican que los compuestos fenólicos sin grupos aldehído en su estructura son más efectivos en la reducción de acrilamida. Otros estudios sin embargo mostraron resultados contradictorios (Bassama y col., 2010; Becalski y col., 2010).

La *asparraginas*, enzima que hidroliza la asparragina liberando ácido aspártico y amoníaco, puede reducir la formación de acrilamida en alimentos por reducción del precursor (Medeiros Vinci., 2012). La incorporación de asparraginas es más efectivo cuando se aplica a masas. En patatas solidas su aplicación no facilita el contacto óptimo requerido (Hendriksen y col., 2009); por esta razón el paso previo de remojo permite la aplicación de la enzima (Pedreschi y col., 2008).

Estudios de *fermentación ácido láctica* con *Lactobacillus plantarum* mostraron una reducción de acrilamida en productos de patata fritos; la glucosa se reduce por fermentación y disminuye el pH (Baardseth y col., 2006).

1.1.5.3.2. Cereales y derivados

Los ingredientes básicos de los productos de panadería son: harina, agua, sal y levadura o agentes gasificantes. Otros ingredientes como la grasa o aceites, azúcares, huevos, productos lácteos, miel, frutas, frutos secos, especias y chocolate estarán presentes o no dependiendo de la formulación y del tipo de producto. Los estudios sobre acrilamida en derivados de cereales se han realizado en panes, galletas, crackers, obleas, biscotes, cereales de desayuno, cereales infantiles, pan tostado, tartas, pasteles, muesli y gachas. Los cereales y derivados contribuyen en un 32-45% al consumo de acrilamida en la dieta de algunos países europeos.

Efecto de los precursores

Asparragina. Los niveles de asparragina varían dependiendo de la variedad y del tipo de cereal. El centeno es el cereal que mayor cantidad de asparragina contiene, unas cuatro veces mas que el trigo (centeno: 63,4 mg/100g; trigo: 17,4mg/100g). El arroz posee valores inferiores (<10 mg/100g) y el maíz y la avena intermedios (15 mg/100g) (Seal y col., 2008). La distribución de asparragina en los granos no es homogénea, mayor contenido se encuentra en el salvado respecto al endospermo (Claus y col., 2006b).

La asparragina es el factor limitante en la formación de acrilamida en los cereales ya que la concentración de azúcares reductores, dependiendo de la variedad, puede ser de 10 a 50 veces mayor que la de asparragina (Konings y col., 2007). Los estudios realizados en pan de trigo y pan de jengibre, confirmaron este hecho (Surdyk y col., 2004; Amrein y col. 2004a) y la incorporación de asparragina libre a la harina, incremento considerablemente el contenido de acrilamida en panes mientras que la fructosa añadida no modifico el contenido. Hamlet y col. (2008) encontraron una correlación entre los niveles de asparragina y los contenidos de glucosa y fructosa en

galletas y en harinas de centeno y, consideraron que la selección de las materias primas (harinas) en base a la determinación de azúcares reductores podría ser útil para reducir los contenidos en acrilamida en galletas y panes sin azúcares añadidos.

Las estrategias más comunes para reducir el contenido de acrilamida se han centrado en la reducción o la dilución de los precursores, añadiendo asparraginas, levadura u otro microorganismo (Fredriksson y col., 2004); añadiendo otros aminoácidos (Brathen y col., 2005; Claeys y col., 2005); o incorporando un agente acomplejante que se una a la asparragina, por ejemplo metales divalentes (Gökmen y Senyuva 2007b; Lindsay y Jang 2005); o bien, eliminando sustancias acelerantes de la reacción como sales de amonio (Amrein y col., 2004b, 2006; Biedermann y Grob 2003).

Efecto de la formulación

Adición de ácidos. La incorporación de ácidos es un método muy simple y muy eficaz para reducir el contenido de acrilamida en los productos de panadería

La incorporación de ácido cítrico a snacks elaborados con maíz redujo el contenido en acrilamida (Jung y col., 2003). Efectos similares se encontraron al incorporar a galletas semiacabadas otros ácidos como: láctico, tartárico, cítrico, ácido clorhídrico (Graf y col., 2006; Levine y Smith 2005; Taeymans y col., 2004). La incorporación de ácidos supone no solo una reducción de la formación de acrilamida sino un aumento de la degradación de la acrilamida formada. Valores bajos de pH en cereales dan lugar a una reacción de Maillard moderada.

Actividad de agua. La reacción de Maillard depende de la actividad de agua del alimento. La acrilamida comienza a formarse a actividades de agua por debajo de 0,8 y hasta 0,4; una reducción mayor, tiende a disminuir la cantidad de acrilamida (Stadler y col., 2002).

Lípidos oxidados. Los lípidos tratados térmicamente producen acroleína (Umano y Shibamoto 1987). La acroleína por oxidación puede generar ácido acrílico o por formación de un compuesto intermediario el radical acrílico. Ambos pueden dar lugar a acrilamida en presencia de una fuente de nitrógeno. Los estudios llevados a cabo en galletas demostraron que los lípidos oxidados pueden ser un factor importante en la formación de acrilamida en alimentos con muy bajo contenido en agua y ricos en grasas y que la cantidad y tipo de compuestos antioxidantes del aceite afectan a la cantidades de acrilamida del producto horneado (Arribas-Lorenzo y col., 2009). Estos resultados también fueron observados por Capuano y col. (2010) en formulaciones con tres tipos de aceites y con diferentes niveles de oxidación; la catequina redujo la formación de acrilamida en un sistema con aceites no tratados térmicamente o parcialmente oxidados, mientras que el descenso no fue significativo cuando los aceites utilizados estaban fuertemente oxidados. El tipo de aceite (girasol o palma) influye en la formación de acrilamida (Capuano y col., 2010).

Adición de cationes. Los cationes monovalentes, di, tri y polivalentes pueden reducir la formación de acrilamida, especialmente el Na^+ y el Ca^{2+} en trigo (Sadd y col., 2008). La incorporación de cationes divalentes (Ca^{2+} o Mg^{2+}) a la masa antes de la cocción provocó una reducción del 20% en el contenido de acrilamida de los productos (Elder y col., 2004). La causa de esta reducción es el descenso del pH

(Vadlamani y Seib 1999). La incorporación de 1% CaCl_2 a una masa de harina, sal y agua para la elaboración de pan y de galleta tipo cracker redujo un 35% y 60% respectivamente el contenido de acrilamida de la masa horneada. Y, la adición de un 2% CaCl_2 a una masa de galletas dulces y con saborizantes produjo una reducción del 60%.

Adición de antioxidantes. Los últimos años se han realizado diversos estudios sobre el efecto de los antioxidantes en la reducción del contenido en acrilamida (Keramat y col., 2011). Los flavonoides del té verde han mostrado un efecto reductor en el progreso de la reacción de Maillard debido a la capacidad de estos compuestos de atrapar los grupos carbonilo. Zhang y Zhang (2007), demostraron que la adición de hojas de bambú y extracto de té verde a barritas fritas de pan reducía considerablemente el contenido en acrilamida. La aplicación de romero (conocida especie con propiedades antioxidantes) a la masa de pan de trigo también descendió los niveles de acrilamida (Hedegaard y col., 2008). La formulación de galletas tipo cracker con harina de trigo, agua y bisulfito sódico incremento la pérdida de acrilamida (Levine y Smith, 2005), y Casado y col. (2010) sugirió que el bisulfito sódico (antioxidante conservador) puede inhibir la formación de intermediarios que inducen la formación de acrilamida y de esta forma reducir la acrilamida sin afectación de la calidad sensorial del producto. Summa y col. (2006), establecieron una correlación directa entre contenido en acrilamida y actividad antioxidante de un sistema modelo de galletas.

Efecto de las condiciones de procesado

Condiciones de horneado. La reducción de la acrilamida en panes ha sido objeto de una gran investigación. El factor clave de la calidad sensorial del pan es el color de la corteza, y desafortunadamente existe una fuerte correlación entre la intensidad del color de la corteza y la formación de acrilamida, especialmente cuando el pan se hornea a más de 200°C (Ahrné y col., 2007). Los factores que más influyen en la formación son la temperatura y la humedad del aire durante el horneado. La acrilamida puede reducirse durante el horneado un 50% si se optimizan las condiciones respecto al horneado tradicional. La formación de la corteza comienza cuando la temperatura de la superficie del pan supera los 100°C; la deshidratación acompaña al proceso de formación de la corteza. Por tanto, la temperatura exacta y el contenido en humedad de la corteza son dos factores fundamentales en la formación de acrilamida (Ahrné y col., 2007). El horneado a 260°C durante más de 20 minutos produce especialmente en la capa exterior de la corteza una degradación de acrilamida y una reducción de un 25-75% en la capa interior para horneados de 200-230°C (Ahrné y col., 2007). La T^a más baja de la corteza a la cual solamente trazas de acrilamida fueron detectadas es de 150°C y la formación presumiblemente comenzó a 120-130°C; consecuentemente la miga no posee acrilamida. La aplicación de vapor de agua durante el horneado influye sobre el contenido en agua, color y formación de acrilamida con un descenso del 50% de acrilamida al aplicar vapor de agua en el horneado. Es posible que el uso de vapor durante el horneado permita reducir de forma apreciable los niveles de acrilamida manteniendo coloraciones similares a las alcanzadas con el horneado tradicional. Brathen y Knutsen (2005) encontraron que la

proporción de corteza respecto al pan completo, su grosor y su color se corresponden con la cantidad de acrilamida formada.

En resumen, bajos contenidos de acrilamida (20µg/kg de corteza seca) se detectan con bajo tiempo y temperatura de horneado (15 minutos y 150°C) y los valores más elevados (1800 µg/kg de corteza seca) se observan cuando el pan se hornea a 290°C/25 min (Tareke y col., 2002; Stadler y col., 2002; Grob y col., 2003; Rydberg y col., 2003; Yasuhara y col., 2003). El proyecto Europeo HEATOX verifica que tanto el tiempo de horneado como la temperatura incrementa la cantidad de acrilamida en la corteza y en el pan de centeno crujiente y existen interacciones significativas entre ambas variables. El proyecto HEATOX confirma lo indicado anteriormente pero demuestra además que los niveles de acrilamida descienden con el horneado a 260°C/20min y que en estas condiciones los niveles son menores en la parte exterior de la corteza que en la inmediatamente interior. Basados en estos hallazgos, el proyecto aplicó dos líneas de trabajo, vapor de agua en horneados convencionales y técnicas alternativas de aplicación de calor como radiación infrarroja y chorro de aire. La aplicación de vapor en los últimos 5 minutos de horneado reduce la acrilamida (40%), sin afectar significativamente al olor, apariencia, textura y aroma (HEATOX, 2006). Los resultados obtenidos aplicando infrarrojos y chorro de aire una vez establecidas las condiciones, concluyen que en el horneado de panes con infrarrojo puede ofrecer un perfil sensorial similar al horneado convencional y un contenido en acrilamida un 60% más bajo (HEATOX, 2006).

Procesos de molienda y fermentación. La asparragina como se comentó es el factor limitante en la formación de acrilamida y esta se encuentra en altas concentraciones en el salvado. Por tanto, a mayor grado de extracción mayor contenido en asparragina y consecuentemente en acrilamida. El proyecto HEATOX demuestra que los panes altos en fibra poseen mayor contenido en acrilamida que los bajos en fibra. Sin embargo, la fermentación de las masas realizadas con diferentes fracciones de harina mostraron que la mayoría de la asparragina se consume a partir de las 2 primeras horas de fermentación con levaduras. Las masas madre no reducen de forma eficiente el contenido de asparragina, pero tienen un impacto negativo en la utilización de la asparragina por la levadura. Este tipo de fermentación puede dar lugar a panes con un contenido más alto de acrilamida respecto a los elaborados solo con levadura (Keramat y col., 2011).

Indicadores de pardeamiento químico y formación de acrilamida en productos horneados. Los indicadores furosina, hidroximetilfurfural, glucosilomaltol y color se han ensayado para evaluar la intensidad de los tratamientos térmicos (tiempo y temperatura), en el horneado de diferentes tipos de panes y de panes precocidos. Existe una correlación lineal entre la formación de HMF y de color en el horneado de panes; pero no existe correlación entre furosina/HMF y furosina/T^a de horneado (Ramírez-Jiménez y col., 2000). El tostado de pan de molde mostró que a partir de los 10 min la furosina comenzó a descender (Ramírez-Jiménez y col., 2000). Los estudios en panes pre-cocidos mostraron que la furosina no se detecta en la masa cruda e incrementa durante la elaboración del pan precocido (175°C/14 min), mientras que el color no sufre cambios, ni se detecta HMF (Ruiz y col., 2004); por tanto, no cabe esperar que se forme acrilamida (Keramat y col., 2011). La furosina y el HMF podrían

ser indicadores de utilidad para estimar la formación de acrilamida en el proceso de horneado de panes.

Estudios en otros derivados de cereales

Cereales de desayuno. Los cereales de desayuno comprenden una gran variedad de productos con una amplia variedad de cereales, formas, formulaciones y procesos tecnológicos. En general incluyen un proceso de extrusión (a_w baja-intermedia y temperatura superior a 80-95°C) y secado-tostado (a_w baja y temperatura superior a 150°C). Las reacciones de pardeamiento químico (Maillard y caramelización) pueden darse en la elaboración de estos productos y van a intervenir en la calidad sensorial de estos productos.

El estudio de una gran variedad de cereales de desayuno comerciales procedentes de 12 empresas con muestra de cereales de maíz, arroz, trigo y mezcla de cereales mostraron valores entre 62 y 803 $\mu\text{g}/\text{kg}$, con un valor medio de 292 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Coincidiendo los valores más altos, en los cereales cuya base es el trigo, en los que tienen más fibra y en los que poseen mayor contenido en proteínas (Rufián-Henares y col., 2006a)

Indicadores de pardeamiento químico y formación de acrilamida en cereales de desayuno. Los estudios llevados a cabo sobre correlación de indicadores de pardeamiento químico (HMF, furosina, color) y acrilamida, no mostraron ninguna correlación con los indicadores ya citados (Rufián-Henares y col., 2006b). La heterogeneidad del estudio dificulta estas correlaciones que habían sido establecidas en otros productos como patatas fritas (Pedreschi y col., 2007) y corteza de pan (Surdyk y col., 2004).

Churros. Los churros, siendo masas fritas poseen un contenido en acrilamida de 160 $\mu\text{g}/\text{kg}$ materia seca similar al contenido en cereales de desayuno (292 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Rufián-Henares, y col., 2006c), galletas de desayuno (247 $\mu\text{g}/\text{kg}$), galletas (140 $\mu\text{g}/\text{kg}$), colines (157 $\mu\text{g}/\text{kg}$) (Rufián-Henares y col., 2007) y el chocolate (190 $\mu\text{g}/\text{g}$) (Mestdagh y col., 2007). Bermudo y col. (2008) también encontraron valores similares.

1.1.5.3.3. Café

El tostado de café se realiza en un rango de temperaturas de 220°C a 250°C, y el tiempo y la velocidad juegan un papel importante en las propiedades sensoriales (color, aroma y sabor). El proceso se ajusta cuidadosamente al perfil característico del café deseado. Los granos de café son sometidos a temperaturas relativamente más altas que las correspondientes a otros alimentos, y se considera que existe más de una vía que lleve a la formación de acrilamida en el café (Stadler y Scholz, 2004). La concentración de asparragina libre en granos de café verde se encuentra dentro de un rango muy estrecho, de 30 a 90 mg/ 100 g. La acrilamida no es estable en el café comercial almacenado en su envase original (Andrzejewski y col., 2004; Delatour y col., 2004). Pérdidas del 40% a un 60% se han detectado en cafés molidos almacenados a temperatura ambiente. Los valores de acrilamida descienden durante el almacenamiento según tiempo y temperatura y existen controversias en cuanto a los

valores determinados en las muestras (Delatour y col., 2004; Hoenicke y Gatermann, 2005). Por otra parte, la investigación ha demostrado que la acrilamida se degrada o se elimina durante el tostado (Taeymans y col., 2004). La acrilamida, se forma en el café al comienzo de la etapa de tostado, llegando a más de 7 mg/kg, hacia el final del ciclo de tostado (Stadler y Scholz, 2004). El café de tostado profundo, elaborado a temperaturas similares pero duplicando el tiempo, surge como una opción potencial para reducir la acrilamida, pero podría generar otros compuestos indeseables y afectar a las propiedades sensoriales del café. La acrilamida en los granos de café tostados posee valores de 200 mg/kg (máximo 958 mg/kg) y de 188 mg/kg (máximo 1047 mg/kg) en el café tostado e instantáneo, (EFSA, 2010). Baum y col., (2008) confirmaron que cerca del 90% de la acrilamida permanece unida a la matriz del café.

1.1.5.4. Niveles de Acrilamida en alimentos

La información sobre el contenido de acrilamida en alimentos es muy amplia. La Comisión Europea recomendó a la países miembros establecer un seguimiento anual desde el año 2007 (Recomendación de la Comisión 2007/331/CE). En la tabla 1.9 se recogen los datos correspondientes al 2010 con objeto de conocer entre los valores de acrilamida de los diferentes grupos de alimentos (EFSA, 2012).

Tabla 1.9. Niveles de acrilamida en diferentes alimentos
Correspondientes al año 2010 recopilados por la EFSA, 2012

	Nº de Muestras	Media µg/kg	Percentil 90 µg/kg
Patatas fritas			
Tipo Chips	242	675	1538
Tipo francés	256	338	725
Patatas cocina domestica			
Fritas	64	198	568
No especificada	25	270	707
Horneadas	28	690	1888
Galletas			
Crackers	64	178	303
G. Infantiles	46	86	175
G. Sin especificar	100	289	640
Barquillos	37	389	880
Pan			
Tostado	54	249	665
Pan	150	30	63
Cereales de desayuno	174	138	293
Alimentos infantiles basados en cereales	82	31	60
Café			
Instantáneo	15	1123	2629
Sin especificar	9	441	1800
Tostado	103	256	462
Sustitutos del café	24	1350	3300

Los niveles más elevados corresponden al grupo del café y sustitutos del café (puede ser malta o achicoria) entre otros. En este grupo existen grandes diferencias entre el café instantáneo con valores medios superiores a 1000 µg/kg con un percentil 90 de 2629 µg/kg y el café tostado con valores inferiores de 256 µg/kg y un percentil 90 de 462 µg/kg. Existen valores indicativos de acrilamida establecidos por la EFSA para el café tostado de 450 µg/kg y de 900 µg/kg para el café instantáneo. Los valores de café instantáneo en la monitorización realizada desde 2007 a 2010 con objeto de controlar los procesos para reducir tanto como sea posible los niveles de acrilamida, no solo no han descendido sino que incluso han aumentado pasando de 229 µg/kg en el 2007 a 1123 µg/kg en el 2010 (EFSA, 2012). Las opciones disponibles para reducir el contenido de acrilamida en el café son realmente limitadas ya que las características sensoriales se desarrollan con un tostado intenso del grano de café.

El segundo grupo en importancia corresponde a las patatas fritas especialmente las chips o de aperitivo con valores medios de 675 µg/kg y un percentil 90 de 1538 µg/kg, los valores establecidos por la EFSA son de 1000 µg/kg; manteniéndose el valor a lo largo de los 4 años de monitorización o incluso incrementando en el percentil 90. Las patatas fritas de aperitivo ha sido uno de los grupos de alimentos más estudiados debido a los valores elevados de acrilamida y al alto consumo de este aperitivo. Sin embargo, se observa que la industria alimentaria no siempre aplica las recomendaciones establecidas para el control de acrilamida en el procesado de este alimento. Las patatas horneadas de acuerdo con el procesado domestico muestran valores también elevados 690 µg/kg.

Respecto a los alimentos a base de cereales tanto para adultos como para alimentación infantil los valores son inferiores a los de los alimentos anteriormente indicados. El pan tostado presenta valores muy superiores 249 µg/kg al pan blanco 30 µg/kg. El alto contenido en miga de estos últimos en relación a la corteza limita los valores. No se detectan variaciones en la monitorización desde el 2007 al 2010 incluso se podría ver que hay un ligero aumento.

Los valores correspondientes a las galletas tipo cracker, galletas sin especificar y barquillos presentan valores parecidos al del pan blanco, algo mayores en los barquillos 389µg/kg.

Respecto a los derivados de cereales para alimentación infantil tanto las galletas como los cereales infantiles presentan valores inferiores a 100 µg/kg y han descendido los valores en los años de monitorización.

Los cereales de desayuno poseen valores bajo 138 µg/kg y se mantienen a lo largo de los años de muestreo. Las indicaciones de la EFSA para este grupo son de 400 µg/kg.

Los grupos de alimentos anteriormente citados son los más estudiados por los niveles de acrilamida presentes en ellos. Sin embargo, existe otro grupo de alimentos con valores más bajos que por tanto su contribución a la exposición es mucho menor y que incluyen, las almendras y avellanas tostadas, aceitunas de mesa y alimentos que no han sido sometidos a un calentamiento intenso como las frutas desecadas (ciruelas, peras, y albaricoques).

1.1.5.5. Toxicología de la acrilamida

Biotransformación de la acrilamida

Absorción. La absorción de la acrilamida puede ocurrir por diferentes vías dependiendo de si la exposición es oral, dérmica o por inhalación. Si el consumo es oral, la hidrosolubilidad, polaridad y bajo peso molecular permite su absorción rápida (Schettgen y col., 2003). Los estudios experimentales en animales y en humanos sobre la ingesta oral de la AA no unida covalentemente a la matriz del alimento demuestran una rápida absorción en el tracto gastrointestinal.

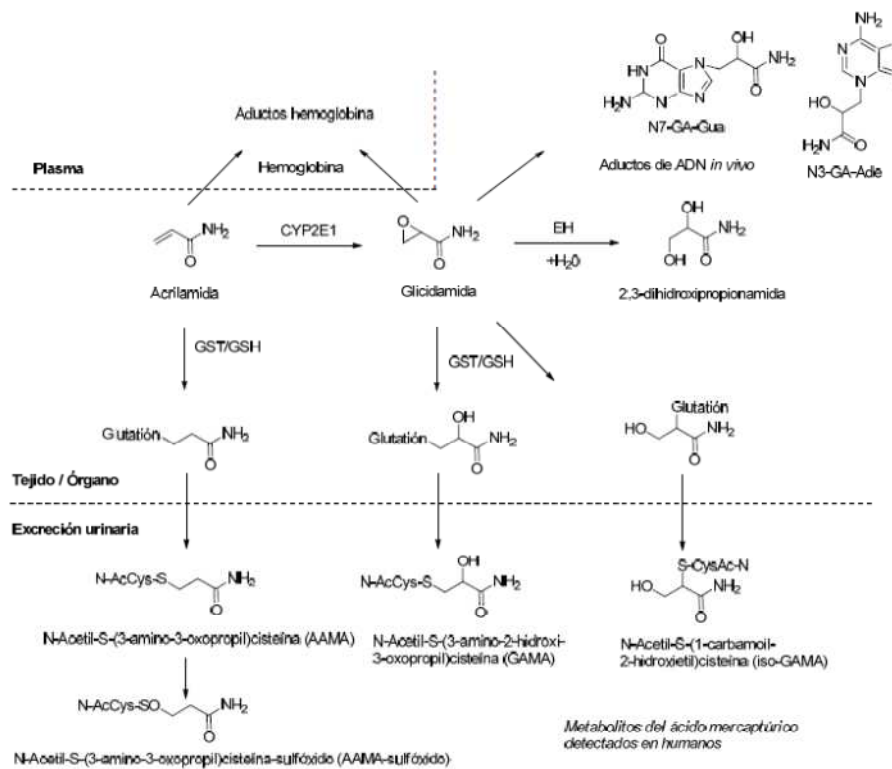
Distribución. La AA absorbida se distribuye rápidamente por la sangre; la concentración más alta se localiza en los eritrocitos. A pesar, de su importante efecto neurológico, la acrilamida no se concentra en el sistema nervioso central; se localiza en diversos órganos, musculo, pulmón, cerebro, corazón, riñones, hígado y piel (Dearfield y col., 1995). La AA también es capaz de atravesar la placenta y una pequeña parte se transfiere a la leche humana (Edwards, 1976)

Metabolismo. En sangre, la AA tiene una vida media de 2 horas y en los tejidos puede alcanzar de 5 horas a 8 días. La acrilamida no se acumula en el organismo. En el hígado la acrilamida a través de la vía del citocromo P₄₅₀ (Miller y col., 1982) puede formar conjugados con el glutatión (GSH) a través de la enzima glutatión-S-transferasa o producir el epóxido glicidamida (GD), principal metabolito de la acrilamida que también puede formar conjugados con la GSH. Ambos compuestos (acrilamida y glicidamida), son muy hidrofílicos y pueden formar aductos (Figura 1.7). La glicidamida puede hidrolizarse mediante la hidrolasa epóxido (EH) a gliceramida (Friedman, 2003). La vía principal de metabolización de la acrilamida es la conjugación con GSH reducido mediante la glutatión-S-transferasa. La formación de GA representa una vía de activación metabólica preferentemente. Los ratones son más competentes en la conversión de AA en GA que las ratas o los seres humanos (EFSA, 2015).

La acrilamida y la glicidamida se pueden unir in vivo a la hemoglobina, a las albúminas del suero, ADN y enzimas (Doerge y col., 2005; Shipp y col., 2006). La glicidamida es más reactiva frente al ADN y las proteínas que el compuesto original, acrilamida (Dearfield y col., 1995). Sin embargo, la glicidamida parece ser menos importante en los seres humanos que en los roedores (Fennell y col., 2006). Se ha estimado que, a dosis equimolares de acrilamida, la exposición humana a glicidamida es 2-4 veces menor que en los roedores. La GA representa la ruta implicada en la genotoxicidad y carcinogenicidad de AA. Los aductos covalentes de ADN de GA han sido ampliamente demostrado en modelos in vitro y animales de experimentación, y éstos han sido utilizados como biomarcadores de exposición AA (EFSA, 2015).

Excreción. La orina es la principal vía de eliminación de la acrilamida. La detoxificación de AA y AG puede proceder a través de la conjugación con GSH y los aductos de GSH posteriormente se convierten en ácidos mercaptúricos, que se excretan en la orina (Figura 1.7). Los ácidos mercaptúricos de AA y GA representan los principales metabolitos y sus niveles de excreción urinaria pueden ser utilizados como biomarcadores de exposición de AA. La AA y GA también puede reaccionar con las proteínas para formar aductos covalentes, por ejemplo, con la hemoglobina (Hb). También estos aductos de Hb representan importantes biomarcadores de exposición a AA como conjugados del ácido mercaptúrico. Mas del 90% de la acrilamida absorbida es excretada por la orina como metabolito y menos del 2% es excretada sin metabolizar. Pequeñas cantidades son excretadas con la bilis y con las heces (Erkekoglu y Baydar, 2010). Aproximadamente el 60% de la dosis administrada aparece en orina en 24 horas (Miller y col., 1982). Determinadas condiciones de malnutrición, estrés oxidativo y enfermedad hepática (hepatitis alcohólica, cirrosis y otros desordenes hepáticos), pueden producir un descenso del contenido de GSH en el hígado. Los niños no son capaces de soportar una carga tan alta de acrilamida en el hígado como los adultos, especialmente bajo las condiciones indicadas; por tanto la toxicidad en niños es más alta (Erkekoglu y Baydar, 2010).

Figura 1.7. Metabolismo de la acrilamida (tomado de Arribas Lorenzo, 2013)



Toxicidad de la acrilamida

Los estudios de toxicidad de la acrilamida con dosis repetidas de AA se han realizado en ratas, ratones, monos, gatos y perros. Los efectos adversos consistieron en la pérdida de peso corporal, efectos sobre el sistema nervioso reflejados en una parálisis de las extremidades posteriores, reducción en el rendimiento rotorod y/o cambios histopatológicos en nervios periféricos y estructuras del sistema nervioso.

En los ratones, además de los efectos neurotóxicos se han descrito efectos sobre los testículos, degeneración de epitelios, reducción de los espermatozoides, y la presencia de células gigantes multinucleadas; así como hiperplasia de estomago, proliferación de células hematopoyéticas del bazo, inflamación de la glándula prepucial, hiperplasia epitelial del alveolo pulmonar y cataratas. Y, para las ratas hembra, quistes ováricos (EFSA, 2015).

En ratas, además de los efectos neurotóxicos se han descrito efectos que influyen la atrofia del músculo esquelético, vejigas urinarias distendidas, la proliferación de células hematopoyéticas en el bazo, la hiperplasia de la médula ósea, atrofia ovárica, degeneración de la retina, degeneración y necrosis de los hepatocitos del hígado, hiperplasia ósea, infiltración celular del ganglio linfático mesentérico y la hiperplasia de la glándula pituitaria (EFSA, 2015).

Los estudios toxicológicos con AA se han llevado a cabo en ratas, ratones, monos, gatos y perros, utilizando varios protocolos de dosificación y vías de exposición. Se reportaron valores de DL50 oral para AA de > 150 mg/kg de peso corporal para las ratas, 107 mg/kg de peso corporal para los ratones, y de 150-180 mg/kg de peso corporal de conejos y cerdos (EFSA, 2015).

La *genotoxicidad* de AA y de su metabolito reactivo GA, se ha estudiado ampliamente. Los estudios *in vitro* han demostrado que la AA es un mutágeno débil de células de mamíferos pero es un efectivo clastógeno y la GA es un fuerte mutágeno y clastógeno. Las mutaciones se inducen a partir de un aducto de ADN. *In vivo*, AA es claramente genotóxico en células somáticas y germinales. AA ejerce su mutagenicidad vía el metabolismo por CYP2E1 a GA. AA también puede inducir mutaciones genéticas por una vía que implica la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y daño oxidativo del ADN (EFSA, 2015)

Carcinogenicidad. En 1994, La agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó la AA como "Grupo 2A" (probablemente carcinógeno para humanos) (Lyon, 1994), debido a su neurotoxicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad (Erkekoglu y Baydar, 2010; Hogervorst y col., 2010). Posteriormente La Comisión Europea (EC, 2002) clasificó a la acrilamida como un carcinógeno de la categoría A y mutágeno de la categoría A; así como una sustancia de "very high concern" (extremadamente preocupante) por la Europea Chemicals Agency (ECHA, 2010).

La 72ª reunión del Comité Mixto FAO / OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) han resumido los estudios de AA en todo el mundo desde su 64ª reunión (JECFA, 2005, 2011). El documento concluye que se han observado múltiples tumores en órganos de animales de experimentación después de la exposición a AA; si

bien, no se ha observado ninguna asociación significativa a partir de los estudios epidemiológicos entre la ingesta de AA y la aparición de cánceres (Friedman, y col., 1.995; Johnson y col., 1986). El último meta-análisis publicado en 2015, indica que la acrilamida de la dieta no está relacionada con el riesgo a padecer los cánceres más comunes. Y, solamente se ha encontrado una modesta asociación con el cáncer renal y cánceres de endotelio y ovarios de mujeres no fumadoras (Peluccci y col., 2015)

1.1.5.6. Actividades de regulación de la acrilamida

1.1.5.6.1. Recomendaciones relativas a la acrilamida de la Unión Europea

La información aportada en este apartado está basada en la recomendación 2013/647/UE

La industria alimentaria, los Estados miembros y la Comisión han realizado un gran esfuerzo desde 2002 para investigar las vías de formación de la acrilamida y reducir sus niveles en los alimentos transformados.

De 2007 a 2009, los Estados miembros efectuaron un control de los niveles de acrilamida en los alimentos, con arreglo a la Recomendación 2007/331/CE de la Comisión, y a partir de 2010 los controles se realizaron de acuerdo con la Recomendación 2010/307/UE. El ejercicio de control está destinado a los alimentos que contienen altos niveles de acrilamida o que contribuyen significativamente a su ingesta diaria. Debido a los altos niveles de acrilamida encontrados en algunos productos con respecto a otros de la misma categoría; la Comisión consideró apropiado que las autoridades competentes de los Estados miembros realizaran investigaciones de los métodos de producción y transformación de las empresas alimentarias. A tal efecto, la Comisión adoptó el 10 de enero de 2011 una Recomendación relativa a la investigación de los niveles de acrilamida en los alimentos (Recomendación UE, 2011).

La investigación a la que se hace referencia establecerá, en particular, en qué medida las opciones que se conocen actualmente para minimizar los niveles de acrilamida, por ejemplo las propuestas en el Código de Prácticas para la acrilamida de la Comisión del *Codex Alimentarius* y la «caja de herramientas» de FoodDrinkEurope, han sido aplicadas por el explotador de la empresa alimentaria.

La EFSA recoge en el informe científico “Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007-2010”, publicado el 18 de octubre de 2012, los resultados correspondientes al seguimiento del periodo 2007 y 2010. La EFSA llegó a la conclusión de que entre los grupos de alimentos no se observaba ninguna tendencia constante a reducir los contenidos de acrilamida y que solo se había observado un descenso de los niveles en algunas categorías de alimentos, mientras que en otras habían aumentado (EFSA, 2012).

Partiendo de los resultados de las actividades de control realizadas en 2011 y 2012 y de los obtenidos a tenor de las Recomendaciones 2007/331/CE y 2010/307/UE, se procedió a modificar determinados valores indicativos establecidos en el anexo de la Recomendación de 2011. Por consiguiente, esta se sustituyó por la nueva Recomendación, 2013/647/UE (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Valores indicativos de acrilamida basados en los datos de control de la EFSA entre 2007-2012 (Recomendación 2013/647/UE)

ALIMENTO	Valor indicativo (µg/kg)
Patatas fritas listas para consumir	600
Patatas fritas a la inglesa (<i>chips</i>) fabricadas con patatas frescas y con masa de patatas	1.000
Galletas saladas a base de patatas	1.000
Pan de molde	
a) pan de molde a base de trigo	80
b) otro pan de molde	150
Cereales para desayuno (a excepción del porridge):	
- Productos de salvado y cereales integrales, grano inflado	400
- Productos de trigo y centeno(*)	300
- Productos de maíz, avena, espelta, cebada y arroz (*)	200
Galletas y barquillos	500
Galletas saladas, excepto las de patata	500
Pan crujiente	450
Pan de especias	1.000
Productos similares a otros de esta categoría	500
Café tostado	450
Café instantáneo (soluble)	900
Sucedáneos de café	
a) a base de cereales, principalmente	2.000
b) otros sucedáneos del café	4.000
Alimentos infantiles distintos a los elaborados a base de cereales (**)	
a) Sin ciruelas pasas	50
b) Con ciruelas pasas	80
Galletas y bizcochos para lactantes y niños de corta edad	200
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad (***), excluidos las galletas y los bizcochos	50

(*) Cereales no integrales ni de salvado. La categoría se determina en función del cereal presente en mayor cantidad.

(**) Tal como se definen en el artículo 1, apartado 2, letra b), de la Directiva 2006/125/CE de la Comisión, de 5 de diciembre de 2006, relativa a los alimentos elaborados a base de cereales y alimentos infantiles para lactantes y niños de corta edad (DO L 339 de 6.12.2006, p. 16).

(***) Tal como se definen en el artículo 1, apartado 2, letra a), de la Directiva 2006/125/CE.

1.1.5.6.2. Guía para la reducción de acrilamida en la industria alimentaria (Caja de herramientas).

La CIAA (Confederación de Industria Agro-Alimentaria de la Unión Europea), actualmente denominada Food Drink Europe en colaboración con la Unión Europea y las autoridades nacionales de los estados miembros desarrolló en 2006 una guía que resume las medidas disponibles para reducir los niveles de acrilamida en determinados alimentos con varias renovaciones en años posteriores correspondiendo la última

renovación a enero de 2014 (FoodDrinkEurope, 2014). Esta «caja de herramientas», contiene 14 parámetros (o “herramientas”) diferentes agrupadas en cuatro grandes categorías (“compartimentos”), que los productores de alimentos pueden utilizar de forma selectiva, conforme a sus necesidades específicas, a fin de reducir los niveles de acrilamida en sus productos. Estos cuatro compartimentos hacen referencia a los factores agronómicos, receta del alimento, transformación y preparación final.

La FoodDrinkEurope, representa a la industria alimentaria y de bebidas de Europa. Los productores de alimentos pueden utilizar de forma selectiva, conforme a sus necesidades específicas, a fin de reducir los niveles de acrilamida en sus productos la caja de herramientas. Además, se elaboraron folletos breves en los que figura información sobre las herramientas más importantes para cada sector, una actividad en la que ayuda y contribuye los reguladores.

Las recomendaciones incluidas corresponden a: snacks a base de patatas, patatas fritas, productos basados en granos de cereales, café y sustitutos, galletas y cereales infantiles y alimentos infantiles elaborados sin cereales.

Las Recomendaciones relativas a la acrilamida de la Unión Europea (2013/647/UE) indica que debe seguir investigándose el Sistema de Análisis de Peligros y Puntos de Control Crítico (APPCC) de cada explotador de empresa alimentaria o un sistema similar a fin de estudiar, junto con el explotador de la empresa alimentaria, si se han identificado las fases de transformación pertinentes en las que puede formarse acrilamida y si se han adoptado las medidas oportunas para controlarlas. Al hacerlo, las autoridades competentes deben evaluar en qué medida las opciones que se conocen actualmente para minimizar los niveles de acrilamida, por ejemplo las propuestas en el Código de Prácticas para la acrilamida de la Comisión del *Codex Alimentarius*, (2009) y la «caja de herramientas» de FoodDrinkEurope, han sido aplicadas por el explotador de la empresa alimentaria.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. MUESTRAS

2.1.1 PATATAS

2.1.1.1 Estudio del contenido en precursores

Se analizaron muestras de patata cruda a partir de patatas comercializadas para uso culinario. Las patatas fueron obtenidas directamente de los supermercados y fueron las siguientes:

- Variedad Monalisa: tipo de patata especial para freír y cocer. Origen: España.
- Variedad Agata: patata para cocer o asar. Origen: Francia
- Variedad Bintje: uso culinario no especificado. Origen: CE
- Variedad Red Pontiac: patata especial para guiso. Origen: España.
- Variedad Fabula: cualquier uso culinario. Origen: España.
- Variedad Desiree: para cocer, también apta para freidora. Origen: España.
- Variedad Malaga: cualquier uso culinario. Origen: España.
- Variedad Elodie: todos los usos, aunque destaca para freír. Origen: Francia.
- Variedad Frisia: para cocer o asar. Origen: España.

Las patatas de las variedades Monalisa, Ágata, Bintje, Elodie, Desiree y Frisia se compraron en las grandes superficies donde se comercializan en sacos de 3 ó 5 kg. Las patatas de la variedad Red Pontiac fueron adquiridas en un establecimiento local donde se venden a granel. Estas patatas fueron procesadas para su análisis inmediatamente tras su obtención. Las variedades Fabula y Malaga se obtuvieron de un mayorista de frutas y hortalizas. Fueron almacenadas en una cámara a 4°C hasta su uso con un posterior reacondicionamiento de varios días a temperatura ambiente.

Para el estudio de distribución de azúcares en patata se utilizaron patatas de la variedad Málaga con unas dimensiones de 11 cm de largo, 8,5 cm de grosor y 7 cm de ancho. Se pelaron con un pelador de cocina y se cortaron en tres capas de la siguiente forma: una capa externa de 1,3 cm de grosor y una capa intermedia de 1cm dejando una zona central de 2cm de grosor.

2.1.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés

Se utilizaron patatas de la variedad Fabula obtenidas de un proveedor local. Es una variedad autóctona del sur de España y en cuya etiqueta aparece la leyenda “para cualquier uso culinario”. Fueron almacenadas en una cámara a 4°C hasta su uso con un posterior reacondicionamiento de varios días a temperatura ambiente. Los tubérculos presentaban unas dimensiones variables entre 6-8 cm de largo, 5-9 cm de grosor y 5-7 cm de ancho.

2.1.1.3 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo chips

Se analizaron un total de 10 muestras de patatas fritas de la modalidad “chips” obtenidas en distintos supermercados y freidurías caseras. Ocho de ellas provenían de la industria y pertenecían a seis marcas comerciales y dos de ellas eran de freidurías caseras.

2.1.2 CEREALES

2.1.2.1 Estudio de acrilamida en rebozados con harina y pan rallado.

Para este estudio se utilizaron las siguientes muestras:

- Harina de trigo para fritos y rebozados. Ingredientes: harina de trigo blando (48%), harina de trigo duro (48%), almidón de trigo, gluten de trigo y estabilizadores.
- Harina de garbanzos.
- Harina de arroz 100%
- Harina de tempura (indicada para la fritura de verduras, carnes y pescados): harina de trigo y maíz, gasificantes (bicarbonato de sodio, difosfato sódico, fosfato monocálcico), sal y gluten.
- Pan rallado grano grueso: pan rallado natural elaborado con harina de trigo, agua, gluten de trigo, sal, grasa vegetal, azúcar, levadura, emulgente y colorante.
- Pan rallado grano fino: harina de trigo, agua, sal y levadura.

2.1.2.2 Estudio de acrilamida y furosina en papillas de cereales infantiles

2.1.2.2.1 Papillas cedidas por una industria elaboradora

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. La mezcla de harinas crudas en diferentes proporciones es la base para la elaboración de las harinas tostadas. La hidrólisis de estas harinas tostadas o sus mezclas y el secado por rodillos es lo que constituye la muestra de papilla final.

2.1.2.2.2 Muestras comerciales

Se han analizado 9 papillas comerciales de diferente procedencia a las utilizadas en el estudio anterior.

2.1.2.3 Estudio de acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería

Se han utilizado: hogaza de pan, pan de molde, y productos de bollería obtenidos en una panadería local los primeros y cedidos por una industria elaboradora los segundos.

2.2.- MÉTODOS

2.2.1 Elaboración de patatas fritas tipo francés

Las patatas de la variedad Fabula fueron peladas a mano utilizando un pelador de cocina, se lavaron con agua del grifo y se cortaron con una cortadora manual obteniéndose las llamadas “french fries” con unas dimensiones de 1 cm de ancho, 1 cm de grosor y 4-6 cm de largo. Las patatas crudas fueron sometidas a distintos pretratamientos de remojo antes de ser fritas con la intención de disminuir el contenido en acrilamida. Las patatas crudas y cortadas fueron lavadas bajo el grifo durante unos segundos y posteriormente se pesó aproximadamente 1 kg de patatas para cada uno de los tratamientos de remojo en los que se usaron 6 L de agua por kg:

- Remojo en frío durante 1 hora con:

- Agua destilada
 - Bisulfito sódico (Albus) al 1%
 - Ácido cítrico (Panreac) al 1%
 - Bicarbonato sódico (Panreac) al 1%
 - Ácido ascórbico (Panreac) al 0,5%.
- Remojo en agua hirviendo durante 2 minutos con:
 - Agua destilada
 - Bisulfito sódico (Albus) al 1%
 - Ácido cítrico (Panreac) al 0,5%
 - Bicarbonato sódico (Panreac) al 1%

Para la fritura a 170°C se utilizó una freidora doméstica Taurus modelo “fritaurus professional 3”. Para la fritura a 190°C se usó también una freidora doméstica Solac modelo “ideal 2000 professional”. En ambos casos el aceite era de girasol refinado con acidez de 0,2º.

Se frieron 110 g de patata a cada temperatura utilizando aproximadamente 2 L de aceite. Las patatas se introdujeron en la freidora durante el tiempo estimado para su comestibilidad según la temperatura y el tratamiento. Previamente se realizó un estudio para fijar los tiempos de fritura mediante la utilización de un panel de catadores. Cada ensayo se realizó por triplicado obteniéndose un total de 54 muestras a analizar. Las patatas fritas fueron congeladas hasta su análisis. La TABLA 2.1 muestra los tiempos de fritura utilizados.

Tabla 2.1 Tiempos de fritura en los distintos tratamientos

	Agua Fría		Agua hirviendo	
	170°C	190°C	170°C	190°C
Agua destilada	10 min	6 min	10 min	8 min
Bisulfito sódico	10 min	8 min	10 min	8 min
Ácido cítrico	10 min	6 min	10 min	6 min
Bicarbonato	7 min	4 min	7 min	4 min
Ácido ascórbico	8 min	5 min		

2.2.2 ELABORACIÓN DE REBOZADOS Y EMPANADOS

Para este estudio se utilizó una muestra de calabacín cortado en bastones con unas dimensiones entre 1x1 cm y 2x1 cm de ancho y 3–4 cm de largo. Los bastones fueron remojados primero en agua, leche o huevo según el tratamiento a realizar y después se rebozaron en harina o pan rallado. Se utilizó una freidora Solac modelo “ideal 2000 professional” con aceite de girasol a 190°C. Las cantidades utilizadas y los tiempos de fritura se recogen en la tabla 2.2.

Tabla 2.2. Condiciones de rebozado en las diferentes harinas utilizadas

HARINA	TRATAMIENTO	CANT. LIQUIDO (ml)	CANT HARINA (g)	TIEMPO FITURA (min)
	Agua	80	50	3,5
Trigo	Leche	85	50	3
	Huevo	120	50	4
	Sola			2
	Agua	95	50	2,5
Garbanzos	Leche	200	100	2
	Huevo	200	80	4
	Agua	50	85	2,5
Tempura. Trigo-maíz	Leche	50	50	2,5
	Huevo	50	100	4
	Agua	85	50	3
Arroz	Leche	90	50	2
	Huevo	125	50	4
	harina+huevo	100	40	2,5
Empanado grueso	Harina	50		2,5
	harina+huevo	100	40	3
Empanado fino	Harina	50		3

Como en el estudio anterior la relación cantidad de líquido y sólido y tiempo de fritura se estableció previamente mediante un panel de catadores, el tiempo de fritura nunca superó los cuatro minutos.

2.2.3 ELABORACIÓN DE PICATOSTES (PAN FRITO), PANES TOSTADOS Y PRODUCTOS DE BOLLERIA CON DIFERENTE GRADO DE TOSTACIÓN.

Los picatostes se elaboraron cortando el pan en trozos de 2,5x2,5 cm y 1,5x1,5 cm. Se frieron utilizando una freidora Solac modelo “ideal 2000 professional” con aceite de girasol a 190°C durante 3 minutos.

El pan molde se sometió a calentamiento en un tostador previamente calentado durante 20 minutos. Posteriormente se introdujeron las rebanadas de dos en dos durante 1, 2, 3, 4, 5, y 6 minutos.

Se analizaron 10 productos de bollería denominados: caracola, palmera mallorquina, palmera, media noche, suizo grande, suizo pequeño, hojaldre, escarcha larga, escarcha redonda y torta de Inés Rosales. Todos ellos fueron cedidos por una industria elaboradora local. Los 7 primeros se obtuvieron con dos grados de tostación diferentes.

2.2.4. ENCUESTA

Se realizó una encuesta a 256 personas al objeto de conocer la forma habitual de freír las patatas tipo francés. Las personas encuestadas eran las que elaboraban este producto en sus hogares de forma habitual. El formato de encuesta que se llevó a cabo se muestra a continuación:

DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN Y BROMATOLOGÍA

ENCUESTA DE CONSUMO Y FORMA DE PREPARACIÓN DE PATATAS FRITAS
(Se incluyen patatas utilizadas para guarnición, a lo pobre, incorporadas a guiso, y utilizadas para elaboración de tortilla)

(no rellenar)

CUESTIONARIO N°

--	--	--

Se está realizando un estudio sobre la frecuencia de consumo y formas de preparación de patatas fritas. Agradecemos su colaboración.

Marque con una X la opción elegida:

1.- **Procedencia:** Provincia _____ Municipio _____

2.- **Sexo:** Varón Mujer

3.- **Edad:** Menos de 25 años 25 - 50 51 - 65 Más de 65

PREPARACIÓN DE PATATAS FRITAS:

4.- **Número de personas para las que prepara la comida:**

1	2	3	4	5	más
---	---	---	---	---	-----

5.- **Tipo de patatas que fríe:** Crudas Congeladas

6.- **Tipo de patatas que compra:** Para freír Patatas nuevas Patatas viejas No selecciono

7.- **Frecuencia de compra:** Cada semana Cada 15 días Cada mes

8.- **Lugar de almacenamiento:** Cocina Despensa Lavadero o patio

9.- **¿Deja las patatas en remojo?:** Si (enteras) Si (cortadas) No

10.- **Tiempo que las deja:** Menos de 30 min 30-60 min Más de 60 min

11.- **Formas de corte más frecuente:** Alargadas Cuadraditos o trozos Láminas o rodajas

12.- **Forma de freírlas:** Freidora Sartén

13.- **Tipo de aceite que utiliza:** Oliva Girasol Otros

14.- **Frecuencia de preparación de patatas fritas a la semana: (Días)**

1	2	3	4	5	6	7
---	---	---	---	---	---	---

15.- **¿Cómo le gustan las patatas?:** Poco fritas Normales Muy fritas o tostadas

2.3. DETERMINACIONES ANALITICAS

2.3.1 Análisis de acrilamida por HPLC-MS en patatas fritas tipo francés

Fundamento

Análisis de acrilamida por cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría de masas.

Muestras

Las muestras analizadas por estos métodos son las que corresponden al apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: *Mettler* modelo AE 200.
- Agitator *Vortexer Cleaver scientific Ltd*
- Ultraturrax T25 Digital (IKA)
- Centrífuga Sigma 2-16PK Sartorius
- Speed-vac (Savant SPD111V)
- Cartuchos de extracción (HLB Waters Oasis 30mg/1cc)
- HPLC-MS (LC Agilent 1100 acoplado a un detector MS Agilent Quadrupole)
- Columna Intersil 25x0,46x5 micras, Tecknokroma, Madrid, España)

Reactivos

- Bisulfito sódico (Albus) al 1%
- Ácido cítrico (Panreac) al 1% y al 0,5%
- Bicarbonato sódico (Panreac) al 1%
- Ácido ascórbico (Panreac) al 0,5%
- Metanol (Panreac)
- Acrilamida marcada (IL Acrilamida $^{13}\text{C}_3$ (+ 100 ppm hydroquinona) 1mg/ml en metanol)
- Disoluciones clarificantes: ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I), acetato de Zinc al 30% (Carrez II).
- Agua Milli Q
- Eluyente: ácido acético:metanol:agua milliQ (0,1:1,0:98,9)

Preparación de la muestra

Antes de los análisis se procede a desengrasar las muestras como en apartado 2.3.1.

Procedimiento

El procedimiento de análisis de acrilamida por HPLC-MS se realizó como se detalla a continuación:

Extracción: A 1g de patata frita desengrasada se añaden 5ml de metanol y 100 µl de patrón interno (acrilamida marcada). Se tritura en la ultraturrax, se agita y se centrifuga a 4°C durante 10 minutos a 4500 rpm. El sobrenadante obtenido se pasa a un tubo limpio y se añaden 25 µl de Carrez I y 25 µl de Carrez II y se vuelve a centrifugar en frío durante 5 minutos. Se pasan 1ml del sobrenadante a tubos eppendorf y se evapora por speed-vac. Una vez que se ha evaporado se añade a cada tubo 1ml de agua milliQ y se agita durante unos segundos para resuspender el extracto. Este extracto se filtra utilizando unos cartuchos de extracción HLB, , previamente acondicionado con 1 ml de metanol y 1 ml de agua destilada, descartándose las primeras 8 gotas y se recoge en viales para inyectar en el HPLC-MS.

Análisis cromatográfico:

- Volumen inyectado: 60 µl.
- Tiempo de análisis: 10 minutos.
- Temperatura de la columna: 32 °C
- Flujo 0,6 ml/min.

Identificación: se realizó mediante la concordancia del tiempo de retención y el espectro de masas.

Los iones monitorizados fueron (m/z) 72, 55 y 27 para la acrilamida y m/z 75 y 58 para ¹³C₃-acrilamida.

Determinación: se realizó por el método del patrón interno utilizando acrilamida marcada ¹³C₃.

Para la curva de calibrado se tomó como ordenada el valor resultante de dividir el área del pico de acrilamida (m/z 72) entre el área del pico del patrón interno (m/z 75) y como abscisa la concentración en ppb de acrilamida en disolución de medida. La ecuación de una curva tipo se muestra a continuación (25-1000 ppb):

$$Y = 0,0013X + 1,9307 \quad r^2 = 0,9993$$

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

2.3.2 Análisis de acrilamida por UPLC-MS/MS en rebozados con harina y pan rallado y picatostes

Fundamento

Análisis de acrilamida por cromatografía líquida de alta resolución-espectrometría masas/masas.

Muestras

Las muestras analizadas por este método son las que corresponden a los apartados 2.1.2.1 y 2.1.2.2.

Instrumental

- Agitator Vortexer Cleaver scientific Ltd
- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Centrífuga Sigma 2-16PK Sartorius
- Speed-vac (Savant SPD111V)
- Cartuchos de extracción (HLB Waters Oasis 30mg/1cc)
- Cromatógrafo líquido de ultra alta resolución y espectrofotómetro de masas: Acquity UHPLC BEH system y Waters Xevo TQ-S tandem mass spectrometer (Waters Co., Milford, MA)
- Columna cromatográfica: Acquity HPLC HSS T3 (2.1 x 100 mm 1,8 μ m)

Reactivos

- Metanol (Panreac)
- Acrilamida marcada (Acrylamide $^{13}\text{C}_3$ min 99 % atom; Isotec)
- Disoluciones clarificantes: ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I), acetato de Zinc al 30% (Carrez II).
 - Agua Milli Q
 - Eluyente: agua (A) y metanol (B) (Sigma).

Procedimiento

El procedimiento seguido fue similar al descrito anteriormente (2.3.3) solo que se partió de 1 g de muestra (rebozados, empanados y picatostes).

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 5 μ l
- Flujo: 0,2 ml/min.
- Rampa de elución (tabla adjunta)
- Temperatura: 40°C.
- Tiempo de análisis: 7 minutos.

Rampa de elución de acrilamida

Tiempo (minutos)	% A	% B
0-2,5	100	0
2,5-2,6	0	100
2,6-4,6	0	100
4,6-4,7	100	0
4,7-7	100	0

Identificación: se realizó mediante la adición de acrilamida patrón observando el incremento obtenido, la concordancia con el espectro de masas y el tiempo de retención.

Los iones monitorizados fueron (m/z) 72, 55 y 27 para la acrilamida y m/z 75 y 58 para $^{13}\text{C}_3$ –acrilamida.

Determinación: Se realizó por el método del patrón interno utilizando acrilamida marcada $^{13}\text{C}_3$. Para la curva de calibrado se tomó como ordenada el valor resultante de dividir el área del pico de acrilamida (m/z 72) entre el área del pico del patrón interno (m/z 75) y como abscisa la concentración en ppb de acrilamida en disolución de medida (0-72 ppb).

Ecuación tipo obtenida:

$$Y = 0,858262X + 0,8728 \quad r^2 = 0.9952$$

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

2.3.3 Análisis de acrilamida en patatas fritas tipo chips por GC-MS

Fundamento

Análisis de acrilamida por cromatografía de gases e identificación por espectrometría de masas.

Muestras

Se analizaron las muestras de patatas fritas comercializadas descritas en el apartado 2.1.1.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo de gases-masas: Trace 2000 (Thermo Electron Corporation)- detector de trampa iónica Polaris Q.
- Columna cromatográfica: capilar TR-Waxms 30 m x 0,25 mm, 0,25 μm (Thermo)
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 μm
- Centrifuga Sigma 2-16PK Sartorius
- Agitadores Vortexer Cleaver scientific Ltd
- Rotavapor: Büchi R-114

Reactivos

- Hexano para desengrasar (Panreac)
- Acrilamida 99% (Sigma-Aldrich)

- Acrilamida marcada (Acrilamida $^{13}\text{C}_3$ min 99 % atom; Isotec)
- Disoluciones clarificantes: ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I), acetato de Zinc al 30% (Carrez II).
- Bromuro potásico (Fluka)
- Ácido bromhídrico al 45% (Panreac)
- Solución saturada de bromo (1,6 mL de bromo / 100 mL de agua)
- Tiosulfato sódico hidratado 1M (Panreac) (2,48 g / 10 mL agua)
- Acetato de etilo (Sigma-Aldrich)
- Trietilamina (Sigma-Aldrich)
- Disolución de calibración: a partir de diluciones obtenidas de la disolución madre de acrilamida 1300 ppb para obtener una curva patrón con concentraciones entre 6 y 325 ppb.

Preparación de la muestra

Antes de los análisis se procede a desengrasar las muestras del siguiente modo: se trituran las patatas con una picadora doméstica. Se toma una cantidad de patata frita triturada en un tubo y se le añade hexano hasta que las cubra un dedo por encima. Se agitan durante unos minutos. La grasa se debe haber disuelto en el hexano pasando éste a tener un color amarillo fuerte. Se deja reposar unos minutos y se desecha el hexano. La extracción se repite varias veces hasta que el hexano utilizado sea casi incoloro. La muestra se seca con nitrógeno para eliminar los restos de hexano y quede totalmente seca antes de la extracción de acrilamida.

Procedimiento

El procedimiento de análisis de acrilamida por gases-masas se realizó de acuerdo al método desarrollado por Pittet y col. (2004).

Extracción: se pesan aproximadamente 0,5 g de muestra en tubos de 10 mL y se le añade 5mL de una disolución de acrilamida marcada de 100 ppb en agua destilada, se adicionan 0,25 mL del reactivo Carrez I, 0,25 mL de reactivo Carrez II y 2 mL más de agua destilada y se agitan durante un minuto en el agitator para posteriormente centrifugar a 9000 rpm durante 5 minutos recogiendo el sobrenadante en un matraz aforado de 20 mL; se realizan dos extracciones más sobre la misma muestra añadiendo 5 mL de agua y una vez finalizadas las 3 extracciones se completa con agua destilada hasta el enrase.

Derivatización: A los 20 mL extraídos se le adicionan 1,2 g de KBr, 400 μ L 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 10 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 μ L de trietilamina y se filtra a través de filtros Millipore de 20 μ m.

Análisis cromatográfico: se utilizó el modo de inyección splitless. El programa de Tª 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 Tª de la fuente a 250 °C. Los datos fueron integrados y cuantificados con el software Xcalibur (Thermo Electron Corporation).

Identificación: se realizó mediante la concordancia del tiempo de retención y el espectro de masas. Los iones monitorizados fueron (m/z) 70, 149, y 151 para el 2-bromopropenamida y m/z 110 y 154 para 2-bromo (¹³C₃) propenamida.

Determinación: se realizó por el método del patrón interno utilizando acrilamida marcada ¹³C₃.

Para la curva de calibrado se tomó como ordenada el valor resultante de dividir el área del pico de acrilamida (m/z 149) entre el área del pico del patrón interno (m/z 154) y como abscisa la concentración en ppb de acrilamida en disolución de medida. La ecuación de una curva tipo se muestra a continuación:

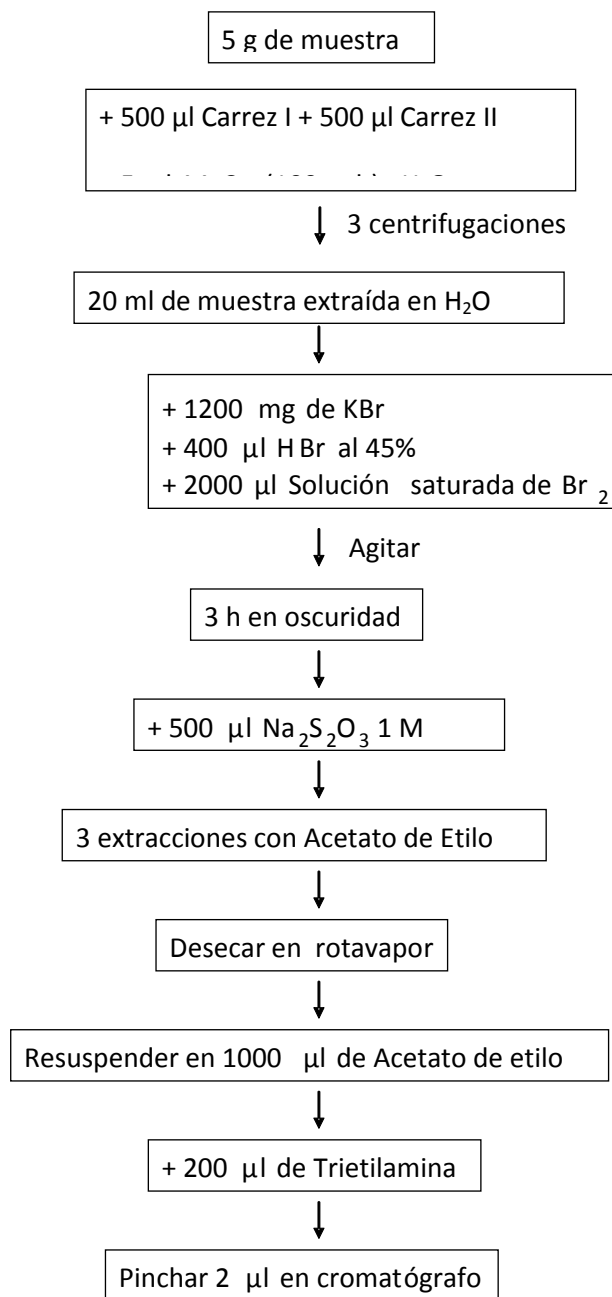
$$Y = 0,009X - 0,028 \quad r^2 = 0,9981$$

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

2.3.4 Análisis de acrilamida en papillas por GC-MS

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.2.3.

El procedimiento seguido fue similar al descrito anteriormente solo que se partió de 5 g de muestra. Un esquema del mismo se muestra en el siguiente esquema:



2.3.5. Análisis de precursores

2.3.5.1. Azúcares

Se realizó por dos procedimientos cromatografía gaseosa con detección de ionización de llama (CG-FID) (glucosa, fructosa y sacarosa) y por volumetría (azúcares reductores).

a. GC-FID

Fundamento

Determinación de los mono y disacáridos mediante cromatografía gaseosa, previa formación de los derivados trimetilsililados de sus oximas.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Baño:selecta
- Cromatógrafo de gases: Autosystem GC (Perkin Elmer) e integrador-computador Perkin-Elmer Nelson con programa 1020.
- Columna cromatográfica: Columna capilar Chrompack CP-SIL 5 CB de 25 m x 0,25 mm y 0,25 µm (Sugelabor).
- Microjeringa graduada: Hamilton-Bonaduz 7002 de 2 µl.
- Rotavapor: Buchi modelo B-480.
- Centrifuga: Centrífuga Sigma 2-16PK Sartorius
- Estufa:selecta

Reactivos

- Alcohol 80º (Sigma)
- Disolución de patrón interno (mioinositol 0,9935% y trehalosa 0,6752% - Sigma) en metanol:agua en proporción 60:40
- Disolución de clorhidrato de hidroxilamina (Panreac) al 5% en piridina (Panreac).
- Hexametildisilazano (Sigma)
- Ácido trifluoroacético (Merck)
- Hexano (Panreac).
- Azucares patrón: glucosa, fructosa y sacarosa (Merck).

Preparación de la muestra

Extracción: Las patatas se pelan y se rallan utilizando un rallador de cocina. Se pesan aproximadamente 10 gramos de muestra y se introducen en tubos de centrifuga. Para

la extracción se añade 40 ml de alcohol de 80°. La extracción se llevó a cabo durante una hora en un baño maría a 80° C y tras centrifugar las muestras para recoger los extractos se realizó una segunda extracción. Se mezclan los dos extractos y se llevan a un volumen final de 100 ml con alcohol de 80°.

Derivatización: El análisis se realizó siguiendo el método de Fernández-Artigas y col. (2001). Se toman 10 ml de extracto de patata, se añade 1 ml de disolución de patrón interno y se deseca completamente en un rotavapor. Se añaden 2 ml de clorhidrato de hidroxilamina y se incuba durante media hora a 75° C. Pasado el tiempo de incubación se toma 1 ml de cada matraz y se transfiere a un tubo de vidrio con tapón de rosca y se generan los trimetilsilil derivados de los azúcares mediante adición de 1 ml de hexametildisilazano y 100 µl de ácido trifluoroacético. A continuación se incuba durante 1 hora a 65° C. Posteriormente se enfría, a cada tubo se añaden 100 µl de hexano para disolver la muestra, se agita y se añade 1ml de agua destilada. Tras agitación y reposo se forman dos capas y se procede al análisis de los derivados contenidos en el hexano (capa orgánica superior).

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 1 µl.
- Temperatura del inyector: 270°C.
- Temperatura del detector: 325°C.
- Detector: detector de ionización de llama (FID).
- Splitt 1:20.
- Flujo del gas portador (N₂): 1,43 ml/min.
- Tiempo de análisis: 50 minutos.
- Programa de temperatura y tiempos: temperatura inicial 180°C, incremento de 2°C/min hasta 206°C y entonces incremento de 10°C/min hasta 300°C donde permanece 30 minutos.

Identificación

La identificación se realizó mediante concordancia con el tiempo de retención de los derivados obtenidos de los patrones y de los diversos azúcares.

Determinación

Se realizó por el método de patrón interno: mioinositol (0,25%) para monosacáridos y trehalosa (0,5%) para disacáridos.

Curvas de calibrado: se realizaron tres curvas de calibrado La curva de calibrado para cada azúcar fueron las siguientes:

GLUCOSA	$Y = 1,5487 X - 0,0879$	$r^2 = 1$
---------	-------------------------	-----------

FRUCTOSA	$Y=1,7145X - 0,047$	$r^2 = 1$
----------	---------------------	-----------

SACAROSA	$Y= 0,816X + 0,0065$	$r^2 = 0,9964.$
----------	----------------------	-----------------

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

b) Volumetría

Fundamento

Titulación con tiosulfato sódico del yodo producido por el sulfato de cobre no reducido por los azúcares presentes en la muestra los azúcares reductores presentes en la muestra.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200
- Matraz Erlenmeyer de 250 ml
- Perlas de vidrio
- Mechero Bunsen
- Bureta

Reactivos

- Disolución de tiosulfato sódico 0,1N: 24,82 g de tiosulfato sódico pentahidratado (Panreac) y 3,8 g de borato sódico decahidratado (Albus) disueltos en 1L de agua desionizada.
- Disolución de ácido sulfúrico 10N (Panreac).
- Disolución de yoduro potásico al 30%(Panreac).
- Fehling A: 34,64 g sulfato de cobre pentahidratado (Probus) en 500 ml de agua desionizada.
- Fehling B: 173 g tartrato sódico-potásico tetrahidratado (Panreac) y 50 g hidróxido sódico (Panreac) disueltos en 500ml de agua desionizada.
- Disolución de almidón (Panreac) soluble
- Glucosa anhidra (Sigma)

Preparación de la muestra

Extracción: la extracción de azúcares se lleva a cabo como se ha explicado anteriormente para el apartado 2.2.5.1.a) (GC-FID).

Procedimiento

Se toman 20 ml de extracto de patata obtenido anteriormente y se llevan a un matraz enrlenmeyer de 250 ml. Se añaden 10 ml de Fehling A, 10 ml de Fehling B, 10 ml de agua desionizada y 2-3 perlas de vidrio. La mezcla se lleva a ebullición en un mechero Bunsen y se deja hervir durante 2 minutos. A continuación se enfría rápidamente en un baño de hielo, y cuando esté frío se adicionan 10 ml de yoduro potásico al 30%, 10 ml del ácido sulfúrico 10N y unas gotas de almidón. La valoración se realiza con tiosulfato sódico 0,1N. La muestra blanco se realiza con 20 ml de alcohol de 80º en lugar de los 20 ml de extracto.

La curva de calibrado utilizada fue realizada utilizando glucosa anhidra y fue la siguiente:

$$Y = 0,0036 X + 0,0007 \quad r^2 = 0,9975.$$

2.3.5.2. Aminoácidos

Se realizaron por dos procedimientos HPLC (donde se determinaba el aminoácido asparragina) y por volumetría donde se medían aminoácidos totales.

a) HPLC

Fundamento

Determinación de asparragina por HPLC tras formación de un derivado fluorescente.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo Varian Prostar, bomba Varian Prostar modelo 230, detector de fluorescencia Varian Prostar modelo 363, válvula de columna Varian Prostar modelo 500.
- Columna Phenomenex C18(2) 5µm 150x4,60 (Jasco).
- Microjeringa marca Hamilton de 25 µl.

Reactivos

- Tampón fosfato pH 7,2: 2,34 g de fosfato monosódico dihidratado (Probus) y 2,13 g de fosfato disódico (Probus) disueltos en 1L de agua milliQ.
- Tampón borato 0,4M pH 9,5: 3,814 g de borato sódico decahidratado (Probus) disuelto en 100 ml de agua milliQ
- OPA: 50 mg de reactivo o-phtaldialdehido (Sigma), 1 ml de metanol, 3 ml tampón borato 0,4 M pH 9,5, 50 µl de mercaptoetanol (Aldrich) y 2 ml de tampón borato. La mezcla se utiliza diluida a la mitad con tampón borato.
- Eluyente: tampón fosfato pH 7,2 (A) y acetonitrilo (B) (Sigma).

Preparación de la muestra

Extracción: Las patatas se pelan y se rallan como en el procedimiento anterior. Se pesan aproximadamente 10 gramos de muestra y se introducen en tubos de centrifuga. Para la extracción se añaden 40 ml de alcohol de 33°. La extracción se llevó a cabo durante una hora a temperatura ambiente y tras centrifugar las muestras para recoger los extractos se realizó una segunda extracción. Se mezclan los dos extractos y se llevan a un volumen final de 100 ml con alcohol de 33°.

Derivatización: A 200 µl de muestra se añaden 400 µl de tampón borato y 50 µl de OPA. Inyectar exactamente a los 5 minutos.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 20 µl.
- Flujo: 1 ml/min.
- Rampa de elución (tabla adjunta)
- Longitud de onda de excitación 345 nm y de emisión 415 nm.
- Tiempo de análisis: 55 minutos.

Rampa de elución de asparragina

Tiempo (minutos)	% A	% B
0-10	85	15
10-15	84	16
15-20	80	20
20-25	75	25
25-30	65	35
30-35	50	50
35-43	30	70
43-55	85	15

Identificación

La identificación se realizó mediante concordancia con el tiempo de retención del derivado fluorescente de la asparragina.

Determinación

La cuantificación se realizó por estándar externo utilizando la siguiente curva de calibrado (intervalo 0.02432-0.551 µg de asparragina),

$$Y = 5737X + 2,5753 \quad r^2=0.9991$$

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

b) Volumetría

Fundamento

Determinación de aminoácidos totales por volumetría ácido-base previo bloqueo del grupo amino con formaldehído.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- Matraz Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Erlenmeyer de 50 ml
- Bureta

Reactivos

- Fenolftaleína (Panreac)
- NaOH 0,01N (Panreac)
- Formaldehído (Albus)

Preparación de la muestra

Extracción: la extracción de aminoácidos totales se lleva a cabo como en apartado anterior se ha explicado anteriormente para el apartado 2.2.5.2.a (análisis de asparragina por HPLC).

Procedimiento

Se toman 10 ml de muestra y se añaden unas gotas de fenolftaleína. Añadir NaOH hasta obtener un ligero tinte rosa. Se toman 5 ml de formol y se sigue el mismo procedimiento. Una vez neutralizadas las dos disoluciones éstas se mezclan. El color

rosado debe desaparecer. Valorar con NaOH 0,01N hasta que la mezcla adquiera color rosado nuevamente. (Peso molecular de la asparragina: 132,13)

2.3.6. Color

Fundamento

Medida de los parámetros colorimétricos L^* , a^* y b^* , utilizados como sistema de medida oficial de la Comisión Internacional de Eclairage (CIE).

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.1.2.

Instrumental

- -Colorímetro KonicaMinolta modelo CM-3500d

Preparación de la muestra

Se siguió el método de Pedreschi y col. (2005; 2006). Se toman aproximadamente 3g de patata y se extienden sobre una placa de vidrio. La placa se coloca sobre la lente del colorímetro y se toman 3 medidas en 3 zonas diferentes de la superficie de la placa. Los datos fueron procesados con el programa informático Spectramagic NX.

2.3.7. Furosina

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del ϵ -N-furoilmetil-L-lisina (furosina) generada mediante hidrólisis ácida.

Muestras

Se analizaron las muestras recogidas en el apartado 2.1.2.2 y 2.1.2.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución: Waters 600 con detector UV/VIS Konic 200. Inyector manual y programa informático de cálculo Star Chromatography WorkStation Version 6. Varian
- Columna cromatográfica: C8. Furosine-dedicated (250 x 4,60 mm i.d.). (Alltech).
- Cartuchos de extracción en fase sólida: Sep-pack C18 (Millipore).
- Horno Pasteur: Selecta.
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 μm
- Tubos pyrex de 19 cm de altura y 1 cm de diámetro con tapón de rosca y junta de teflón (Sugelabor).
- Baño de agua: Selecta.

Reactivos

- Furosina patrón del 74,4% de pureza (Neosystem laboratoires).
- Metanol para HPLC (Panreac).
- Ácido clorhídrico 7,95 M y 3 M (Panreac).
- Ácido acético glacial para HPLC (Panreac).
- Cloruro potásico (Panreac).
- Eluyente A: disolución ácido acético 0.4% (V/V).
- Eluyente B: cloruro potásico 0.3% en eluyente A (P/V).
- Disolución madre de furosina de 0,744 mg/ml.
- Disolución de calibración: a partir de diluciones obtenidas de la disolución madre de furosina se mezclaron con hidrolizado de harina de trigo para obtener concentraciones de 0,011, 0,016, 0,024, 0,032, 0,048, 0,063, 0,127, 0,191, 0,275, 0,413 y 0,551 μg en los 50 μl inyectados en el cromatógrafo tras purificación.

Preparación de la muestra

Las muestras se dejaron a temperatura ambiente previa a su análisis.

Procedimiento

El análisis de furosina se realizó siguiendo la técnica desarrollada por Guerra-Hernández y Corzo (1996).

Se pesan aproximadamente 180 mg de muestra en un tubo pyrex con tapón de rosca y junta de teflón y se adicionan 6 ml de ácido clorhídrico 7,95 M. Se burbujea nitrógeno durante 2 minutos y se lleva a estufa a 110°C durante 24 horas. El hidrolizado se filtra y 0,5 ml del mismo se pasan a través de un cartucho Seppack C18

previamente acondicionado con 5 ml de metanol y 10 ml de agua. La muestra se eluye con 3 ml de ácido clorhídrico 3 M.

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 50 μ l.
- Flujo: 1,2 ml/min.
- Rampa de elución (tabla adjunta)
- Sensibilidad 0.002 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 280 nm.
- Tiempo de análisis: 32 minutos.
- Temperatura de la columna: 37 °C.

Rampa de elución de furosina.

Tiempo (minutos)	% A	% B
0-13	100	0
13-20	100	0
20-22	50	50
22-23	50	50
23-32	100	0
32	100	0

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de furosina observando el incremento obtenido y concordancia con el tiempo de retención de la furosina patrón.

Determinación

Se realizó por el método de patrón externo. Curva de calibrado: para la construcción de la curva se tomó como ordenada el área del pico de furosina y como

abscisa la cantidad del mismo en μg inyectados. Se abarcó un rango desde 0,0054 hasta 0,551 μg .

$$Y = 4026044,04X + 6172,8 \quad r^2 = 0,9996$$

Todas las muestras fueron analizadas por duplicado de muestra y de inyección.

2.3.8. Determinación de hidroximetilfurfural, furfural y glucosilisomaltol

Fundamento

Determinación por cromatografía líquida de alta resolución del hidroximetilfurfural (HMF), furfural y glucosilisomaltol (GIM) contenido en las muestras previa adición de clarificante y posterior purificación con disolvente orgánico.

Muestras

Se analizaron las muestras recogidas en el apartado 2.1.2.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Cromatógrafo líquido de alta resolución (JASCO): LG-2080-04 Quaternary Gradient Unit, UV-2075 plus Detector, Interface LG-Net II/ADC y el software de cuantificación (ChromPass Chromatography Data System) todo ello acoplado a un inyector automático (Water 717 plus autosampler).
- Columna cromatográfica: Kromasil C₁₈ (5 μm 250 mm x 4,6 mm) (Sugelabor).
- Centrifuga: Universal 320 Hettich Zentrifugen.
- Agitador de tubos: Mixo-tub modelo 30 Grichel.
- Filtros: Millipore de 0,2 y 0,45 μm .
- Rotavapor: Buchi modelo R-114 y B-480.

Reactivos

- Disoluciones clarificantes: Ferrocianuro potásico al 15% (Merck) (Carrez I) y acetato de zinc al 30% (Merck) (Carrez II).
- Eluyente: Acetonitrilo para HPLC (Panreac)-agua desionizada (5:95).
- Disolución madre HMF: 3.57mg/l de 5-hidroximetilfurfural (Merck).
- Disolución madre de furfural: 2320 mg/l de 2-furancarbaldehído (Merck).
- Disolventes orgánicos para purificación y concentración: Triclorometano para HPLC (Panreac).

Preparación de la muestra

Las muestras se dejaron a temperatura ambiente previa a su análisis.

Procedimiento

El análisis se realizó mediante la técnica desarrollada por Guerra Hernández y col., (1992) Y García-Villanova y col., (1993) para la determinación de HMF en cereales infantiles y cereales de desayuno incluyendo algunas modificaciones.

Extracción

Se depositan aproximadamente 0,6 gramos de muestra en tubos de centrífuga de 10 ml, se adicionan 5 ml de agua desionizada y 500 µl de solución clarificante Carrez I y 500 µl de Carrez II, tras lo cual se agitan en agitador de tubos durante 2 minutos. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 9000 rpm y se separa el sobrenadante, que se lleva a un matraz aforado de 10 ml.

Se adicionan 3 ml de agua desionizada al precipitado, homogeneizándolo con la ayuda de una varilla de vidrio, se agita durante 2 minutos y se centrifuga de la misma forma que la vez anterior. Se recoge el sobrenadante junto al otro y se repite este procedimiento una vez más. Los tres sobrenadantes obtenidos se llevan a 10 ml y se filtran a través de un filtro de 0,2 µm antes de inyectar.

Purificación y concentración

Se depositan los 10 ml extraídos en una ampolla de decantación, se le adicionan 10 ml de triclorometano y se agita manualmente durante 30 segundos, tras lo cual se recoge la fase inferior (fase orgánica) y se repite la extracción 9 veces más. Tras recoger todas las fases orgánicas se adicionan 4 ml de agua desionizada y se elimina en rotavapor todo el disolvente orgánico (2 minutos, 50°C). Por último se filtra la fase acuosa a través de un filtro de 0.2 µm antes del análisis cromatográfico. Por otra parte la fase inorgánica resultante de completar la purificación es la utilizada para la determinación de GIM tras su paso por un filtro de 0.2 µm antes del análisis cromatográfico

Análisis cromatográfico

- Volumen inyectado: 20 µl.
- Flujo: 1 ml/min.
- Condiciones isocráticas.
- Temperatura: 25°C.
- Sensibilidad: 0,01 AUFS.
- Longitud de onda del detector: 280 nm.
- Tiempo de análisis: 20 minutos.

Identificación

Se realizó mediante la adición de patrón de HMF y furfural, observando el incremento obtenido y la concordancia con el espectro del compuesto puro y el tiempo de retención.

Determinación

Se utilizó el método de estándar externo.

Curvas de calibrado: se realizaron varias curvas de calibrado para cubrir el intervalo de concentraciones de HMF (0,1 mg/l hasta 1,0 mg/l) y de furfural (0,021 mg/l hasta 0,1 mg/l) en muestras. Se tomó como ordenada la altura del pico de HMF/furfural/GIM y como abscisa la concentración del mismo en mg/l. Para la cuantificación del GIM se utilizó la misma curva que para el HMF.

Las ecuaciones obtenidas fueron las siguientes:

Para HMF	$Y = 4,9115X - 0,0438$	$r^2 = 0,9988$
----------	------------------------	----------------

Para Furfural	$Y = 5,9006X - 0,0050$	$r^2 = 0,9970$
---------------	------------------------	----------------

2.3.9. Determinación de productos finales de pardeamiento

Fundamento

Determinación de la fluorescencia de muestras extraídas con agua.

Muestras

Se analizaron algunas de las muestras recogidas en el apartado 2.1.2.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Lector de fluorescencia FLUOstar Omega BMG Labtech (longitud de excitación de 360 nm y 460 nm de emisión)
- Centrifuga: Universal 320 Hettich Zentrifugen.
- Agitador de tubos: Mixo-tub modelo 30 GriceL.
- Filtros: Millipore de 0,2 μm .

Reactivos

- Agua milli Q

Preparación de la muestra

Las muestras se dejaron a temperatura ambiente previa a su análisis.

Procedimiento

El análisis se realizó mediante la técnica desarrollada por Raposeiras-Roubín y col. (2011) con algunas modificaciones.

Extracción

Se depositan aproximadamente 1 gramos de muestra en tubos de centrifuga de 10 ml, se adicionan 5 ml de agua desionizada y se agitan en agitador de tubos durante 2 minutos. Las muestras se centrifugan durante 10 minutos a 9000 rpm y se separa el sobrenadante, que se lleva a un matraz aforado de 10 ml.

Se adicionan 3 ml de agua desionizada al precipitado, homogeneizándolo con la ayuda de una varilla de vidrio, se agita durante 2 minutos y se centrifuga de la misma forma que la vez anterior. Se recoge el sobrenadante junto al otro y se repite este procedimiento una vez más. Los tres sobrenadantes obtenidos se llevan a 10 ml y se filtran a través de un filtro de 0,2 μm antes de efectuar la medida

Expresión de los resultados

Se expresa en unidades relativas de fluorescencia (URF) y cada medida es la media de tres determinaciones y tres extracciones por muestra

2.3.10. Análisis complementarios

2.3.10.1. Determinación de extracto seco

Fundamento

Determinación gravimétrica del residuo seco, expresado en porcentaje en peso, obtenido a partir de una cantidad conocida de muestra.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en los apartados: 2.1.1.2, 2.1.2.1 y 2.1.2.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Horno Pasteur: Selecta.

- Pesa-sustancias de vidrio de 2 cm de altura y de 6 cm de diámetro.
- Desecador de vidrio con sílica-gel bajo placa de porcelana.

Procedimiento

El análisis de las muestras se realizó siguiendo los métodos 925.10 y 984.25 de la AOAC (1990)

Secar el pesa-sustancias a 102°C durante 30 minutos, colocar el pesa-sustancias tapado en un desecador, dejarlo enfriar y pesarlo. Poner 1,5 g de muestra e introducir en estufa a 103°C durante 5-12 horas, enfriar en desecador y pesar. Repetir la operación hasta que la diferencia entre dos pesadas consecutivas no sea mayor de 0,5 mg.

Cálculos

Contenido en extracto seco % = $(P - P' / P) \times 100$

P' = Peso en gramos de la muestra tras la desecación.

P = Peso en gramos de la muestra antes de la desecación.

2.3.10.2 Determinación de grasa

Fundamento

Determinación gravimétrica del residuo, expresado en porcentaje en peso, tras extracción con hexano de las muestras.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en los apartados: 2.1.1.2; 2.1.1.3; 2.1.2.1 y 2.1.2.2.

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Tubos de 5mL

Procedimiento

Se introduce una cantidad de muestra en un tubo de 5 ml y se anota el peso. Se cubre la muestra con hexano y se agita vigorosamente un par de minutos. La grasa se disuelve en el hexano y éste adquiere un color amarillo fuerte. Se desecha el hexano y se repite la operación varias veces hasta que el hexano queda incoloro después de agitar. La muestra se seca completamente con nitrógeno. Se vuelve a tomar nota del peso. La diferencia entre el la primera pesada y la última corresponde a la grasa.

Cálculos

$$\text{Grasa \%} = (P - P' / P) \times 100$$

P= Peso en gramos de la muestra

P'=Peso en gramos de la muestras tras extracción con hexano

2.3.10.3. Determinación de proteínas

Fundamento

El contenido en proteína es el resultado de multiplicar el contenido en nitrógeno, determinado por el método Kjeldahl, por un factor de transformación del nitrógeno en proteína para papillas y harinas de cereales.

Muestras

Se analizaron las muestras descritas en el apartado 2.1.2.2 y 2.1.2.3

Instrumental

- Balanza digital: Mettler modelo AE 200.
- Aparato Kjeldahl: Büchi modelo B-316.
- Placa calefactora: Bloc Digest 12 (Selecta)
- Tubos Kjeldhal de 300 ml.

Reactivos

- Catalizador: 100 g de sulfato potásico (Merck), 6 g de sulfato de cobre (Merck) y 1 g de selenio (Merck) triturados y homogeneizados.
- Ácido sulfúrico concentrado (Panreac).
- Disolución de hidróxido sódico al 33% (p/v) (Panreac).
- Disolución titulante: ácido clorhídrico 0,100 N (Merck).
- Indicador Shiro-Tashiro: 0,2 g de rojo de metilo (Merck) y 0,1 g de azul de metileno (diluidos ambos en 100 ml de etanol al 95%).
- Disolución de ácido bórico al 4% (Panreac).

Preparación de la muestra

Las muestras fueron descongeladas previo análisis a temperatura ambiente.

Procedimiento

El análisis de las muestras se realizó siguiendo el método nº 920.87 de la Asociación Oficial de Analistas Químicos (AOAC, 1990).

Se depositan alrededor de 3 g de muestra en un tubo de digestión y se añaden 2 g de catalizador, 50 ml de H₂SO₄ concentrado y unas perlas de vidrio. Se mezcla suavemente y se lleva a la placa calefactora donde se realiza la digestión durante 30 minutos a 200°C, 90 minutos a 400°C y 30 minutos en extracción de vapores. Se deja enfriar y se añaden 50 ml de agua

En un erlenmeyer de 250 ml se añaden 50 ml de ácido bórico al 4% y unas gotas de indicador. Se ajusta el tubo Kjeldhal al aparato de destilación y se añaden NaOH al 33% hasta cambio de color y se procede a su destilación en vapor de agua durante 6 minutos. Se recogen 250 ml de destilado y se valora con ácido clorhídrico 0.100 N. Se efectúa una prueba en blanco.

Cálculos

$$\% \text{ Nitrógeno} = (V \times 0,100 \times 1,4)/P$$

V = ml de HCL 0,100 N gastados en la valoración menos los mL gastados en la prueba en blanco.

P = peso de la muestra en gramos

$$\% \text{ Proteínas} = \%N \times F$$

F= 5.7, excepto para las muestras de arroz que fue de 5,95

2.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico se realizó empleando el programa SPSS Statistics 20 (licencia de la Universidad de Granada). Todos los indicadores analizados presentaron una distribución normal, bien “per se” o después de su transformación a logaritmo neperiano. Para comparar diferencias estadísticas entre tratamientos y muestras se realizaron análisis de t de Student y ANOVA en una vía. Para comprobar correlaciones se utilizó un análisis de regresión de Pearson (r). Se estableció una $p < 0,05$ para dar los valores como significativos.

2.RESULTADOS

3.- RESULTADOS

3.1 Patatas

3.1.1 Análisis de precursores en patatas crudas: azúcares reductores y aminoácidos

3.1.1.1. Puesta a punto de los métodos

Los estudios de extracción de azúcares reductores, aminoácidos totales en medio acuoso y azúcares individuales determinados por cromatografía gaseosa (CG) se muestran en las tablas 3.1 y 3.2.

Tabla 3.1 Contenido en azúcares reductores y aminoácidos (g/100g de peso fresco) según nº extracciones

Nº extracciones	Azúcares reductores (%)	Aminoácidos totales (%)
1	0,33	0,56
2	0,71	0,70
3	0,73	0,71

Tabla 3.2 Porcentaje de azúcares individuales y total obtenido en cada extracción por CG

Azúcar	1ª ext. (%)	2ª ext. (%)	3ª ext. (%)	Total (%)
Fructosa	0,38	0,05	0,017	0,45
Glucosa	0,46	0,05	0,016	0,53
Sacarosa	0,36	0,05	0,012	0,42

La tabla 3.3 muestra el porcentaje de extracción obtenida para los aminoácidos totales, expresado como asparragina, con diferentes concentraciones de etanol.

Tabla 3.3 Porcentaje de aminoácidos totales (g/100g de peso fresco) con etanol de diferente graduación

Medio de extracción	Agua destilada	Alcohol 33º	Alcohol 64º	Alcohol 80º
Aminoácidos (%)	0,41	0,54	0,35	0,15

3.1.1.2 Determinación en muestras

La tabla 3.4 recoge el porcentaje de precursores de acrilamida obtenido en las diferentes variedades de patata estudiadas.

Tabla 3.4 Precursores de acrilamida (g/100 g peso fresco) en patatas

Variedad	Azúcares reductores (volumétrica)	Glucosa (GC)	Fructosa (GC)	Sacarosa (GC)	Azúcares reductores (glucosa y fructosa)	Aminoácidos totales (volumétrica)	Asparragina (HPLC)
Monalisa	1,46	1,23	0,78	0,27	2,01	1,03	0,16
Bintje	0,43	0,28	0,27	0,45	0,55	0,99	0,13
Agata	0,95	0,75	0,90	0,30	1,65	1,41	0,17
Red pontiac	1,25	0,81	0,78	0,26	1,59	0,93	0,15
Fabula	nd	0,56	0,39	0,97	0,96	nd	0,98
Desiree	0,41	0,22	0,18	0,35	0,40	0,61	nd
Malaga	nd	0,32	0,25	0,25	0,57	nd	nd
Elodie	0,48	0,35	0,31	1	0,66	0,78	nd
Frisia	0,23	0,07	0,06	0,59	0,13	0,48	nd

nd=no determinado

3.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés

3.1.2.1 Contenido de precursores tras los diferentes tratamientos de remojo

La tabla 3.5 recoge el contenido de glucosa, fructosa y asparragina tras el remojo de las patatas a 22°C y 100°C en agua destilada, bisulfito sódico, ácido cítrico y bicarbonato sódico. Y tras tratamiento con ácido ascórbico a 22°C.

Tabla 3.5 Contenido de precursores, expresados en %, en los distintos tratamientos de remojo

Tratamiento	Glucosa		Fructosa		Azúcares totales		Asparragina	
	22º	100º	22º	100º	22º	100º	22º	100º
Agua destilada	0,72	0,47	0,41	0,30	1,13	0,76	0,91	0,89
Bisulfito sódico	0,79	0,37	0,41	0,23	1,20	0,60	1,14	0,82
Ácido cítrico	0,81	0,97	0,49	0,61	1,30	1,58	0,73	0,85
Bicarbonato sódico	0,58	1,04	0,35	0,68	0,93	1,69	1,05	0,65
Ácido ascórbico	0,84		0,60		1,45		0,77	

3.1.2.2 Distribución de azúcares en la patata

La tabla 3.6 muestra la distribución de azúcares en las capas exterior, intermedia y central de la variedad Málaga.

Tabla 3.6 Distribución de azúcares en patata

	% glucosa	% fructosa	% sacarosa	% AR
Capa externa	0,49	0,36	0,37	0,86
Capa intermedia	0,25	0,21	0,12	0,46
Centro	0,21	0,19	0,07	0,40

3.1.2.3 Contenido de azúcares reductores en patatas fritas

La tabla 3.7 muestra los resultados de azúcares reductores obtenidos tras fritura de las patatas a 170°C y 190°C después de los diferentes remojos realizados.

Tabla 3.7 Contenido de azúcares reductores (g/100 g de peso fresco) según tratamientos y temperatura de fritura

Muestra	170°	190°
Blanching	0,35	0,32
Agua fría	0,31	0,25
Bisulfito blanching	0,35	0,34
Bisulfito frío	0,20	0,19
Cítrico blanching	0,35	0,34
Cítrico frío	0,38	0,41
Bicarbonato blanching	0,42	0,48
Bicarbonato frío	0,41	0,26
Ascórbico frío	0,37	0,44

3.1.2.4 Determinación de acrilamida en patatas fritas tipo francés tras los diferentes remojos

La tabla 3.8 muestra los resultados de acrilamida obtenidos tras fritura de las patatas a 170°C y 190°C después de los diferentes remojos realizados.

Tabla 3.8 Contenido de acrilamida en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en peso fresco según tratamientos y temperatura de fritura

Muestra	170°	190°
Blanching	503±124	917 ± 204
Agua fría	587 ± 114	1018 ± 65,1
Bisulfito blanching	254 ± 16,6	498 ± 136
Bisulfito frío	309 ± 61,2	556±137
Cítrico blanching	371±84,0	661± 174
Cítrico frío	326 ±10,1	487± 50,2
Bicarbonato blanching	737 ±217	693±256
Bicarbonato frío	412±109	661±104
Ascórbico frío	417±49,9	624±168

3.1.2.5 Determinación de color en patatas fritas tipo francés tras los diferentes remojes

Los resultados de los parámetros de color obtenidos en las patatas fritas tras diferentes remojes se observan en las tablas 3.9 y 3.10.

Tabla 3.9 Parámetros L, a y b obtenidos tras fritura a 170 y 190° C

	170°	190°	170°	190°	170°	190°
Muestra	L	L	a	a	b	b
No procesada	69,4	64,5	0,9	3,3	25,3	27,6
Blanching	69,4	67,7	3,5	3,1	27,1	26,1
Agua fría	68,1	63,0	3,6	5,5	26,8	27,6
Bisulfito blanching	77,6	76,3	-1,0	-1,0	27,6	28,0
Bisulfito frío	74,7	73,0	-0,7	0,7	29,0	30,4
Cítrico blanching	72,6	65,0	2,2	4,8	25,1	26,7
Cítrico frío	72,1	63,7	2,2	4,0	25,9	26,8
Bicarbonato blanching	65,5	59,3	4,0	4,6	27,2	25,6
Bicarbonato frío	64,9	59,7	2,2	4,1	25,8	26,0
Ascórbico frío	66,6	62,8	3,0	4,7	26,8	27,4

Tabla 3.10 Parámetros h y Yellow index (YI) obtenidos tras fritura a 170 y 190° C

	170°	190°	170°	190°
Muestra	h	h	YI	YI
No procesada	1,7	0,5	4022,8	1183,5
Blanching	0,4	0,5	1100,9	1202,1
Agua fría	0,4	0,3	1070,6	720,3
Bisulfito blanching	-1,5	-1,6	-3811,5	-4069,7
Bisulfito frío	-2,1	2,1	-5741,5	5962,4
Cítrico blanching	0,7	0,3	1609,6	795,8
Cítrico frío	0,7	0,4	1649,8	964,2
Bicarbonato blanching	0,4	0,3	982,9	791,4
Bicarbonato frío	0,7	0,4	1678,7	901,7
Ascórbico frío	0,5	0,3	1266,2	839,1

3.1.2.6 Preparación de patatas fritas caseras

Las tablas 3.11 a 3.19 muestran los resultados de las encuestas sobre la forma de preparación y consumo de patatas fritas en 256 personas que cocinan de forma casera este tipo de alimento de forma habitual.

Tabla 3.11 Sexo de los encuestados

Sexo	Mujeres	Hombres
Personas	181	75

Tabla 3.12 Edad de los encuestados (años).

Edad	<25	25 - 50	51 - 65	> 65
Personas	48	143	41	24

Tabla 3.13 Número de personas para las que cocina (número de comensales)

Número de comensales	1	2	3	4	5	>5
Personas	46	74	41	59	26	10

Tabla 3.14 Frecuencia de consumo de patatas fritas a la semana (días/semana).

Días	uno	Dos	tres	cuatro	cinco	seis	siete
Personas	95	84	61	8	5	3	0

Tabla 3.15 Tipo de patatas que compra

Tipo	freír	nuevas	viejas	no selecciono
Personas	54	118	8	76

Tabla 3.16 Remojo de la patata cruda

Remojo	enteras	cortadas	no
Personas	23	51	182

Tabla 3.17 Tiempo que las deja en remojo (minutos)

Tiempo	< 30 min	30 - 60 min	> 60 min
Personas	210	36	10

Tabla 3.18 Modo de fritura

Modo	freidora	sartén
Personas	79	177

Tabla 3.19 Punto de fritura.

Fritura	poco fritas	normales	muy fritas
Personas	23	182	51

3.1.3 Determinación de acrilamida en patatas tipo chips

La tabla 3.20 recoge los datos obtenidos de las 10 muestras de patatas fritas de la modalidad “chips” obtenidas en distintos supermercados y freidurías caseras.

Tabla 3.20 Contenido de acrilamida en $\mu\text{g}/\text{kg}$ en peso fresco en patata “chips”

Origen	Marca	$\mu\text{g}/\text{kg}$ AA
Freiduría	Freiduría Barrio	733 \pm 47
	Freiduría centro	869 \pm 63
Industriales	Industrial 1	1048 \pm 168
	Industrial 2	1490 \pm 199
Locales	Local 1	1641 \pm 268
	Local 2	2181 \pm 245
	Local 3	825 \pm 62
	Local 4 (lote 36/1)	2366 \pm 181
	Local 4 (lote 34/1)	931 \pm 155
	Local 4 (lote 30/59)	1080 \pm 74

3.2 Cereales

3.2.1 Determinación de acrilamida en rebozados con harina y pan rallado.

La tabla 3.21 recoge el contenido de acrilamida obtenido en el estudio de rebozados realizado con harina de trigo, garbanzos, arroz y trigo-maíz.

Tabla 3.21 Contenido de acrilamida en rebozados expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco

Tipo harina	Tratamiento	$\mu\text{g}/\text{kg}$
Trigo	Sola	494 \pm 17,8
	Agua	368 \pm 15,8
	Leche	196 \pm 7,97
	Huevo	122 \pm 7,43
Garbanzos	Agua	169 \pm 6,22
	Leche	140 \pm 4,55
	Huevo	99 \pm 5,08
Arroz	Agua	235 \pm 2,52
	Leche	177 \pm 4,53
	Huevo	119 \pm 5,97
Tempura (trigo-maíz)	Agua	280 \pm 14,3
	Leche	246 \pm 3,64
	Huevo	127 \pm 5,37

La tabla 3.22 muestra el contenido de acrilamida obtenido en el estudio de empanados con pan rallado de grano fino y de grano grueso.

- Pan rallado grano grueso: pan rallado natural elaborado con harina de trigo, agua, gluten de trigo, sal, grasa vegetal, azúcar, levadura, emulgente y colorante.
- Pan rallado grano fino: harina de trigo, agua, sal y levadura.

Tabla 3.22 Contenido de acrilamida en empanado expresado en $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso fresco

Pan	Tratamiento	$\mu\text{g}/\text{kg}$
Pan rallado grano grueso	Huevo + pan	219 \pm 14,7
	Harina + huevo + pan	303 \pm 3,44
Pan rallado grano fino	Huevo + pan	49,7 \pm 1,57
	Harina + huevo + pan	138 \pm 4,25

3.2.2 Determinación de acrilamida y furosina en harinas y papillas de cereales infantiles

La tabla 3.23 muestra el contenido de acrilamida, furosina y porcentaje de proteínas de las harinas tostadas y papillas infantiles obtenidos de una industria procesadora.

Tabla 3.23 Furosina y acrilamida en papillas de cereales

Nº	Muestras	% proteína	Furosina (mg/100 g de proteína)	Acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$)
	Harinas crudas			
1-8	Trigo, sorgo, avena, mijo, arroz, cebada, centeno y maíz		ND	ND
	Harinas tostadas			
1	GHE	4,42	34,6 \pm 10,8	ND
2	Arroz	5,45	14,8 \pm 0,15	ND
3	Multicereales	6,70	19,8 \pm 1,19	ND
4	Semolina	11,15	18,7 \pm 2,64	ND
5	Sin gluten buenas noches	6,79	27,4 \pm 0,75	ND
6	Sin gluten	6,87	11,5 \pm 3,04	ND
	Papillas			
1	Cereales sin gluten (A)	6,25	325 \pm 5,93	ND
2	Cereales sin gluten (B)	5,14	342 \pm 34, 5	ND

3	Cereales sin gluten (C)	6,14	505 ± 16,4	ND
4	Cereales sin gluten+ FOS (D)	5,58	265 ± 4,74	ND
5	Baby colazione cereales vanigli sin gluten (E)	5,69	417 ± 53,54	ND
6	8 cereales gluten	5,59	170 ± 27,64	2,25±0,2
7	8 cereales miel (A)	7,00	776 ± 9,58	ND
8	8 cereales miel (B)	6,73	1193 ± 58,6	9,20±0,07
9	8 cereales miel + FOS (C)	6,20	220 ± 21,6	ND
10	Baby colazione 5 cereales con gluten	7,00	361 ± 19,3	ND
11	Multicereales (A)	6,70	716 ± 21,6	ND
12	Multicereales (B)	6,36	895 ± 75,4	9,60±1,35
13	Multicereales + FOS (C)	5,99	164 ± 4,89	0,22 (<LQ)
14	Cereales y fruta	5,49	894 ± 43,5	0,33 (<LQ)
15	Multifrutas	6,30	409 ± 12,89	ND
16	Cereales cacao (A)	7,74	766 ± 58,8	ND
17	Cereales cacao (B)	7,71	123 ± 7,88	ND
18	Arroz	5,74	783 ± 17,3	ND
19	Trigo- arroz	6,16	661 ± 19,0	ND
20	Maiz- tapioca	11,65	122 ± 3,65	ND
21	Papillas cremosa (A)	13,12	320 ± 9,77	ND
22	Milk free porridge (B)	10,38	426 ± 44,3	ND
23	Papillas con galleta	24,35	230 ± 9,33	2,42±0,02

ND: no detectado. LQ: límite de cuantificación

La tabla 3.24 muestra el contenido de acrilamida, furosina y porcentaje de proteínas de papillas obtendrás en el comercio.

Tabla 3.24 Furosina y acrilamida en papillas de cereales

Muestra	% proteína	Furosina (mg/100 g proteínas)	Acrilamida (µg/kg)
Multicereales (casa A)	8,7	550 ± 12.9	ND
5 cereales (casa B)	9,3	476 ± 21.1	12,1 ± 0,07
8 cereales con miel (casa B)	9,4	523 ± 3.98	ND
Cereales sin gluten (casa B)	7,1	578 ± 16.1	ND
Multicereales (casa C)	9,1	453 ± 17.3	24,9 ± 3,32
8 cereales con miel (casa D)	6,5	256 ± 10.7	ND
Cereales sin gluten (casa D)	4,6	273 ± 3.95	ND
8 cereales (casa E)	8,5	86,9 ± 3.30	ND
Cereales con gluten (casa F)	8,5	99,7 ± 4.27	7,98 ± 1,28

ND: no detectado

3.2.3 Determinación de acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería

La tabla 3.25 recoge la evolución en el contenido de acrilamida e indicadores de pardeamiento (furosina, HMF, furfural, GIM y URF) durante el tostado de 1 a 6 minutos del pan de molde y la tabla 3.26 el contenido de acrilamida obtenido en picatostes de diferente tamaño.

Tabla 3.25 Formación acrilamida e indicadores de pardeamiento durante el tostado⁽¹⁾ de Pan de Molde (valores expresados en producto fresco)

Tiempo de tostado	Humedad (%)	Proteínas (%)	Acrilamida $\mu\text{g}/\text{kg}$	Furosina $\text{mg}/100 \text{ g}$ proteína	HMF mg/kg	Furfural mg/kg	GIM mg/kg	URF
Pan molde	27,2	14,4	9,89 \pm 1,40	90,3 \pm 4,47	0,29 \pm 0,01	0,37 \pm 0,01	0,66 \pm 0,01	65.5 \pm 4.9
t = 1 min	26,3	15,7	-	95,0 \pm 2,18	0,35 \pm 0,01	0,21 \pm 0,01	0,57 \pm 0,04	-
t = 2 min	17,0	15,3	26,5 \pm 3,21	117 \pm 0,28	0,62 \pm 0,01	0,23 \pm 0,01	0,92 \pm 0,04	84.0 \pm 2.8
t = 3 min	12,3	-	40,9 \pm 5,93	-	-	-	-	-
t = 4 min	10,9	15,5	58,5 \pm 5,70	106 \pm 4,68	4,39 \pm 0,13	1,46 \pm 0,02	3,65 \pm 0,12	164 \pm 11.3
t = 5 min	6,00	15,9	73,5 \pm 9,93	73,0 \pm 2,65	15,2 \pm 0,80	3,59 \pm 0,23	5,86 \pm 0,28	370 \pm 11.3
t = 6 min	5,10	15,9	91,0 \pm 10,9	79,8 \pm 0,11	19,8 \pm 0,44	2,59 \pm 0,03	6,73 \pm 0,48	413 \pm 13.4
Pan (Corteza)	-	15,0		124 \pm 3,86	0,35 \pm 0,01	0,38 \pm 0,03	0,98 \pm 0,01	90.5 \pm 7.8

(1) Tostado en tostadora eléctrica con resistencia y ranuras en posición vertical

Tabla 3.26 Contenido de acrilamida en picatostes (producto fresco)

Pan frito	Humedad (%)	Proteínas (%)	Acrilamida $\mu\text{g}/\text{kg}$	Furosina $\text{mg}/100 \text{ g}$ proteína	HMF mg/kg	Furfural mg/kg	GIM mg/kg
Tamaño (1,5 x 1,5)	0,4	7,3	388 \pm 8,23	11,89 \pm 4,57	39,77 \pm 0,78	9,34 \pm 0,46	9,93 \pm 0,19
Tamaño (2,5 x 2,5)	2,7	7,7	53,9 \pm 2,51	37,81 \pm 0,64	4,83 \pm 0,04	2,07 \pm 0,13	4,06 \pm 0,16

La tabla 3.27 recoge la evolución en el contenido de acrilamida e indicadores de pardeamiento (furosina, HMF, furfural y GIM) en productos de bollería.

Tabla 3.27 Acrilamida e Indicadores de pardeamiento en productos de bollería con distinta intensidad de horneado (valores expresados en producto fresco)

PRODUCTO	Humedad (%)	Proteínas (%)	Acrilamida (µg/kg)	Furosina mg/100 g proteína	HMF mg/kg	Furfural mg/kg	GIM mg/kg
Caracola (a)	12,4	5,8	48,3 ± 11,31	325±28,9	3,93±0,11	0,18±0,02	1,40±0,01
Caracola (b)	12,5	6,2	27,3 ± 3,45	307±12,0	4,47±0,35	0,28±0,01	1,20±0,03
Palmera mallorquina (a)	4,50	4,4	47,3 ± 4,46	93,9±10,5	60,0±3,69	2,30±0,17	2,09±0,15
Palmera mallorquina (b)	6,30	5,3	15,0 ± 5,51	107±3,04	7,22±0,60	0,19±0,01	0,58±0,04
Palmera (a)	5,50	4,2	32,1 ± 2,28	133±10,5	12,8±0,32	3,62±0,27	2,14±0,04
Palmera (b)	6,20	2,8	19,1 ± 4,34	125±9,45	3,42±0,18	2,61±0,07	0,68±0,02
Media noche (a)	22,2	7,1	28,4 ± 4,03	488±2,79	0,63±0,03	0,46±0,01	0,39±0,02
Media noche (b)	22,7	7,2	24,6 ± 2,77	363±5,55	0,43±0,02	0,30±0,01	0,01±0,00
Suizo grande (a)	18,5	8,1	25,6 ± 9,27	250±4,26	9,59±0,15	0,22±0,02	1,04±0,04
Suizo grande (b)	18,8	6,2	21,4 ± 9,15	306±4,36	2,52±0,13	0,13±0,01	0,07±0,01
Suizo pequeño (a)	19,9	8,4	28,5 ± 4,24	330±7,29	1,54±0,05	4,33±0,17	0,25±0,02
Suizo pequeño (b)	21,1	7,2	29,1 ± 0,43	340±1,63	0,41±0,01	0,57±0,02	0,03±0,00
Hojaldre (a)	2,91	9,3	20,2 ± 1,28	79,8±12,6	5,27±0,24	1,57±0,14	1,17±0,07
Hojaldre (b)	3,62	6,7	26,9 ± 3,8	109±1,58	1,39±0,09	1,50±0,09	0,39±0,03
Escarcha larga	19,8	7,6	30,17 ± 0,15	70,3±4,35	0,95±0,03	0,08±0,00	1,32±0,08
Escarcha redonda	16,5	8,2	28,9 ± 0,54	62,0±3,63	1,13±0,01	0,66±0,02	1,66±0,08
Torta Ines Rosales	4,60	5,2	39,1 ± 5,74	320±16,0	2,82±0,17	0,13±0,00	0,42±0,01

(a) Coloración más intensa

(b) Coloración menos intensa

4. DISCUSIÓN

4.1 Patatas

4.1.1 Precursores de acrilamida en patatas crudas

4.1.1.1 Puesta a punto de métodos

Estudio de recuperación de azúcares

Este estudio se realizó tanto con el método volumétrico como por cromatografía gaseosa utilizando patatas de diferente variedad.

Por el método volumétrico se observó que la cantidad de azúcares recuperadas en dos extracciones con etanol de 80º es casi el doble que las recuperadas en una sola extracción (tabla 3.1). En la tercera extracción se observa un pequeño aumento del 0,02%, lo que significa que en tres extracciones sólo se recupera un 2,8% más de azúcar.

El análisis llevado a cabo por cromatografía de gases nos permite determinar no sólo glucosa y fructosa (azúcares reductores) sino también sacarosa (tabla 3.2). En el estudio de extracciones por separado vemos que en la primera extracción se obtiene la mayor cantidad de azúcares, lo que supone un 85% aproximadamente. En la segunda extracción se obtiene entre un 9 y un 12% más y la cantidad de azúcares recuperados en la tercera sólo supone alrededor de un 3% del total.

Teniendo en cuenta estos resultados se optó por extraer los azúcares de las muestras realizando sólo dos extracciones. La mayoría de los autores usan etanol en una sola extracción (Becalski y col., 2004; Olsson y col., 2004; Ohara-Takada y col., 2005; Wicklund y col., 2006 y Brunton y col., 2007), aunque también se ha utilizado agua (Brierley y col., 1997; Willians, 2005, De Wilde y col., 2005 y 2006) y acetonitrilo (Vivanti y col., 2006).

Estudio de precisión de azúcares

La desviación estándar para el método volumétrico fue de 0,12% (n=7) para una muestra con una media en azúcares reductores de 0,22% (0,22 g/100 g). Las desviaciones obtenidas por el método cromatográfico fueron de 0,13% (n=5) para la glucosa, 0,18% (n=5) para fructosa y 0,03% (n=5) para sacarosa en muestra con un contenido de 0,11%; 0,07% y 0,76% en glucosa, fructosa y sacarosa respectivamente.

Un cromatograma representativo de este estudio se muestra en la figura 4.1.

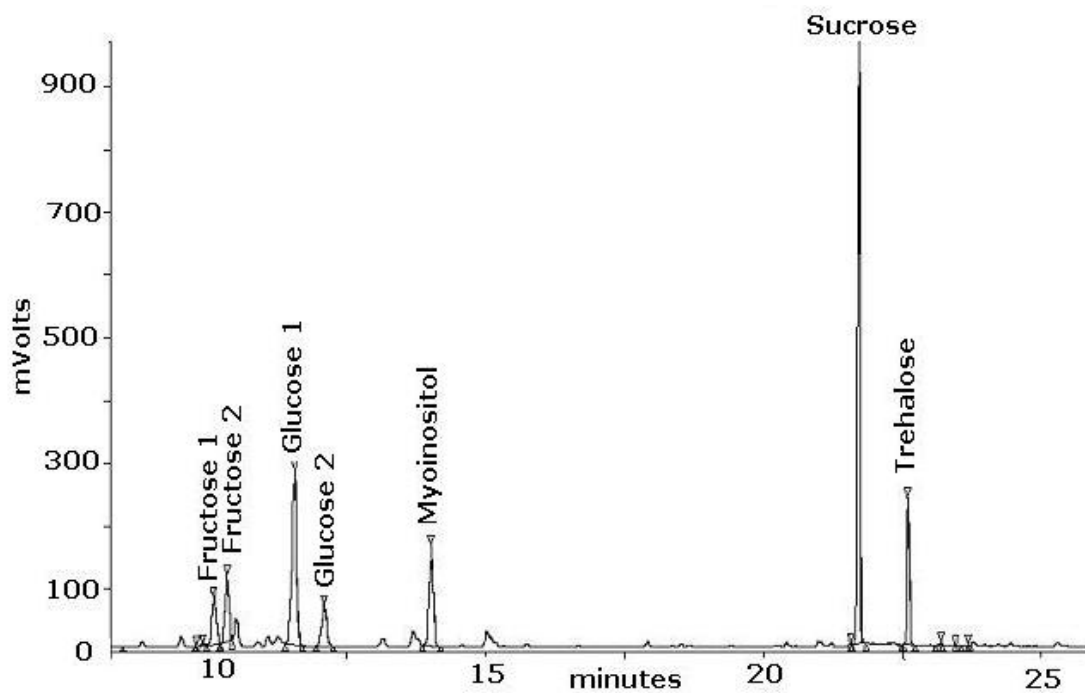


Figura 4.1 Cromatograma representativo de azúcares en patata

Estudio de recuperación de aminoácidos

El estudio de recuperación de aminoácidos se realizó con el método volumétrico. Primero se realizó un estudio de comparación de la cantidad de aminoácidos totales libres obtenidos en una, dos o tres extracciones (tabla 3.1). Observando las cantidades extraídas, se comprueba que es necesario realizar más de una extracción para recuperar la mayor cantidad de aminoácidos posible, con la tercera extracción sólo aumenta un 0,01% la cantidad extraída, lo que supone un 1,4% del total de aminoácidos. A la vista de estos resultados se optó, igual que en el caso de los azúcares, por llevar a cabo sólo dos extracciones.

Aunque los aminoácidos tradicionalmente se extraen con agua, se realizó un estudio de extracción con diferentes disoluciones hidroalcohólicas con objeto de poder determinar aminoácidos partiendo del mismo extracto

utilizado para la determinación de azúcares. Los resultados (tabla 3.3) indican que la mayor extracción de aminoácidos se obtiene utilizando alcohol de 33º, alcanzándose 0,13% más de aminoácidos en el extracto que usando agua destilada, lo que supone un 25% más de extracción. El porcentaje de aminoácidos obtenido con alcohol de 80º es muy bajo, lo que indica que los aminoácidos son insolubles en etanol. Como puede deducirse no se pudo utilizar el mismo método de extracción para azúcares y aminoácidos. Habitualmente solo se utiliza una extracción para la determinación de aminoácidos libres (Brierley y col., 1997; Amrein y col., 2004b; Becalski y col., 2004; Olsson y col., 2004; Ohara-Takada y col., 2005; Willians, 2005, De Wilde y col., 2005 y 2006; Vicklund y col., 2006; Vivanti y col., 2006 y Brunton y col., 2007).

Estudio de precisión de aminoácidos

La desviación estándar para la determinación de aminoácidos libres totales (método volumétrico) fue 0,06% (n=7) para una muestra con un contenido medio de 0,48%. En el caso de la asparragina (HPLC), la desviación fue de 0,13% (n=6) en una muestra con un contenido medio de 0,15%.

La figura 4.2 muestra un cromatograma tipo de este estudio.

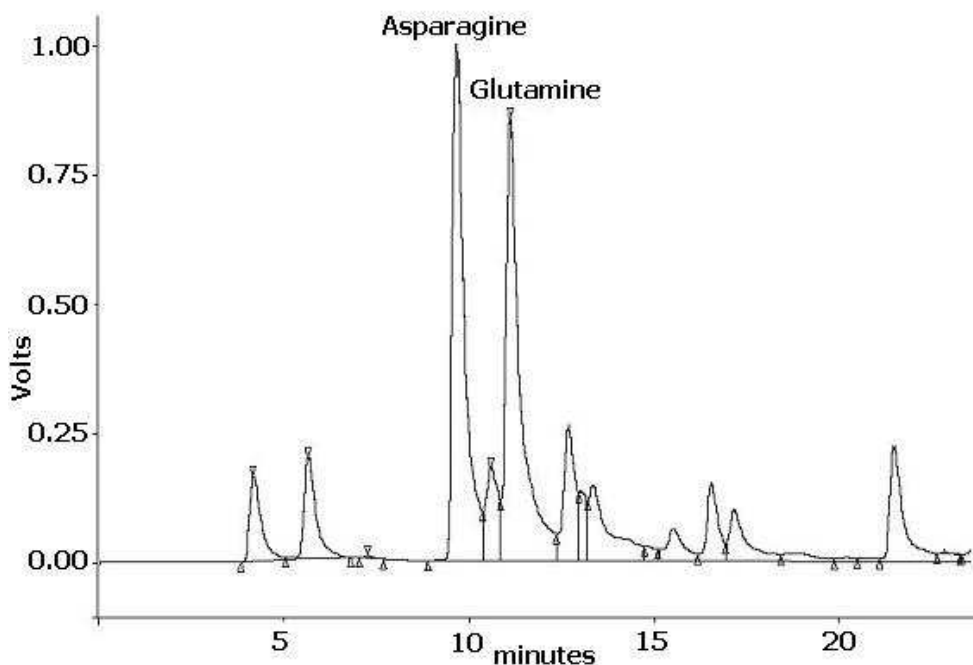


Figura 4.2 Cromatograma tipo de asparragina libre en patata

4.1.1.2 Determinación en muestras

Los bajos coeficientes de variación obtenidos en los métodos permiten su utilización para comprobar diferencias en el contenido de precursores de acrilamida en patatas. Se han estudiado 9 variedades (tabla 3.4) que eran las más comercializadas, en el momento de su recogida, en grandes superficies y negocios locales y por tanto, utilizadas por la población para su uso culinario.

Azúcares reductores

El contenido de azúcares reductores obtenido por ambos métodos partiendo del mismo extracto de patata fue muy diferente (tabla 3.4). El método volumétrico al ser inespecífico puede determinar otros compuestos reductores (entre ellos la vitamina C). Sin embargo puede ser de utilidad como método de medida sensible ya que la correlación obtenida con el método cromatográfico es alta ($R^2=0,9466$).

El nivel medio de glucosa fue de 0,51% y el de fructosa ligeramente inferior 0,44% y están dentro del intervalo recogido para otras variedades (Amrein y col., 2003; Olsson y col., 2004; Vivanti y col., 2006; Brunton y col., 2007, Viklund y col., 2008 y Halford y col., 2012). El valor medio de azúcares reductores (glucosa+fructosa) fue más alto en la variedad *Monalisa* (2%), presentando valores ligeramente inferiores las variedades *Agata* y *Red Pontiac* ($\approx 1,6\%$), a continuación las variedades *Desiree*, *Malaga*, *Bintje* y *Elodie* con valores entre 0,4 y 1%. La variedad Frisia fue la que poseía el menor contenido (0,1%). Las diferencias más elevadas entre variedades fueron de 17 para la glucosa y de 13 para la fructosa, diferencias también encontradas por otros autores para otras variedades y que oscilan entre 5 y 68 veces (Amrein y col., 2003; Vivanti y col., 2006; Viklund y col., 2008 y Halford y col., 2012). Estas diferencias no sólo se deben a la variedad sino también dentro de la misma variedad a los cambios de temperatura, precipitación y condiciones lumínicas de los diferentes años de cultivo que pueden producir valores entre 5 y 6 veces más (Viklund y col., 2008). La fertilización con azufre o nitrógeno (Muttucumar y col., 2013) e incluso la cantidad utilizada de agua de riego son también factores determinantes (Muttucumar y col., 2015). Junto a estos factores no hay que olvidar las condiciones de almacenamiento, temperaturas por debajo de 8-10°C causan un notable incremento en azúcares reductores que son liberados del almidón, produciéndose el conocido endulzamiento por frío (Foot y col., 2007; Granda y col., 2005), este efecto puede minimizarse si las patatas se reacondicionan antes de su uso (Vivanti y col., 2006). Además de la temperatura de almacenamiento, la atmósfera puede tener un efecto sobre los

niveles de azúcares, niveles bajos de oxígeno suprimen la acumulación de azúcar, mientras que un aumento de la concentración de dióxido de carbono tiene el efecto contrario (Kumar y col.,2004)

Aminoácidos

Una correlación alta se obtuvo entre la determinación de aminoácidos libres totales con el método volumétrico (método del formol) y la determinación de asparragina por HPLC ($R^2=0,8981$), por lo que el método volumétrico podría utilizarse como control rutinario del contenido de asparragina al ser un método sencillo y rápido.

El contenido de asparragina (tabla 3.4) fue muy similar en las variedades *Monalisa*, *Bintje*, *Agata* y *Red Pontiac* ($\approx 0,15\%$), siendo muy diferente en la variedad *Fabula* (0,98%). Los valores obtenidos están dentro del intervalo recogido por otros autores (Brierley y col 1997; Amrein y col., 2003 y 2004b, Brunton y col., 2007 y FoodDrinkEurope, 2014) que también observan diferencias hasta de 5 veces en el contenido de este aminoácido, aunque su contenido suele ser menos variable que el de los azúcares reductores. La asparragina es el aminoácido libre dominante en los tubérculos de patata, por lo general representa aproximadamente un tercio del total de aminoácidos libres. Su concentración se ve influida tanto por factores genéticos y ambientales. Una disminución de azufre en el medio de cultivo produce una disminución en el mismo y un aumento paralelo de glutamina lo que da lugar a una reducción en la formación de acrilamida durante el procesado de las patatas (Elmore y col., 2007 y Halford y col., 2012b).

Finalmente, considerando el uso culinario definido para cada variedad y observando los datos recogidos en la tabla 3.4, vemos que las variedades con mayor contenido en precursores son *Monalisa* y *Agata*, por lo que puede predecirse que éstas serán las patatas que, una vez fritas, presentarán mayor contenido en acrilamida. La variedad *Monalisa* es una patata destinada específicamente a fritura, como así aparece en su etiquetado comercial, por lo que el consumo de patatas de esta variedad supone un mayor riesgo de ingestión de acrilamida. La variedad *Agata* cuyo uso culinario indicado es la cocción, también supondrá un riesgo si se consume frita. Por el contrario, las variedades *Bintje*, de uso culinario no especificado, o la *Red Pontiac* y *Frisia*, destinadas a guiso o cocción, tienen un menor contenido en azúcares reductores, principales responsables de la aparición de acrilamida, por lo que su consumo como patatas fritas supondrá menor riesgo en la ingestión de acrilamida.

Deducimos de estos análisis que el criterio para definir el uso culinario al que va destinada una variedad de patata no es su contenido en precursores. Sería interesante tenerlo en cuenta para poder escoger la variedad más indicada y así reducir el consumo de acrilamida por la ingesta de patatas fritas.

4.1.2 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo francés

La variedad Fabula utilizada en este estudio es una variedad autóctona del sur de España en cuya etiqueta aparece la leyenda “para cualquier uso culinario” y que presentaba una relación fructosa/ asparragina inferior a 2 por lo que previsiblemente podría generar grandes cantidades de acrilamida.

En este apartado se incluyen los estudios de precursores tras remojo y de azúcares reductores, acrilamida y color en las patatas elaboradas. También los datos de la forma de preparación casera de este tipo de patatas en una pequeña muestra de las provincias de Granada y Málaga.

4.1.2.1 Contenido de precursores en patata cruda tras los diferentes tratamientos de remojo

Se determinó el contenido de glucosa y fructosa por cromatografía de gases y de asparragina por HPLC. No se realizó el remojo con ácido ascórbico en agua hirviendo debido a la facilidad de oxidación de este compuesto.

1.- Azúcares reductores y asparragina en patata cruda

El comportamiento de la glucosa y la fructosa fue similar en los diferentes tratamientos de remojo analizados tanto a 22º como a 100ºC (tabla 3.5), existiendo una correlación de $r= 0,968$ ($p<0,01$), aunque no fue el esperado (tablas 3.4 y 3.5) (figuras 4.3; 4.4 y 4.5).

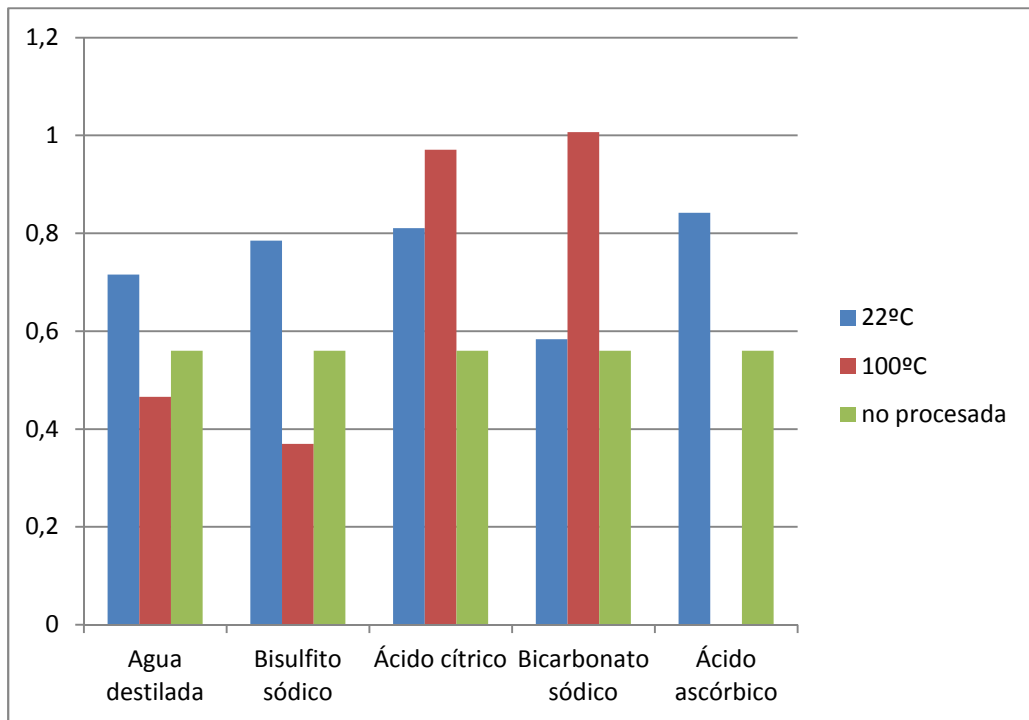


Figura 4.3 Contenido de glucosa (%) en patata cruda y tras remojo

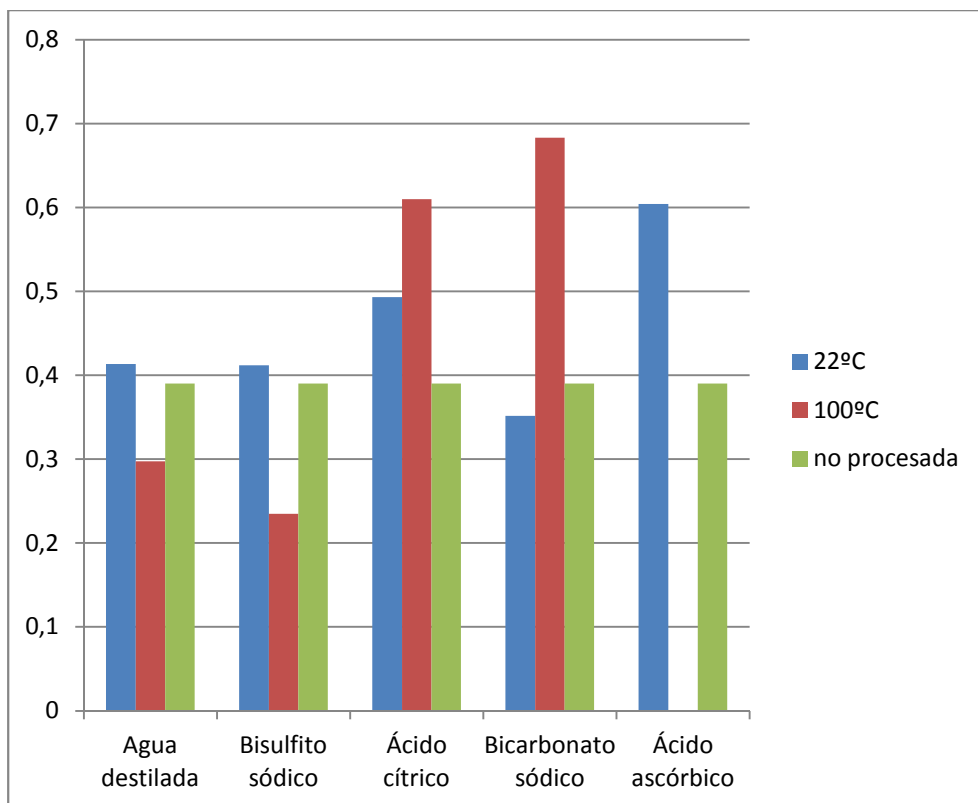


Figura 4.4 Contenido de fructosa (%) en patata cruda y tras remojo

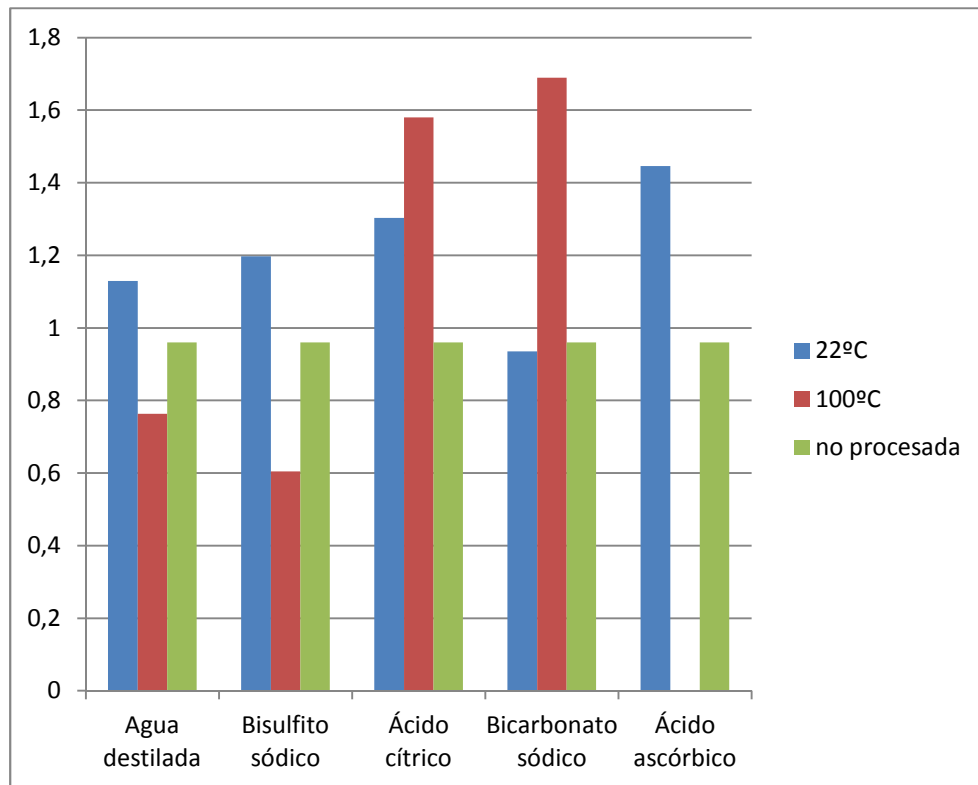


Figura 4.5 Contenido de azúcares reductores (%) en patata cruda y tras remojo

Así en agua destilada y bisulfito sódico disminuyó ligeramente a 100°C con respecto a la patata de partida pero se incrementó a 22°C. En ácido cítrico y bicarbonato sódico hubo un fuerte incremento a 100°C y solo un ligero incremento a 22°C (sobre todo para el bicarbonato sódico), por tanto en estos tratamientos el valor a 100°C fue bastante superior al de 22°C. En el caso del ácido ascórbico hubo un incremento con respecto al valor de partida. Se puede decir que los únicos tratamientos efectivos fueron el remojo en caliente con agua destilada y una solución de bisulfito en los que el contenido de azúcares reductores determinado fue inferior al de las patatas de partida. Comparando ambas temperaturas de remojo (22 y 100°C) el contenido de azúcares reductores fue mayor a la temperatura más baja para el agua y bisulfito sódico y más bajo para el remojo en ácido cítrico y bicarbonato sódico. Este diferente comportamiento hace que al realizar el análisis estadístico no se encontraran diferencias estadísticamente significativas entre el valor medio de azúcares reductores (suma de glucosa y fructosa o de forma individual) entre 22 y 100°C. Sin embargo a 22°C se encontraron diferencias estadísticamente significativas para todos los tratamientos ($p < 0,05$) excepto para la glucosa entre bisulfito sódico y ácido cítrico y entre el ácido cítrico y ácido ascórbico y para la fructosa entre agua y bisulfito sódico. A 100°C se encontraron diferencias estadísticamente significativas para glucosa y fructosa ($p < 0,05$) entre todos los tratamientos excepto para la glucosa entre el ácido cítrico y bicarbonato sódico.

En el caso de la asparragina los tratamientos aplicados parecen tener un mayor efecto.

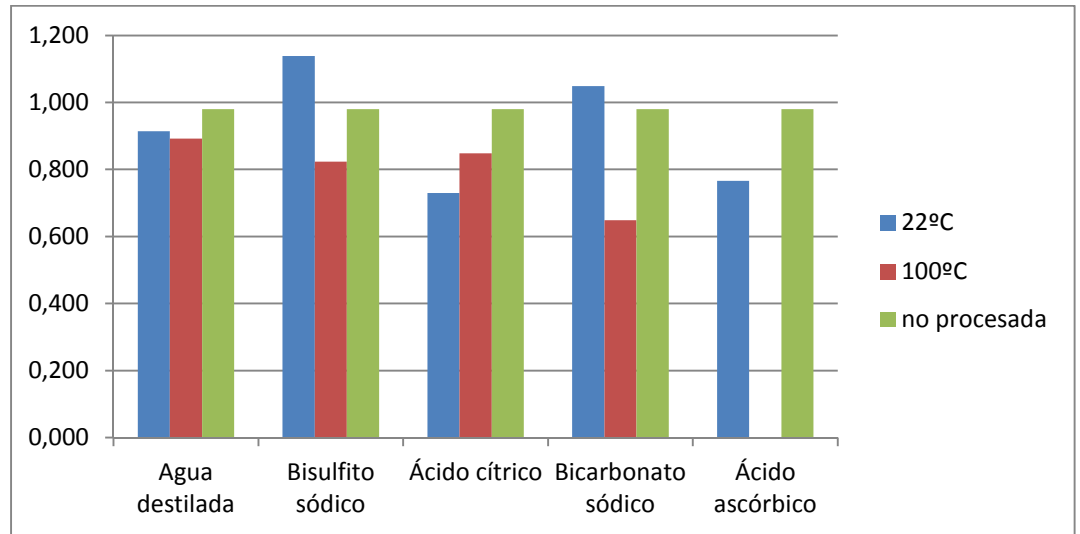


Figura 4.6 Contenido de asparragina (%) en patata cruda y tras remojo

Como se puede observar en la figura 4.6 y en las tablas 3.4 y 3.5 todos los tratamientos de remojo en agua caliente o “blanching” han tenido como resultado una disminución en la cantidad de asparragina con respecto a la patata no procesada. Para el remojo a temperatura ambiente sólo el bisulfito y el bicarbonato parecen no tener este efecto. Como en el caso anterior no hubo diferencias estadísticamente significativas en los valores medios de asparragina entre 22 y 100°C, aunque el valor medio a 100°C fue inferior a 20°C (0,80 versus 0,929). Se encontraron diferencias estadísticamente significativas para asparragina ($p < 0,05$) entre todos los tratamientos tras remojo a 100°C. A 22°C también se encontraron diferencias excepto entre bisulfito sódico y ácido cítrico.

El comportamiento de los azúcares reductores y la asparragina para el mismo tratamiento a los dos temperaturas de remojo fue similar (mayor contenido de ambos o menor en un tratamiento determinado) excepto en el caso del bicarbonato sódico

Los resultados obtenidos coinciden con los de los trabajos realizados por otros autores (Pedreschi y col. 2007) en el que tampoco consiguen una disminución significativa de precursores tras los tratamientos de remojo en agua destilada donde el tiempo de remojo alcanza los 120 minutos y con los de Grob y col. (2003), Pedreschi y col. (2009) y Mestdagh y col. (2008a) que concluyen que la extracción de azúcares en el remojo en agua destilada de la patata cruda es más efectiva a altas temperaturas, aunque disminuye al aumentar el tiempo de remojo.

Masson y col. (2005, 2007) logran una reducción de hasta 71,4% del contenido en precursores con la inmersión en ácido cítrico aunque concentraciones elevadas alteran la calidad sensorial en el producto final. Mestdagh y col. (2008b) consiguen una alta reducción en el contenido de acrilamida en patata frita cuando realizaron un remojo previo con una solución de ácido cítrico. En nuestro caso no se obtuvo un menor valor de precursores, sobre todo de azúcares reductores, tras la adición de ácido cítrico y de forma general tampoco tras el tratamiento en agua fría o agua más aditivo en frío, sin embargo si se obtuvo un menor contenido de acrilamida tras estos tratamientos de remojo lo que nos llevó a realizar el siguiente estudio.

4.1.2.2 Distribución de azúcares en patatas crudas

Para comprobar si pudiera variar el contenido de los azúcares, según la parte considerada, lo que pudiera explicar el mayor contenido de azúcares en algunas patatas tras remojo, se realizó el estudio de distribución de azúcares en patata (tabla 3.6). El contenido de azúcares fue diferente estadísticamente según la parte considerada ($p < 0,05$), mayor en el exterior y menor valor en el centro. Esto podría explicar el diferente contenido de azúcares en las patatas independientemente del tipo de remojo.

4.1.2.3 Contenido de azúcares reductores en patatas fritas

Se determinó el contenido de azúcares reductores por el método volumétrico en las patatas una vez fritas después de los diferentes tratamientos de remojo. Los valores obtenidos a 170°C fueron ligeramente superiores a los obtenidos a 190°C excepto para el tratamiento en frío con ácido cítrico y ascórbico y el bicarbonato a 100°C por lo que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de azúcares en ambas temperaturas de fritura (tabla 3.7). La tabla 4.1 muestra las pérdidas encontradas después de la fritura.

Tabla 4.1. Perdidas de azúcares tras fritura

Muestra	170º	190º
Blanching	0,41	0,44
Agua fría	0,82	0,88
Bisulfito blanching	0,25	0,26
Bisulfito frío	1,00	1,01
Cítrico blanching	1,23	1,24
Cítrico frío	0,92	0,89
Bicarbonato blanching	1,27	1,21
Bicarbonato frío	0,52	0,67
Ascórbico frío	1,08	1,01
Media	0,83	0,85

Si existió una relación estadísticamente significativa entre el valor medio de azúcares reductores obtenido a 170°C y a 190°C de $r=0,767$ ($p<0,01$).

La pequeña diferencia observada entre el valor a 170°C y 190°C puede deberse al haber utilizado para la medida el método volumétrico que si bien es rápido es inespecífico y puede incluir la capacidad reductora generada en el proceso de fritura que es mayor a 190°C.

4.1.2.4 Contenido de acrilamida en patatas fritas tras los remojos

La tabla 3.8 y las figuras 4.7; 4.8 y 4.9 muestran los resultados obtenidos para el contenido de acrilamida en las patatas fritas tras los diferentes tratamientos de remojo y temperaturas de fritura.

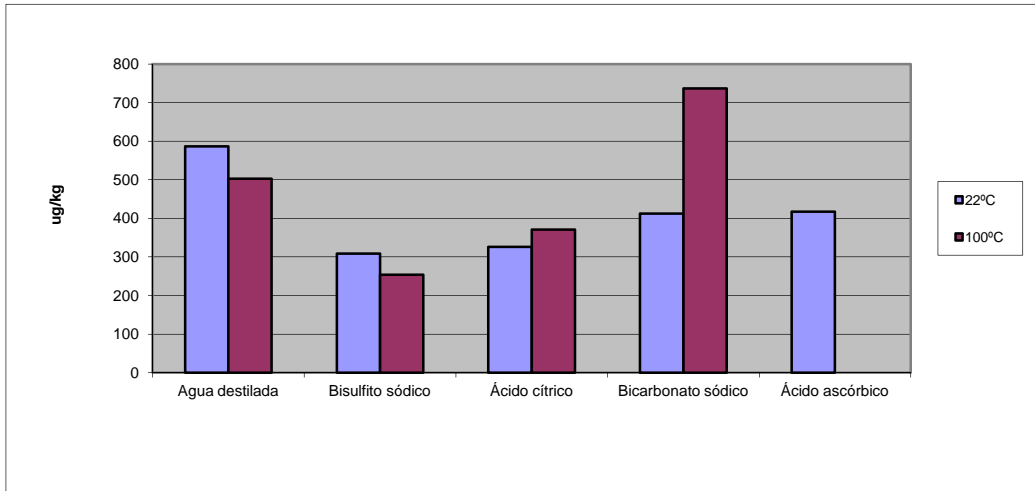


Figura 4.7 Contenido de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en patata frita a 170°C para cada tratamiento

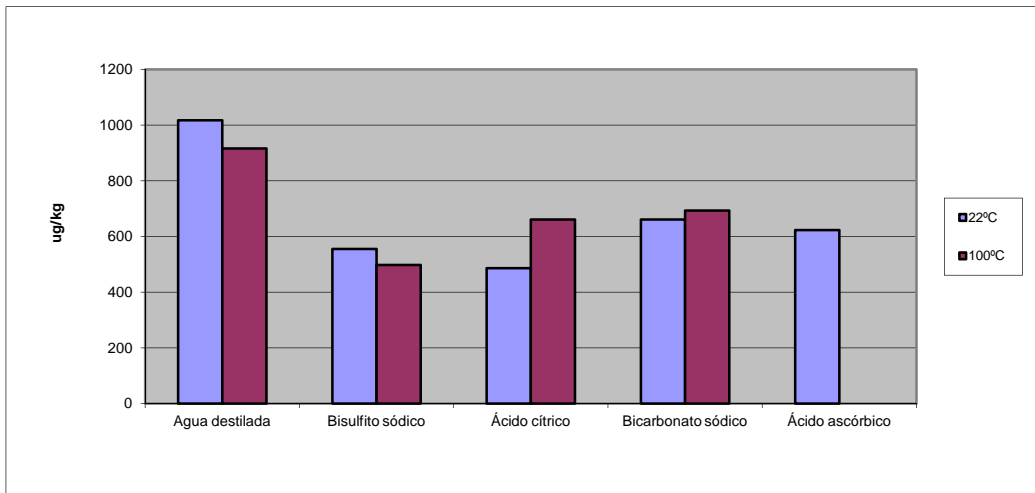


Figura 4.8 Contenido de acrilamida ($\mu\text{g}/\text{kg}$) en patata frita a 190°C para cada tratamiento

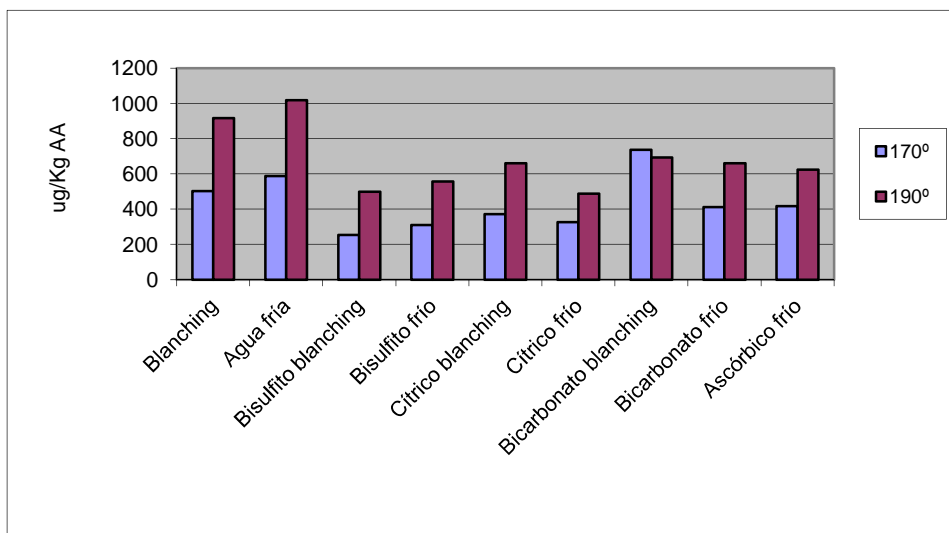


Figura 4.9 Comparación de acrilamida según temperatura de fritura para cada tratamiento

El contenido de acrilamida que se produjo cuando las patatas se frieron a 190°C (valor medio 679 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fue superior al que se produjo a 170°C (valor medio 435 $\mu\text{g}/\text{kg}$) aunque el tiempo de fritura fue menor, siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,01$). El comportamiento en los diferentes tratamientos fue semejante en ambas temperaturas de fritura por lo que se obtuvo una relación elevada y significativa, $r = 0,727$ ($p < 0,01$).

Matthäus (2002) demostró que el aumento de la temperatura tiene un efecto más pronunciado que el aumento del tiempo de procesado a temperatura constante y propuso no exceder de 170-175°C. Fiselier y col. (2006) demostraron que la acrilamida se forma hacia el final de la fritura, lo que indica que la temperatura durante la segunda mitad del proceso de fritura es especialmente importante.

El mayor contenido de acrilamida se produjo en las muestras remojadas con agua y el menor con el remojo en bisulfito sódico (a ambas temperaturas de remojo) y en ácido cítrico frío.

En fritura a 170°C, el contenido medio de acrilamida para ambos tratamientos de remojo con agua destilada fue de 545 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y fue estadísticamente diferente ($p < 0,01$) al obtenido cuando el remojo es con bisulfito sódico (282 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y con ácido cítrico (348 $\mu\text{g}/\text{kg}$), no se encontraron diferencias estadísticas entre el contenido de acrilamida después del remojo en agua destilada o con el bicarbonato sódico y el agua destilada o el ácido ascórbico. El contenido medio de acrilamida tras remojo con bisulfito fue

estadísticamente diferente ($p < 0,01$) al obtenido con bicarbonato sódico (574 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y ácido ascórbico (417 $\mu\text{g}/\text{kg}$). También existieron diferencias significativas entre el contenido de acrilamida tras el remojo entre el ácido cítrico y el bicarbonato sódico ($p < 0,05$)

En fritura a 190°C , el contenido medio de acrilamida para ambos tratamientos de remojo con agua destilada fue de 967 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y fue estadísticamente diferente ($p < 0,01$) al obtenido cuando el remojo es con bisulfito sódico (527 $\mu\text{g}/\text{kg}$), con ácido cítrico (574 $\mu\text{g}/\text{kg}$) y con bicarbonato sódico (677 $\mu\text{g}/\text{kg}$, $p < 0,05$). No se encontraron diferencias estadísticas entre el contenido de acrilamida después del remojo con bisulfito sódico o ácido cítrico, o entre bisulfito sódico y bicarbonato sódico o entre ácido cítrico y bicarbonato sódico.

Los valores de acrilamida tras el remojo en agua caliente y en bisulfito en caliente fueron inferiores a los obtenidos en agua fría. Al contrario sucede en los tratamientos con ácido cítrico y bicarbonato sódico. Esto se corresponde con el distinto nivel de azúcares de partida determinado a esas temperaturas de remojo (figura 4.6), menor para el agua y bisulfito en caliente y mayor para el ácido cítrico y bicarbonato sódico en caliente. Estos datos también se corresponden con las mayores pérdidas de azúcares reductores obtenidas (tabla 4.1) cuando el contenido de acrilamida fue mayor. Para un mismo tratamiento de remojo y temperatura de fritura, el contenido de azúcares de partida fue lo que condicionó la cantidad de acrilamida final.

Si se analiza el contenido según tratamiento independiente de la temperatura de remojo y de fritura podemos destacar que el pH ácido retrasa la reacción de Maillard (ácido cítrico y ascórbico) por lo que disminuye la formación de acrilamida comparada con el agua. El bisulfito al reaccionar con los azúcares elimina precursor y el bicarbonato sódico al proporcionar un pH básico acelera la reacción y produce más acrilamida tras remojo en agua fría, aunque el incremento no fue tan evidente como el descenso con los otros tratamientos

Masson y col (2005) lograron una considerable reducción del contenido en acrilamida con un escaldado en disoluciones de ácido cítrico. Rydberg y col. (2003) usando también ácido cítrico, lograron descensos por encima del 50%. Algunos autores que han probado con otros ácidos como el sórbico o el propiónico también han conseguido reducir, aunque en niveles mucho más bajos (Pedreschi y col., 2007; Gama-Baumgartner y col., 2004). Más recientemente Truong y col. (2014) consiguieron reducciones de hasta 7 veces

en los niveles de acrilamida con escaldado y pirofosfato ácido de sodio al 0,5% antes de freír. Yuan y col. (2014) han encontrado disminuciones de acrilamida tras fritura tradicional después de la inmersión de patatas del 77% en solución de ácido cítrico (1 g/l), 72% en CaCl_2 (2 g/l) y 64% en soluciones de NaCl al (0,5 g /l).

4.1.2.5 Color en patatas fritas tras los remojos

Las tablas 3.9 y 3.10 muestran los resultados obtenidos para los diferentes parámetros de color analizados (L, a, b, h y YI) en las patatas fritas sin tratamiento y tras los diferentes tratamientos de remojo y temperaturas de fritura. Los valores medios de los parámetros a, b, h y YI fueron superiores a 190°C y lo contrario ocurrió con la luminosidad (L) que fue mayor a 170°C. Sin embargo las relaciones entre los diferentes tratamientos a las dos temperaturas analizadas (170 y 190°C) sólo fue alto y estadísticamente significativo para los parámetros L ($r=0,9030$, $p<0,01$), **a** ($r=0,890$ $p<0,01$) y **b** ($r=0,692$ $p<0,01$) por lo que estos tres pueden utilizarse indistintamente para analizar los resultados.

El valor medio de L a 170°C fue 70,1 y superior al de 190°C que fue de 65,5 siendo esta diferencia estadísticamente significativa ($p<0,01$), el valor medio de **a** a 170°C fue de 2,11 e inferior al obtenida a 190°C (3,39) siendo también la diferencia significativa ($p<0,01$). Los valores medios de **b** a 170 y 190°C fueron 26,8 y 27,1 respectivamente no existiendo diferencia estadística.

El valor medio de L a 170°C de fritura y remojo a 22°C fue 69,2 y 71,3 tras remojo a 100°C. A 190°C y remojo a 22°C fue de 64,4 y de 67,1 tras remojo a 100°C, a mayor temperatura de remojo menos color después en la fritura, resultados similares se obtuvieron para ambas temperaturas de fritura y remojo para el valor de **a**. El remojo a altas temperaturas elimina precursores responsables de la formación de color (etapas avanzadas de la reacción de Maillard) aunque las diferencias tanto para L como para **a** no fueron estadísticamente significativas.

Los valores más altos de luminosidad (L) (menos color) se obtuvieron en las muestras tratadas con bisulfito sódico remojada en caliente y frío y a ambas temperaturas de fritura y los más bajos (más color) las obtenidas tras fritura a 190°C de las patatas remojadas con bicarbonato sódico en caliente. También se obtuvo una luminosidad baja en el tratamiento de remojo en frío con ácido cítrico a 170° C.

En fritura a 170°C se encontraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$) y para las tres variables de color (**L, a y b**) considerando ambas temperaturas de remojo (22 y 100°C) entre todos los tratamientos excepto entre bicarbonato sódico y ácido ascórbico y el bicarbonato sódico y el agua.

En fritura a 190°C y para las tres variables de color (**L, a y b**), considerando ambas temperaturas de remojo (22 y 100°C), sólo hubo diferencias estadísticamente significativas ($< 0,01$) entre el bisulfito sódico y los demás tratamientos no existiendo diferencias entre ellos. A bajas temperaturas de fritura los tratamientos de remojo ensayados (agua destilada, bisulfito sódico ácido cítrico, bicarbonato sódico y ácido ascórbico) producen un efecto diferenciador sobre el pardeamiento mayor que cuando la temperatura de fritura se eleva.

Si se analiza la luminosidad según tratamiento independiente de la temperatura de fritura y remojo observamos que el bisulfito sódico inhibe la reacción de Maillard (más luminosidad), así como el medio ácido (ácido cítrico en frío), sin embargo esta se acelera a pH básico (bicarbonato sódico). La luminosidad tan baja observada con la utilización del ácido ascórbico puede deberse a que este compuesto se oscurece como consecuencia de su degradación (pardeamiento no enzimático).

La figura 4.10 recoge el aspecto de las muestras tras la fritura. La placa de la izquierda corresponde a muestras fritas a 170° y la de la derecha a 190° C.








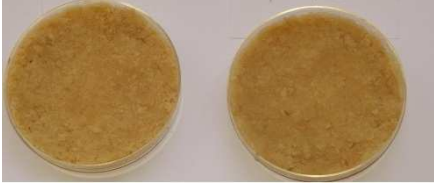

 <p>remojo en agua fría (22°C)</p>	 <p>remojo en agua caliente (100°C)</p>
 <p>remojo en bisulfito sódico (22°C)</p>	 <p>remojo en bisulfito sódico (100°C)</p>
 <p>remojo en ácido cítrico (22°C)</p>	 <p>remojo en ácido cítrico (100°C)</p>
 <p>remojo en bicarbonato sódico (22°C)</p>	 <p>remojo en bicarbonato sódico(100°C)</p>
 <p>remojo en ácido ascórbico (22°C)</p>	

Figura 4.10 Color de las patatas fritas

Las figuras 4.11-4.14 muestran la relación obtenida entre la luminosidad y el valor de color **a** y el contenido de acrilamida en los diferentes ensayos realizados.

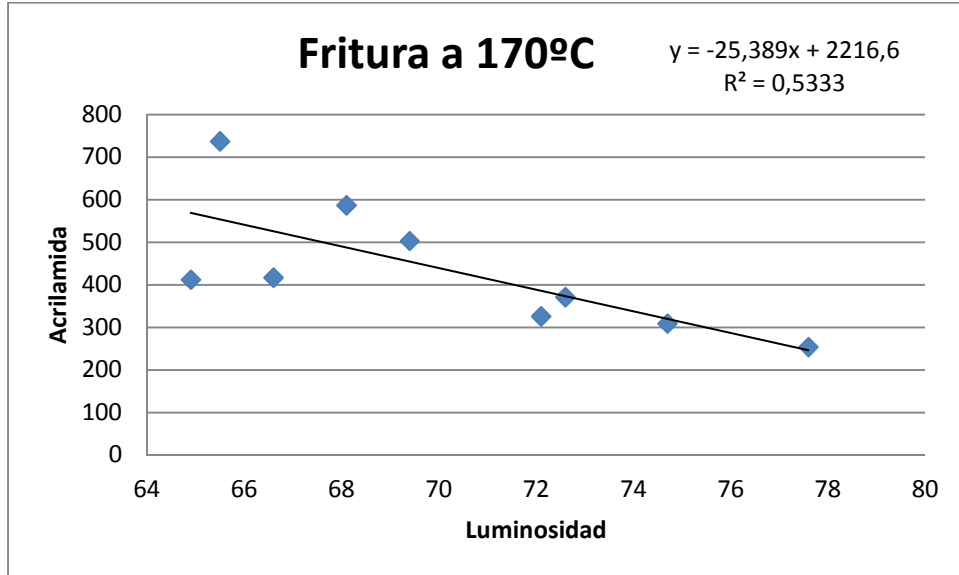


Figura 4.11 Acrilamida frente a luminosidad en patatas fritas a 170°

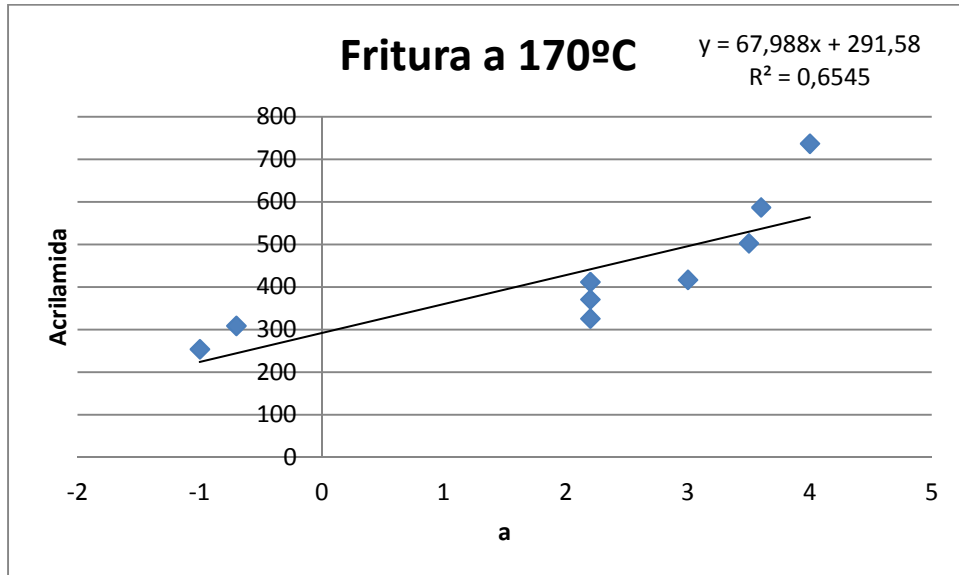


Figura 4.12 Acrilamida frente a valor de color **a** en patatas fritas a 170°

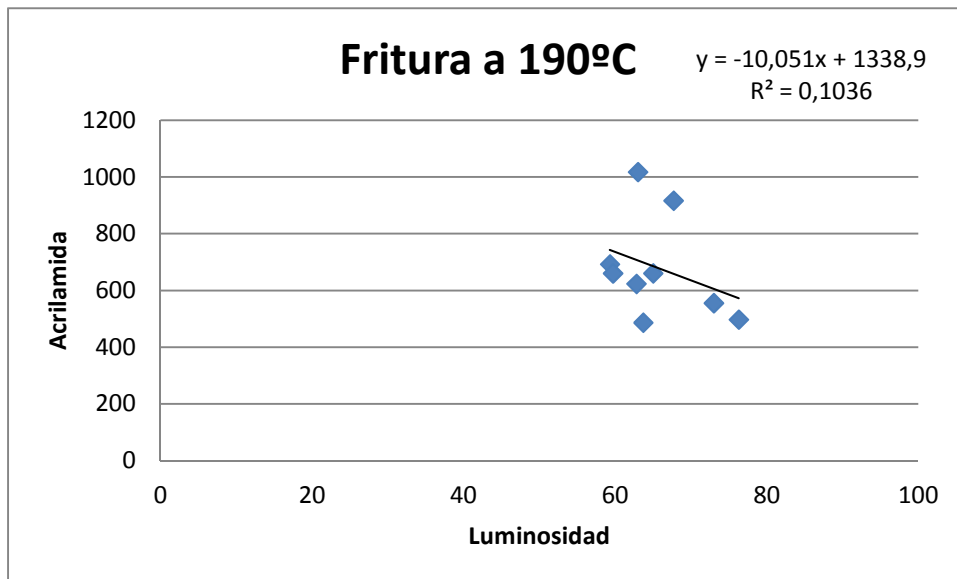


Figura 4.13 Acrilamida frente a luminosidad en patatas fritas a 190°

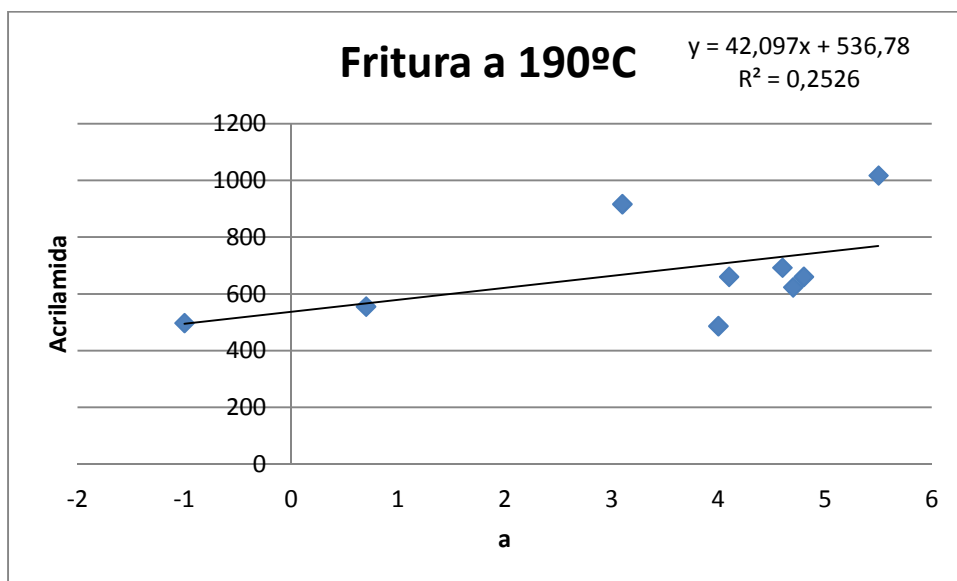


Figura 4.14 Acrilamida frente a valor de color **a** en patatas fritas a 190°

A 170°C existió correlación estadísticamente significativa ($p < 0,01$) entre la acrilamida y el color, medido a través de la luminosidad ($r = -0,7304$) y el valor **a** ($r = 0,8090$) no hallándose para el valor de **b**. Sin embargo aunque hubo relación a 190°C para estas dos variables sólo fue estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para **a** ($r = 0,5025$). A altas temperaturas los productos finales de la reacción de Maillard (color) y la formación de acrilamida parece que no se producen en una extensión similar. Jackson (EFSA, 2015) en fritura casera de patatas fritas precocidas a 185°C de 1 a 5 minutos da valores de acrilamida

entre 76 µg/kg hasta 1512 µg/kg con incrementos en el color marrón observado conforme avanza el tiempo de fritura pero no tan elevados como los de acrilamida.

La relación entre acrilamida y color ha sido encontrada por muchos autores analizando patatas con simple remojo en agua o tras escaldado o adición de ácido cítrico encontrando comportamientos similares a los obtenidos por nosotros, disminución de luminosidad y aumento del valor a (Pedreschi y col 2004 y 2006, Majcher y Jelen, 2007). Sin embargo el nivel de pardeamiento que la patata adquiere al freírse puede no se considera una medida fiable para estimar el contenido de acrilamida cuando el producto utilizado presenta gran tamaño (Taubert et al. 2004).

Como se ha comentado anteriormente todos los pre-tratamientos propuestos (agua caliente, ácidos cítrico y ascórbico, bicarbonato y bisulfito sódico) produjeron una disminución del contenido de acrilamida en las patatas fritas. En agua fría los mejores tratamientos fueron la adición de ácido cítrico y bisulfito sódico y en agua caliente el bisulfito sódico, consiguiéndose en este caso una reducción próxima a la mitad. Hay que indicar que en todos los casos las patatas poseían unas características organolépticas adecuadas para su consumo. Las patatas fritas de color más claro fueron las remojadas con bisulfito sódico, una coloración mayor pero bastante aceptable fue la obtenida con ácido cítrico en frío y las patatas fritas más oscuras se obtuvieron con el bicarbonato sódico, aunque también en este caso se consiguió reducir el contenido de acrilamida cuando el remojo se hizo en caliente.

Con los tratamientos propuestos y utilizando patatas con niveles no óptimos de precursores es posible reducir el contenido de acrilamida y tener una coloración aceptable y al gusto del consumidor y no llegar al límite máximo de 600 µg/kg aceptado para estos productos (EFSA, 2015); friendo a 170°C con todos los tratamientos excepto con bicarbonato en caliente y a 190°C con los tratamientos de bisulfito en frío y caliente y ácido cítrico en frío y con valores superiores a 600 µg/kg pero inferiores a 700 µg/kg en ácido cítrico en caliente, bicarbonato en frío y caliente y ácido ascórbico en frío, a esta temperatura de 190°C no fue suficiente el agua fría o el escaldado para obtener niveles aceptables.

4.1.2.6 Preparación de patatas caseras

Este estudio se realizó al objeto de conocer la forma de preparación casera de las patatas fritas tipo francés y tener una estimación aproximada

sobre el riesgo de ingesta de acrilamida en la población encuestada (n=256) que pertenecía a las provincias de Granada y Málaga.

La mayor parte de la muestras son mujeres (71%) que son las que habitualmente se encargan de cocinar en los hogares, así como de la compra (tablas 3.11 y figura 4.15).

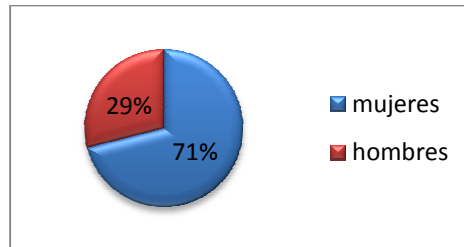


Figura 4.15 Sexo de los encuestados.

Un 72% tenía entre 25 y 65 años y la mayor proporción de muestra estuvo comprendida (56%) entre 25 y 50 años (tabla 3.12 y figura 4.16), lo que puede corresponder a familias con hijos como puede deducirse del número de comensales para los que cocinan (tabla 3.13 y figura 4.17).

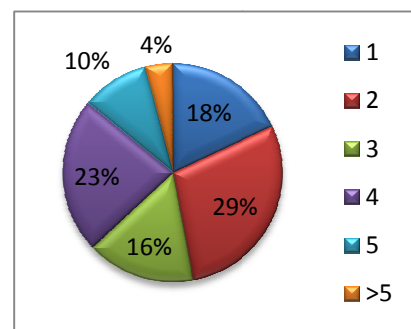
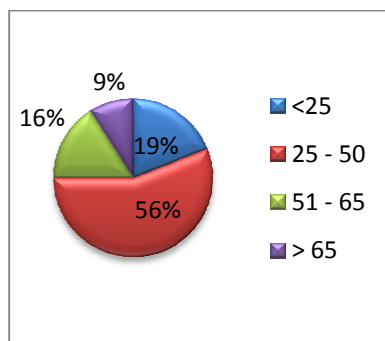


Figura 4.16 Edad de los encuestados Figura 4.17 Número de personas para las que cocina.

Solo un 18% cocinaban para ellos mismos y más de la mitad (53%) cocinaban para tres personas o más. Lo que hace un total de aproximadamente 750 personas consumiendo patatas tipo francés.

La mayoría de la población encuestada no toma este plato más de 3 veces por semana (94%) y no hubo nadie que lo consumiese todos los días (tabla 3.14 y figura 4.18).

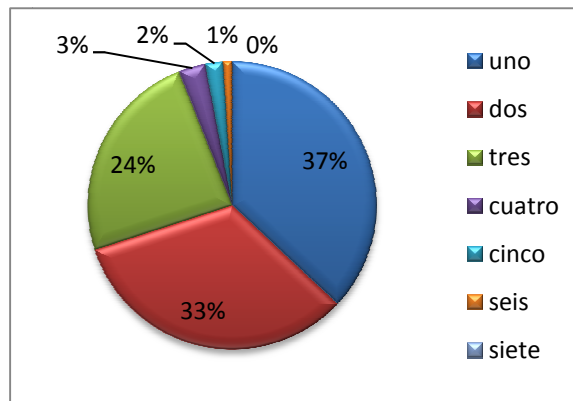


Figura 4.18 Días a la semana que comen patatas fritas.

La población encuestada se puede considerar preocupada por la alimentación saludable ya que las patatas fritas estilo francés no son consumidas más de dos veces a la semana (70%). Si la preocupación se debe al consumo excesivo de grasa, al de la posible presencia de acrilamida o a la obtención de un producto con adecuadas características organolépticas se podría deducir del resto de las preguntas de la encuesta.

La mayoría de los encuestados seleccionan el tipo de patatas que compran, incluso un 21% compra patatas en las que se especifica su uso culinario, para freír y un 46% las compra nuevas que son las que presentan un nivel más bajo de precursores de acrilamida. Solo un 30% no selecciona el tipo de patatas independientemente del uso culinario que les vayan a dar (tabla 3.15 y figura 4.19).

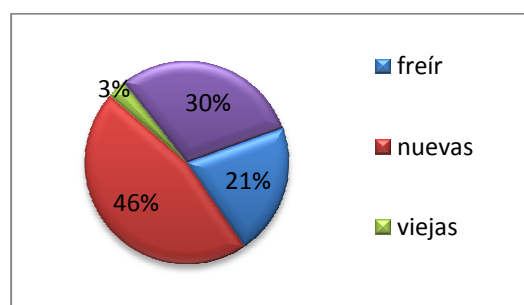


Figura 4.19 Selección del tipo de patatas en la compra.

Esto nos indicaría una preocupación por este contaminante, sin embargo la alta proporción de personas que no remojan las mismas (71%), al objeto de disminuir el contenido de precursores como se indica como consejo culinario, nos lleva a pensar lo contrario (tabla 3.16 y figura 4.20). Sólo un 30% de la muestra podría estar preocupada y de ella un 20% incluso las dejaría en remojo cortadas con lo que se conseguiría un mayor efecto reductor.

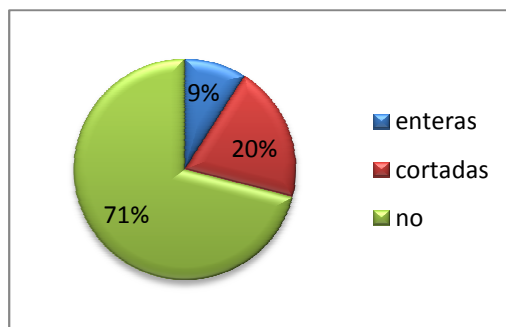


Figura 4.20 Porcentaje de personas según el remojo de la patata cruda

Sin embargo, de las personas que dejan en remojo las patatas, la mayor parte las dejan menos de 30 minutos, según ellos mismos manifestaron, el tiempo que tardan en preparar la sartén o freidora y sólo un 4% las dejan más de una hora (tabla 3.17 y figura 4.21).

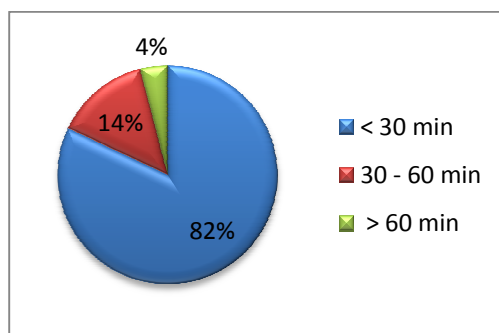


Figura 4.21 Tiempo de remojo de las patatas crudas antes de la fritura.

La mayor parte de las personas fríen las patatas utilizando una sartén en vez de freidora (tabla 3.18 y figura 4.22) y la mayoría las toma en un punto intermedio de fritura (71%) y solo un 9% las consume muy fritas (tabla 3.19 y figura 4.23).

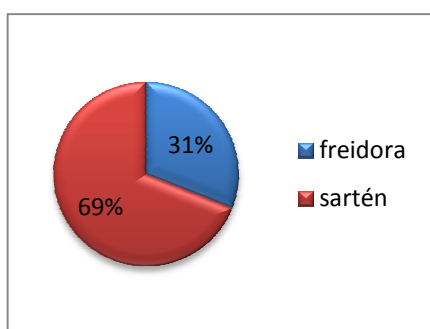


Figura 4.22 Modo de fritura

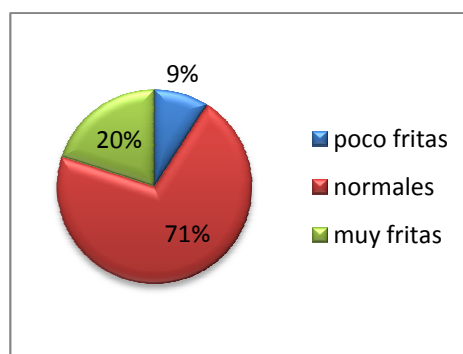


Figura 4.23 Grado de fritura

Los factores que intervienen en la formación de acrilamida en la fritura de patatas de forma casera son: la selección de variedades por el consumidor, la utilización de remojo en agua con o sin agentes adicionados, la temperatura y el tiempo de fritura. La población selecciona patatas nuevas o para freír por lo que las patatas tienen un bajo contenido en precursores. Las patatas viejas que llevan tiempo almacenadas acumulan azúcares reductores. El tiempo de remojo es bajo, sin embargo las remojan ya cortadas lo que favorece su reducción. El número de comensales nos indicará la cantidad de patatas adicionadas a la vez para freír, lo que hará aumentar el tiempo de fritura pero disminuir la temperatura de la misma, este último factor es más importante en los valores finales de acrilamida. El uso de la sartén en lugar de la freidora hace que la ingesta de acrilamida puede ser inferior puesto la fritura en sartén se hace a menor temperatura que en freidora y ésta es más inestable.

El hecho de que el punto de fritura sea normal y que el consumo no sea más de dos veces en semana hace que la mayor parte de la población estudiada se pueda considerar de bajo riesgo.

Si consideramos 135 g el tamaño de ración de patatas, un remojo en agua fría, temperatura de fritura de 170°C, un consumo medio de dos veces a la semana y un peso de 65 kg y utilizamos los datos de acrilamida obtenidos en nuestro estudio, el consumo de la mayor parte de población sería de 0,35 µg/kg/día y podría ser reducida si el remojo se hubiese hecho con bisulfito sódico a 0,15 µg/kg/día. En el peor de los escenarios temperaturas de 190°C (muy fritas) y un consumo de 6 veces a la semana, para un individuo del mismo peso que antes, llevaría a una ingesta de 1,82 µg/kg/día y se reduciría a 0,88 µg/kg/día si se consumiese remojada en bisulfito, valores muy elevados que indican que no solo es importante el tratamiento sino la frecuencia de consumo.

La exposición media y al percentil 95 de acrilamida en la dieta calculada por la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria a través de encuestas y para todos los grupos de edad se estima en 0,4 a 1,9 µg/kg de peso corporal y día y 0,6 a 3,4 µg/kg de peso corporal y día, respectivamente, siendo las patatas fritas el principal contribuyente (EFSA, 2015).

4.1.3 Estudio de acrilamida en patatas fritas tipo “chips”

El contenido medio de acrilamida de un pequeño estudio realizado sobre 10 muestras de patatas fritas tipo “chips” (tabla 3.20) fue de 1316 µg/kg (mediana 1064 µg/kg) y superior a la obtenida en patatas tipo francés, como corresponde a muestras que se fríen a temperaturas similares pero que

presentan diferente contenido de agua en producto final. Dos muestras se freían en el mismo momento de la venta, dos eran producidas por grandes marcas comerciales y las otras 7 por pequeños productores locales.

Los valores más bajos (próximos a 800 $\mu\text{g}/\text{kg}$) fueron los que se obtuvieron en las dos freidurías locales y el valor más alto 2366 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en una muestra comercial elaborada por un pequeño productor. Los resultados obtenidos se encuentran dentro del intervalo dado por Mesías y Morales (2015) en el análisis de 2 lotes diferentes de 40 marcas comerciales de patatas fritas sin aditivos compradas también en supermercados españoles, aunque fueron superiores a sus valores medio y mediana (630 y 556 $\mu\text{g}/\text{kg}$ respectivamente) y superiores también a los dados por EFSA (2011) que fueron de 758 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de media y 543 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de mediana.

El contenido de acrilamida obtenido en patatas comerciales es muy variable, así hay autores que no encuentran valores superiores a 2000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Arisseto y col., 2009, Boroushaki y col., 2010 y Wong y col., 2014) pero otros encuentran valores mucho más elevados, Becalski y col., 2010 en patatas canadienses obtuvo valores entre 106 y 4630 $\mu\text{g}/\text{kg}$ o Shamla y Nisha, (2014) en patatas de la India entre 82 y 4246 $\mu\text{g}/\text{kg}$. La EFSA (2011) para muestras de patatas europeas encontró como valor más alto 4533 $\mu\text{g}/\text{kg}$, valor no alcanzado en nuestras muestras.

Teniendo en cuenta el valor indicativo máximo para acrilamida en patatas chips (1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$) que propone la comisión europea (EC, 2013) sólo el 40% de nuestras muestras estarían dentro de este límite, hay que indicar que este estudio se realizó en el año 2010, por lo que puede que las industrias elaboradoras hayan tomado medidas para reducir este contenido. Mesías y Morales (2015) analizan en el año 2014 diez marcas de patatas similares a las que habían analizado en 2009 encontrando para 7 muestras una reducción entre el 22 y 66%.

La tendencia en el contenido de acrilamida en las patatas a lo largo de los años ha sido investigada por algunos autores, así en patatas de Suiza, Biedermann y col., (2010) encontraron una disminución desde 2007 a 2010 de 6900 $\mu\text{g}/\text{kg}$ a 420 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En Nueva Zelanda, Love and Grounds, (2006) dan valores de 370-2320 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 2006 y Cressey y col.(2012) de 112 a 1460 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en el 2012. Más recientemente Powers y col. (2013) evaluando patatas chips europeas desde 2002 hasta 2011 observa un descenso en los niveles medios de acrilamida de 763 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 2002 a 358 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en 2011. En España se han

encontrado disminuciones en el contenido de acrilamida del 50% de 2004 a 2007 y una nueva reducción próxima al 15% desde el 2009 al 2014. Esto aparece demostrar la efectividad de las medidas llevadas a cabo en las industrias para reducir acrilamida en sus productos. Sin embargo esto no ha sido observado por todos los autores así en el informe dado por EFSA (2011) el contenido medio de acrilamida desde el 2007 a 2010 se incrementó ligeramente desde 570 µg/kg a 758 µg/kg.

Tres de las muestras analizadas (tabla 3.20) eran del mismo fabricante pero de diferente lote y destaca en ellas la enorme diferencia en el contenido de acrilamida desde 931 hasta 2366 µg/kg, este hecho también fue encontrado por Mesías y Morales (2015) en patatas españolas con variaciones en algunos casos más altas del 80%, aunque de forma general no pasan del 20%, por su parte Cressey et al (2012), en Nueva Zelanda, encontró variaciones que van desde 371 a 1460 µg/kg, lo que indica que la muestra de partida (patata) es tan importante como el proceso de elaboración.

4.2 Cereales

4.2.1 Acrilamida en rebozados y pan rallado

El rebozado es una técnica culinaria muy utilizada en la preparación casera de los alimentos fritos, también la elaboración industrial de alimentos rebozados ha ido en aumento debido a la cada vez más creciente necesidad de productos listos para cocinar. Los productos rebozados comerciales se integran entre los platos preparados congelados, son comidas elaboradas de uno o varios productos alimenticios de origen animal o vegetal, con la adición de harinas y /o pan rallado y adicionalmente, leche, huevo y otras sustancias autorizadas y, en su caso, condimentadas, que han sido sometidas a un proceso de congelación (-20 °C) o ultracongelación (-40 °C) para prolongar su vida útil y que una vez descongelados, o directamente en su estado de congelación, pueden consumirse tras un leve proceso culinario de fritura o fritura-horneado.

La técnica de rebozado/empanado se emplea de forma habitual en carnes (principalmente pollos), pescados (boquerones, calmares...) y vegetales (berenjenas, cebollas...) y muchas son las formas de realizarla según la tradición de cada país, utilizando harina sola, mezclas de harina agua, harina-leche, harina-huevo, pan rallado solo, pan rallado-huevo etc. El primer paso es cubrir el alimento con la masa y posteriormente freírlo.

Puesta a punto del método de determinación de acrilamida en rebozados

El estudio de precisión se realizó sobre la muestra rebozada con harina de trigo-maíz-leche (n=6). La media obtenida es 246 µg/kg con una desviación de 3,64 µg/kg. El estudio de recuperación se realizó sobre harina de trigo recién molida proporcionada por una industria harinera local adicionando concentraciones conocidas de patrón de acrilamida hasta 500 ppb. La recuperación media fue de 101,9%. El límite de detección calculado como tres veces el ruido fue de 0,27 µg/kg y el límite de cuantificación fue de 0,81 µg/kg.

El contenido medio de acrilamida fue de 213 µg/kg en rebozados (tabla 3.21) y 177 µg/kg en empanados (tabla 3.22) y osciló entre 50 µg/kg para el empanado con pan rallado de grano fino y huevo y 368 µg/kg para el rebozado con harina de trigo y agua y 494 µg/kg para el rebozado con harina de trigo solamente.

La tablas 4.2 y 4.3 recogen la proporción de rebozado y empanado obtenido en el producto respectivamente, así como la humedad, contenido de grasa en los mismos y acrilamida y grasa por ración.

Tabla 4.2 Características y cantidad de los rebozados

Tipo harina	Tratamiento	% de Rebozado	Humedad (%)	Grasa (%)	Acrilamida por ración* (µg/kg)	Grasa por ración* (g)
Trigo	Agua	36,28	15,5	23,4	16,03	10,17
	Leche	37,34	35,4	20,8	8,76	9,31
	Huevo	41,32	24,4	26,1	6,02	12,94
Garbanzos	Agua	19,18	17,4	49,7	3,89	11,45
	Leche	18,14	24,0	41,6	3,05	9,06
	Huevo	32,21	23,1	48,5	3,83	18,75
Arroz	Agua	27,73	10,8	22,9	7,82	7,61
	Leche	31,63	20,3	25,2	6,72	9,58
	Huevo	29,98	29,0	44,2	4,28	15,92
Tempura (trigo-maíz)	Agua	21,22	17,4	41,6	7,13	10,59
	Leche	40,44	12,5	42,6	11,92	20,68
	Huevo	47,60	27,5	42,3	7,23	24,17

*Ración= 120 g

Tabla 4.3 Características y cantidad de los empanados

Pan	Tratamiento	% de Empanado	Humedad (%)	Grasa (%)	Acrilamida por ración* (µg/kg)	Grasa por ración* (g)
Pan rallado grano grueso	Huevo + pan	13,41	11,8	41,6	3,53	6,69
	Harina /huevo + pan	36,15	13,0	35,0	13,13	15,18
Pan rallado grano fino	Huevo + pan	28,57	28,3	34,9	1,70	11,97
	Harina/ huevo + pan	34,12	21,0	20,0	5,66	8,19

*Ración= 120 g

Determinación en productos rebozados

En los productos rebozados la relación líquido/sólido (agua, leche, huevo/harina) necesaria para obtener una masa de consistencia similar oscilo entre 1,5 cuando se utilizaba agua a 2,5 cuando se utilizó huevo (tabla 2.2).

El tiempo de fritura requerido para obtener productos con aceptable calidad organoléptica fueron más bajos en las muestras en la que se empleó leche (2-3 min) y más altas en las elaboradas con huevo (4 min)(tabla 2.2).

El contenido medio de acrilamida para los tres tratamientos (agua / leche / huevo) fue de 228 µg/kg para la harina de trigo, 217 µg/kg en la mezcla de harinas de trigo y maíz, 177 µg/kg para la harina de arroz y 136 µg/kg para la harina de garbanzos (tabla 3.21). El contenido más alto de acrilamida se obtuvo con la mezcla de agua y harina, seguido de la mezcla harina y leche y la de harina y huevo.

Se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre todos los tratamientos para las muestras de harina de trigo y de trigo–maíz ($p < 0,01$) y para las de arroz entre agua y huevo.

Aunque el contenido de asparragina para las distintas harinas utilizadas será diferente según lo descrito en la bibliografía, siendo probablemente la de garbanzos la que mayor contenido tenga y la de arroz la que menos (Barutcu y col, 2009), no parece suponer un factor limitante cuando se utilizan estas harinas de forma diferente pero adecuada (diferente relación líquido/sólido, diferente tiempo de fritura).

Existió una correlación ($r=0,6305$) entre la relación líquido/sólido y el tiempo de fritura y una relación inversa y altamente significativa ($r=-0.804$, $p<0.001$) entre la citada relación y el contenido de acrilamida, siendo mayor de 0.9 para las harinas de arroz, trigo y maíz y garbanzos. Aunque la consistencia que se obtuvo entre el material de rebozado es similar el mayor contenido de líquido que se necesita para las muestras de leche y huevo hace que se obtenga menor contenido de acrilamida una vez frito.

El valor medio de humedad en el producto final fue de 21,4% (tabla 4.2), similar al obtenido por otros autores (Barutcu y col, 2009). De forma general a mayor cantidad de líquido adicionado mayor cantidad quedó en el rebozado, independientemente del tiempo de fritura. Se obtuvo una relación inversa y significativa entre el contenido de humedad del producto final y el de acrilamida ($r=-0.573$, $p<0.05$) y no lo hubo con el tiempo de fritura cuando se consideró el conjunto sin diferenciar tipo de harina ni tratamiento utilizado, aunque si se obtiene si se excluye el tratamiento con huevo ($r= 0,7490$).

La cantidad de rebozado obtenido cuando se utilizó huevo fue generalmente más alta y el contenido de acrilamida con este tratamiento más bajo. La capa de rebozado obtenida con el huevo fue esponjosa a diferencia de las que se obtuvieron con agua y leche, con un color oscuro por fuera pero no por dentro, lo que explica el menor contenido de acrilamida cuando se utilizó huevo.

El consumo de acrilamida por ración (120 g) en las muestras rebozadas estaba comprendido entre 3 μg para la muestra de harina de garbanzo-leche y 16 μg para la muestra de harina de trigo-agua (tabla 4.2). El consumo de acrilamida en las harinas con la adición de huevo fue menor que con la utilización de leche y agua, sin embargo, el que con huevo se obtenga mayor porcentaje de rebozado hace que el consumo de acrilamida no difiera mucho con los otros tipos de rebozado.

Cuando se utiliza harina de garbanzos se consume menor cantidad de acrilamida (3,6 μg) , a los valores más bajos de acrilamida en el rebozado obtenido se une el menor tiempo de fritura que se necesitó, la mayor cantidad de humedad obtenida en el rebozado y el menor porcentaje de rebozado obtenido con respecto al producto final. El consumo medio independiente del tratamiento para las otras harinas fue de 6.3 μg para el arroz, 8.8 μg para la mezcla de trigo-maíz y de 10.3 μg para la harina de trigo.

Estos valores son entre 3-8 veces más bajos que la exposición diaria estimada para la población española (30 μg).

La cantidad de grasa por ración (tabla 4.2), como era lógico, fue mayor en las muestras con huevo, donde se alcanzó el valor de 24,2 g en las muestras de trigo-maíz. El consumo de grasa en los rebozados con huevo fue alrededor del doble que para las muestras elaborados con agua o leche. El contenido medio de grasas en las muestras de arroz fue el más pequeño (11g). Las muestras de garbanzos mostraron una mejor relación acrilamida-grasa, siendo la muestra elaborada con leche y garbanzos la mejor, 3,05 µg de acrilamida y 9,06 g de grasa.

No hemos encontrado ningún estudio en rebozados de vegetales pero si en productos elaborados con harinas fritas. Leung y col (2003) estudiaron la influencia de la temperatura sobre la formación de acrilamida en "buñuelos fritos chinos" (masa de harina de trigo, agua, levadura, bicarbonato y sal) frita en aceite vegetal a 170, 190 y 210°C. Estos autores establecieron que el tiempo de fritura para un producto de calidad aceptable a 170°C era de 12-14 minutos, de 10-11 minutos a 190°C y 5 min a 210°C. El contenido de acrilamida oscilo para estos tiempos entre 150-200 µg/kg en los buñuelos fritos a 170°C elevándose a más de 250 µg/kg para los productos preparados a 190 y 210°C. En este sentido Morales and Arribas-Lorenzo (2008) indican que en churros, que habitualmente se fríen entre 185-200°C durante 3-4 minutos, un aumento de tan sólo 10°C produce un aumento de dos veces en el nivel de acrilamida siendo este factor crítico en la formación de acrilamida en estos productos. En cuanto a la utilización de otras harinas, Shih y col (2004) analizaron la generación de acrilamida en diferentes mezclas de harinas (arroz, trigo y maíz) con agua fritas sobre una cuchara durante 6 minutos a 177°C encontrando el nivel más alto para la harina de maíz, seguido por la harina de trigo, mientras que los niveles más bajos fueron producidos con la harina de arroz.

Determinación en productos empanados

El contenido medio de acrilamida en los productos empanados fue similar al de los rebozados pero existió una gran diferencia entre el contenido de acrilamida obtenido cuando se utilizó pan rallado de grano grueso (261 µg/kg) o de grano fino (94 µg/kg) (Tabla 3.22). El tiempo de fritura fue inferior cuando se utilizó pan rallado de grano grueso, pero hay que indicar que la marca de pan rallado era diferente y en la primera además de pan llevaba gluten adicionada como ingrediente.

Al igual que en los rebozados se obtuvo una correlación significativa e inversa entre el contenido de acrilamida y la humedad (tabla 4.3) obtenida en

el empanado ($r=-0.839$, $p<0.01$). Enharinar primero con harina de trigo aumentó el contenido de acrilamida en el empanado final en aproximadamente $85 \mu\text{g}/\text{kg}$ para ambos tipos de pan rallado utilizados (grano grueso y fino).

En los empanados el consumo de acrilamida por ración osciló entre $1,7 \mu\text{g}$ para el de grano fino con huevo y $13,13 \mu\text{g}$ para el de grano grueso con huevo y enharinado (tabla 4.3).

Al igual que en rebozados, las muestras que solo tenían huevo presentaron los valores de acrilamida más bajos, enharinar primero como técnica de empanado supone un incremento de aproximadamente 3,5 veces más en el consumo de acrilamida (tabla 4.3). En los empanados el contenido de grasa por ración osciló entre $6,7$ y $15,2 \text{ g}$ ambos valores obtenidos en los empanados con pan rallado de grano grueso. Los empanados realizados con pan rallado y huevo, pero sin enharinar primero, mostraron la mejor relación acrilamida-grasa, $3,53 \mu\text{g}- 3,69 \text{ g}$ para pan rallado de grano grueso y $1,70 \mu\text{g}- 11,97 \text{ g}$ para el pan rallado de grano fino.

Barutcu y col. (2009) estudiaron los efectos de la fritura utilizando microondas en comparación con la fritura tradicional sobre la formación de acrilamida en el empanado de pollo “nuggets” utilizando mezclas de harinas de trigo-maíz, harina de trigo-garbanzos, harina de trigo-arroz y harina de trigo-soja. Establecieron como tiempos óptimos de fritura $1,5 \text{ min}$ en horno microondas y 5 min para la fritura convencional obteniendo en esta última valores entre $13,8\%$ y $34,5\%$ más de acrilamida (88 y $111 \mu\text{g}/\text{kg}$). Al tiempo óptimo de fritura utilizando horno microondas los contenidos de acrilamida son semejantes para las diferentes harinas no así a tiempos superiores para los que se obtienen mayores valores para la harina de soja y de garbanzos por su mayor contenido en asparragina.

El consumo medio al día en España durante el año 2014 (MAGRAMA, 2014) de los siguientes alimentos fue de aproximadamente 70 g para verduras cultivadas por su fruto (berenjenas, calabacines, tomates...), 20 g para cebollas, 40 g para pescados frescos y congelados y 48 g para pollo. Si aplicásemos el mayor valor de acrilamida obtenido ($368 \mu\text{g}/\text{kg}$) y el porcentaje más alto de rebozado/empanado ($47,6\%$), y supusiésemos que como mucho el 10% de todos los productos fueran rebozados/empanados el consumo día de acrilamida sería de aproximadamente de $2,34 \mu\text{g}$, $0,67 \mu\text{g}$, $1,34 \mu\text{g}$ y $1,6 \mu\text{g}$ para verduras cultivadas por su fruto, cebollas, pescados y pollo

respectivamente. Lo que supondría en el peor de los casos un 7,8% del consumo de acrilamida diario procedente de los alimentos rebozados.

Podemos resumir que el utilizar huevo para rebozar hace que el consumo de acrilamida sea menor independientemente del tipo de harina utilizado. Las harinas de garbanzos presentan los menores valores en cuanto al consumo seguida por la de arroz. La sustitución de la leche por agua de forma general produce menor cantidad de acrilamida, aunque el color obtenido en el producto fue más oscuro. En los empanados, enharinar antes de la utilización del pan rallado y huevo incrementa en 3,5 veces el contenido de acrilamida.

4.2.2 Acrilamida y furosina en harina y papillas de cereales infantiles

Puesta a punto de la determinación de acrilamida en papillas infantiles

La acrilamida fue determinada por cromatografía de gases previa formación de un derivado bromado.

El estudio de precisión se realizó sobre las muestras de papilla 12, que se extrajo y se derivatizó 6 veces. La media obtenida es 9,6 µg/kg con una desviación de 1,35 µg/kg. El estudio de recuperación se realizó en la misma papilla adicionando concentraciones conocidas de patrón de acrilamida desde 250 hasta 1000 ppb. La recuperación media fue de 92,45%. El límite de detección calculado como tres veces el ruido fue de 0,22 µg/kg y el límite de cuantificación fue de 0,73 µg/kg.

Cromatogramas representativos de la determinación en este tipo de muestras se observan en las figuras 4.24 y 4.25.

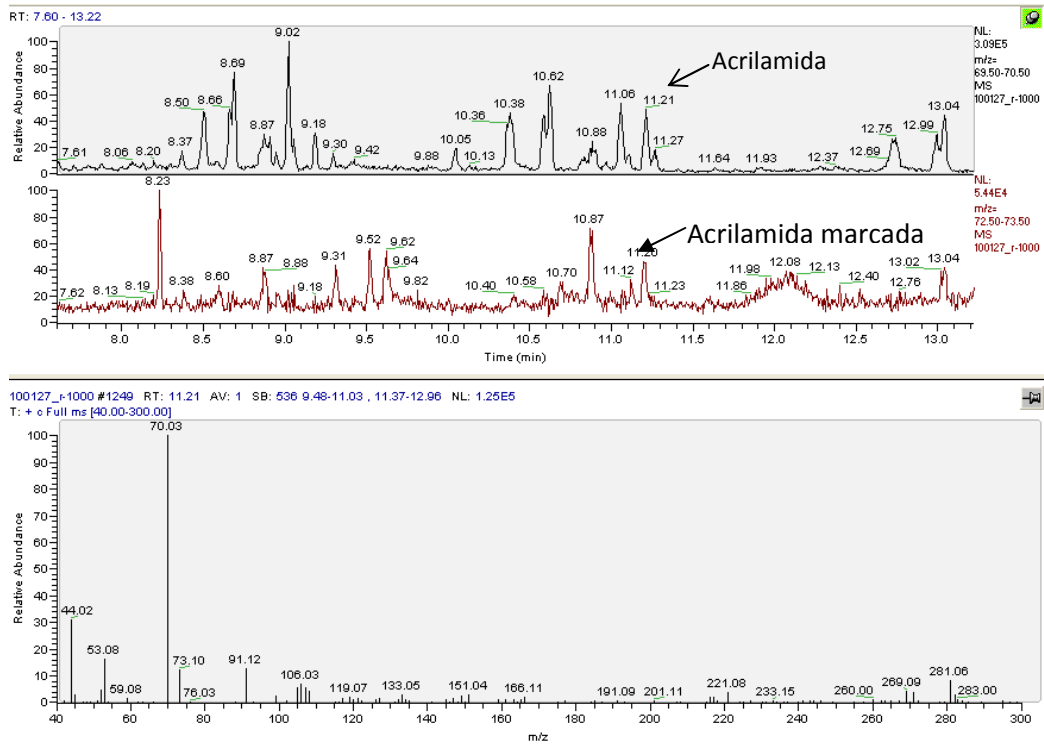


Figura 4.24 Cromatograma y espectro de masas de acrilamida y acrilamida marcada patrón

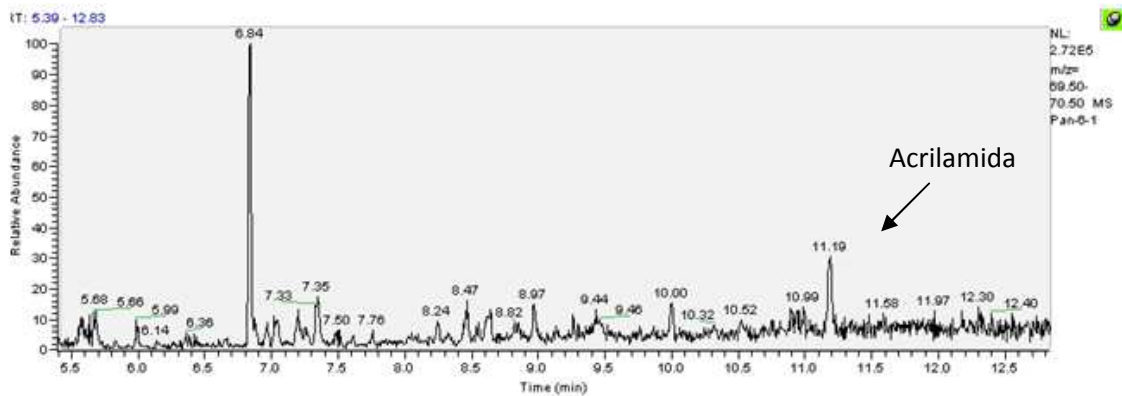


Figura 4.25 Cromatograma de acrilamida en cereales

Determinación de acrilamida durante la elaboración de papillas de cereales

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 (De Vizia y col., 1975). 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 (Guerra-Hernández y Corzo, 1996; Guerra-Hernández y col., 1999).

A este aspecto nutricional hay que sumar el consumo de compuestos potencialmente tóxicos (acrilamida) que pueden formarse en estos procesos y que cobra especial importancia en la población infantil dado el limitado número de alimentos que los bebés pueden consumir y la alta susceptibilidad de los niños por su limitado peso.

La mezcla de harinas crudas en diferentes proporciones son la base para la elaboración de las harinas tostadas, que habitualmente se obtienen a temperaturas entre 140 y 150°C (Guerra-Hernández y col., 1999), la hidrólisis de estas harinas tostadas o sus mezclas y el secado por rodillos es lo que constituye la muestra de papilla final.

No se encontró acrilamida en las harinas crudas y tostadas. El contenido de acrilamida solo fue cuantificado en 4 papillas a niveles detectables con un intervalo entre 2,25-9,60 µg/kg (tabla 3.23). El contenido de estas 4 muestras fue confirmado mediante análisis por HPLC-MS en un centro de referencia (Instituto del Frío, CSIC, Madrid). En ningún caso se llegó a los 50 µg/kg establecidos por la Unión Europea como máximo aceptable.

Los valores encontrados resultaron similares o incluso inferiores a los observados por otros autores en muestras de papillas de cereales; así Roach y col. (2003) encontraron valores inferiores a 10 µg/kg, Pittet y col.,(2004) entre 5 y 62 µg/kg, Croft y col.(2004) inferiores a 25 µg/kg y la Agencia de Seguridad Europea en 2009 recoge valores medios de 55 µg/kg (EFSA, 2009).

Sólo se cuantificó acrilamida en las muestras que contienen cereales con gluten, aunque otros autores como Pittet y col.(2004) han encontrado acrilamida en muestras de arroz. En los cereales, el factor limitante en cuanto a los precursores es el contenido de asparragina 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 (Claus y col., 2008). El

contenido de asparragina (Barutcu y col. 2009) es mayor en las muestras con trigo ($\approx 6,22\text{mg}/100\text{g}$) comparado con las de maíz ($\approx 4,25\text{mg}/100\text{g}$) y arroz ($\approx 0,16\text{mg}/100\text{g}$) lo que explicaría este comportamiento en la acrilamida generada. En la muestras con miel y galleta la adición de más azúcares (miel) o la propia incorporación de acrilamida en los ingredientes (galleta) puede explicar el contenido encontrado en estas papillas.

La OMS (2002) estableció para la acrilamida una dosis sin efecto adverso (NOAEL) de $0,5\text{ mg}/\text{Kg}$ 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 $0,75\text{ }\mu\text{g}/\text{día}$ 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 (2005)

Determinación de furosina durante la elaboración de papillas de cereales

La furosina 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 (Erbersdobler and Hupe, 1991), su determinación, por tanto, estará relacionada de forma indirecta con la pérdida del valor nutritivo y, consecuentemente, con la disminución de la calidad proteica (Resmini y col., 1990). Sin embargo, además de su valor como indicador nutricional podría servir como control indirecto de toxicidad por acrilamida, si existiese una correlación con el citado compuesto. El análisis de furosina es sencillo, rápido y no requiere un equipo de determinación costoso como en el caso de la acrilamida.

Este compuesto se determinó en las muestras siguiendo el método desarrollado por Guerra-Hernández y Corzo (1996).

Las muestras de harina cruda no contienen furosina, sin embargo se detectó en el tostado de las harinas en valores que oscilaron entre $11,5$ y $34,6\text{ mg}/100\text{ g}$ de proteína (tabla 3.23), similares a los encontrados en bibliografía (Guerra-Hernández y col., 1999). El contenido de furosina en papillas fue mucho mayor, entre $122\text{ mg}/100\text{ g}$ para la papilla de maíz y tapioca y $1193\text{ mg}/100\text{ g}$ de proteína en una papilla de 8 cereales y miel (B). La hidrólisis que sigue al tostado de las harinas, proceso seguido por esta fábrica, produce una gran cantidad de glucosa que reacciona con la lisina de las proteínas en condiciones idóneas de temperatura y humedad. Estos resultados son similares

a los obtenidos por Guerra-Hernández y Corzo (1996) y Guerra-Hernández y col.(1999) en papillas infantiles y por Rada-Mendoza y col. (2004) en cereales y derivados.

Nuestro grupo de investigación (Fernández Artigas y col., 1996) estableció que estos valores de furosina suponen pérdidas de lisina entre un 5 y un 50%, pérdidas que en nuestra sociedad no deberían representar problemas nutricionales al prepararse estas papillas con leche, producto rico en lisina.

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, valores elevados y probablemente por el mismo motivo han sido encontrados en la muestra de cereales y fruta, estos datos son similares a los obtenidos por Guerra-Hernández y Corzo (1996). El valor relativamente alto obtenido en muestras de cereales sin gluten (arroz y maíz) y en la muestra de arroz se justifica por el contenido relativamente alto de lisina que presenta el arroz. La adición de FOS a la muestras condiciona la dilución del contenido final y por tanto la disminución en el valor de furosina obtenido. La diferencia tan notable encontrada en las dos papillas con cacao se debe a que están elaboradas con mezcla de cereales diferentes en proporción y tipo.

La relación entre furosina y acrilamida fue de $R^2=0,4641$ y si no se tienen en cuenta los dos valores que están por debajo del límite de cuantificación ésta llega a 0,9203. Esto parece demostrar que en los cereales y cuando el nivel de asparragina 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. Al no haber aparecido en todas las muestras analizadas limitaría su uso al control dentro del mismo tipo de muestras.

Determinación de acrilamida y furosina en papillas comerciales

La tabla 3.24 muestra el contenido de acrilamida, furosina y porcentaje de proteínas de papillas obtenidas en el comercio.

Solo se detectó acrilamida en tres muestras, dos de ellas en valores más altos que las muestras de papillas obtenidas de la industria (tabla 3.24). Estas muestras corresponden a seis casas comerciales diferentes, cuatro de ellas con un solo producto y 2 con varios. Como en el caso anterior sólo se detectó acrilamida en un porcentaje bajo de muestras y únicamente en aquellas con gluten (harina de trigo). Dos de las muestras pertenecían a casas en las que sólo se analizó un producto, encontrando en una de ellas el valor más alto (25 µg/kg), el proceso de elaboración y los ingredientes que cada casa utiliza influirán decisivamente en este contenido. Como en el caso anterior no se encontraron muestras con valores superiores al máximo aconsejable para estos productos (50µg/kg).

Si tenemos en cuenta las muestras del apartado anterior se han analizado 32 papillas de cereales. Acrilamida fue detectada en el 22% de las muestras con un valor medio en ellas inferior a 10µg/kg

Todas las muestras tienen furosina con valores diferentes en las distintas casas comerciales pero próximos cuando se trata de la misma casa, media de 550 mg/100g de proteína para la marca B (3 muestras) y de 260 mg/100g de proteína para la marca D (2 muestras). Las muestras con menor contenido en furosina son las que proceden de las casas comerciales E y F con valores significativamente más bajos que el resto de muestras (<100 mg/100g de proteína) lo que indica que el proceso de elaboración es probablemente distinto y el influyente en estos valores tan distintos, hay que recordar que el contenido de furosina en las harinas es prácticamente nulo. Al igual que en el estudio anterior las muestras sin gluten dentro de la misma marca poseían mayor valor que las muestra con gluten, debido al mayor contenido de lisina del arroz.

La relación furosina-acrilamida en las muestras en las que se determinó ambos compuestos fue de $r=0,640$, casi significativa, sin embargo cuando se incluyen los datos del estudio anterior esta baja a $r=0,146$ y si se dan valores de cero a la acrilamida no detectada en este segundo estudio la relación fue de $r=0,105$, lo que confirma lo ya apuntado en el estudio anterior, la no utilidad de la furosina de forma indiscriminada como control de la presencia de acrilamida en el producto final.

4.2.3 Acrilamida e indicadores de pardeamiento en productos de panadería-bollería

4.2.3.1. Panes

Influencia del tiempo de tostado en el pan de molde integral

El pan es un alimento de gran consumo en España, con un promedio de 53,8 kg/año. El pan es un alimento que sufre un calentamiento durante su elaboración, pero opcionalmente, puede someterse a un tratamiento térmico posterior que influirá en la mejora de sus cualidades organolépticas pero también en la posible generación de compuestos derivados de la reacción de Maillard, como acrilamida.

Rebanadas de pan de molde integral por duplicado fueron tostadas de 1 a 6 min y posteriormente analizadas para ver la evolución de acrilamida y de algunos indicadores de pardeamiento químico (furosina, HMF, furfural y GIM). Dentro de estos indicadores se ha ensayado un método de determinación de compuestos de Maillard fluorescentes rápido y sensible, mediante un lector de fluorescencia de microplacas. Este método esporádicamente se utiliza en la medida de los productos avanzados de glicación en muestras sanguíneas.

La tabla 3.25 muestra unos valores esperados según el proceso en estudio. La humedad del producto disminuye de forma casi proporcional al aumentar el tiempo de tostado. El contenido en acrilamida se incrementa conforme aumenta el tiempo de exposición de los precursores contenidos en el pan a altas temperaturas desde 9,9 a 91 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y el valor de los indicadores de pardeamiento químico de etapas avanzadas (HMF, furfural y GIM) se hace mayor cuanto más tiempo pasa el pan en la tostadora, pardeamiento que también fue evidente a la vista. El tiempo de calentamiento también incrementó los valores de fluorescencia.

En cuanto al contenido en furosina, los valores para el pan que lleva un mayor tiempo de tostado, 5 y 6 minutos, son más bajos que cuando el pan está sin tostar, sin embargo son un poco más altos en un tiempo intermedio de tostado (2-4 minutos). Como indicador de primeras etapas desciende pasados los dos minutos por lo que su utilidad como indicador nutricional es pequeña.

Valores similares de acrilamida han sido encontrados por otros autores que no suelen encontrar valores superiores a 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Jackson y Al-Taher, 2005, Normandim y col., 2013). Hellenäs, (2014), como parte del proyecto HEATOX, realizó un tostado similar con panes de molde elaborados con harina de trigo y trigo-centeno encontrando que los valores de acrilamida antes de tostar eran de 3-8 $\mu\text{g} / \text{kg}$, valores entre 16 y 61 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para un nivel medio de

tostación y hasta 118 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en la tostación más alta. Estos valores descienden si se raspa y elimina la parte más tostada.

Las diferencias para todos los indicadores entre todos los tiempos de tostado fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) excepto para la furosina entre el pan de molde sin tostar y tostado 1 min y para la acrilamida entre los 4 y 5 minutos.

La tabla 4.4 muestra las correlaciones obtenidas entre las diferentes variables analizadas.

Tabla 4.4 Correlaciones entre indicadores en tostado de pan de molde

		FUROSINA	HMF	FURFURAL	GIM	URF	TIEMPO DE TOSTADO
ACRILAMIDA	Correlación de Pearson	-,526*	,917**	,859**	,976**	,932**	,968**
	Sig. (bilateral)	,044	,000	,000	,000	,000	,000
	N	15	15	15	15	15	18
FUROSINA	Correlación de Pearson		-,723**	-,732**	-,636**	-,756**	-,442
	Sig. (bilateral)		,001	,001	,005	,001	,066
	N		18	18	18	15	18
HMF	Correlación de Pearson			,910**	,967**	,994**	,906**
	Sig. (bilateral)			,000	,000	,000	,000
	N			18	18	15	18
FURFURAL	Correlación de Pearson				,941**	,932**	,871**
	Sig. (bilateral)				,000	,000	,000
	N				18	15	18
GIM	Correlación de Pearson					,977**	,961**
	Sig. (bilateral)					,000	,000
	N					15	18
URF	Correlación de Pearson						,910**
	Sig. (bilateral)						,000
	N						15
*. La correlación es significativa al nivel 0,05 (bilateral).							
**. La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).							

El contenido de acrilamida se correlacionó a valores de R^2 superiores 0,7540 con el tiempo de tostado, humedad, HMF, furfural, GIM y UFR, las correlaciones más altas se obtuvieron con el tiempo de tostado, humedad y GIM (figuras 4.26 a 4.28).

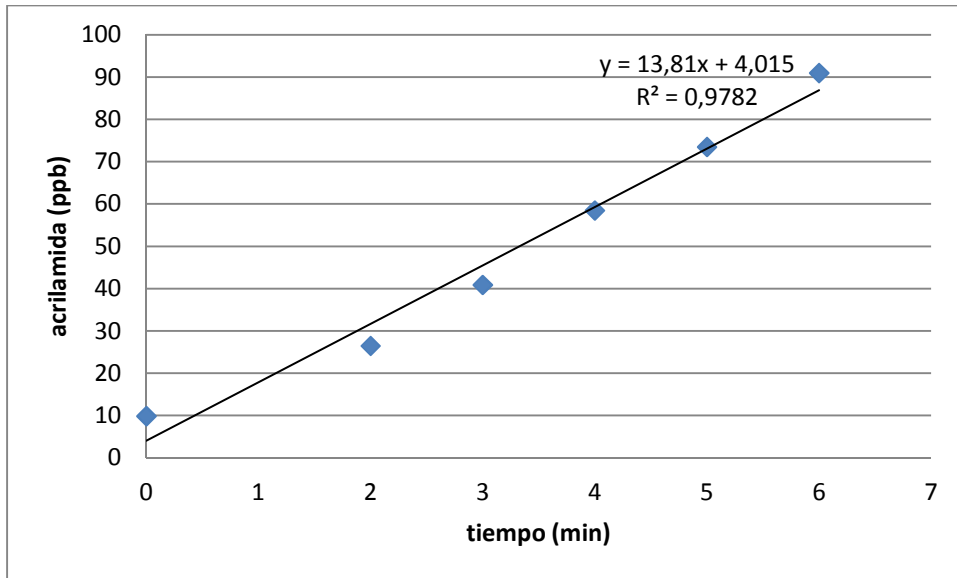


Figura 4.26 Relación entre acrilamida y tiempo de tostado

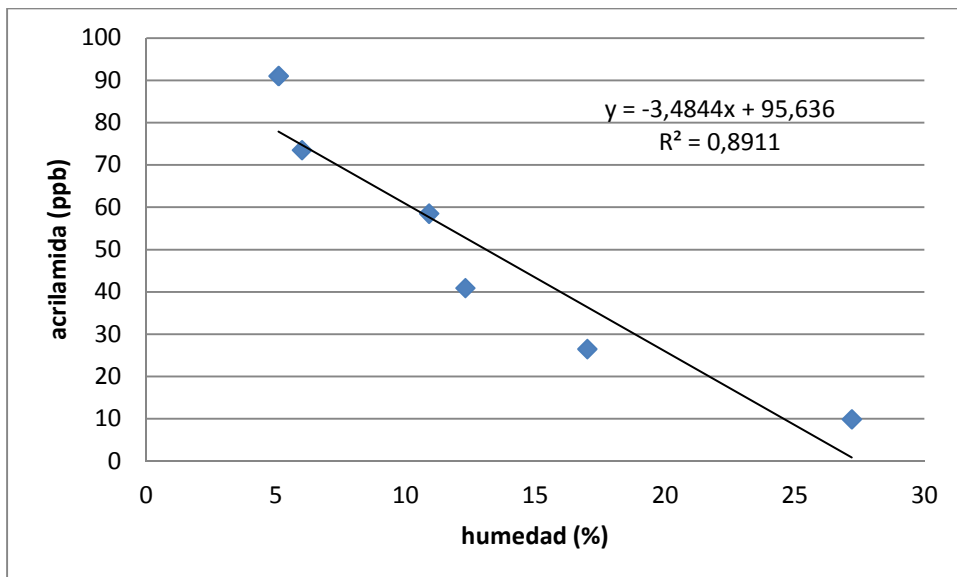


Figura 4.27 Relación entre acrilamida y humedad durante el tostado del pan

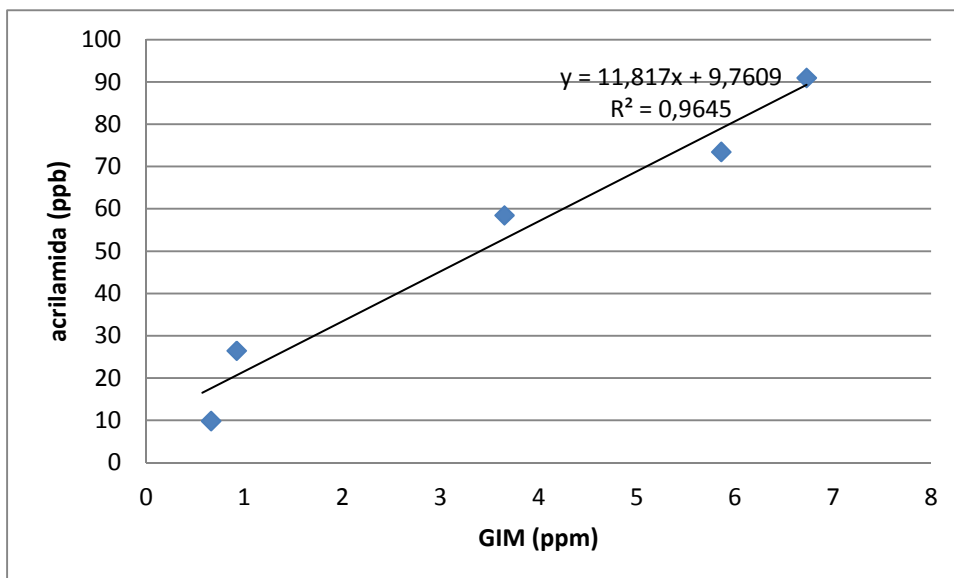


Figura 4.28 Relación entre acrilamida y GIM durante el tostado del pan

También una alta correlación se obtuvo con la medida de fluorescencia (figura 4.29). Este método podría permitir realizar screening muy rápidos para el control de los niveles de acrilamida en productos de igual composición.

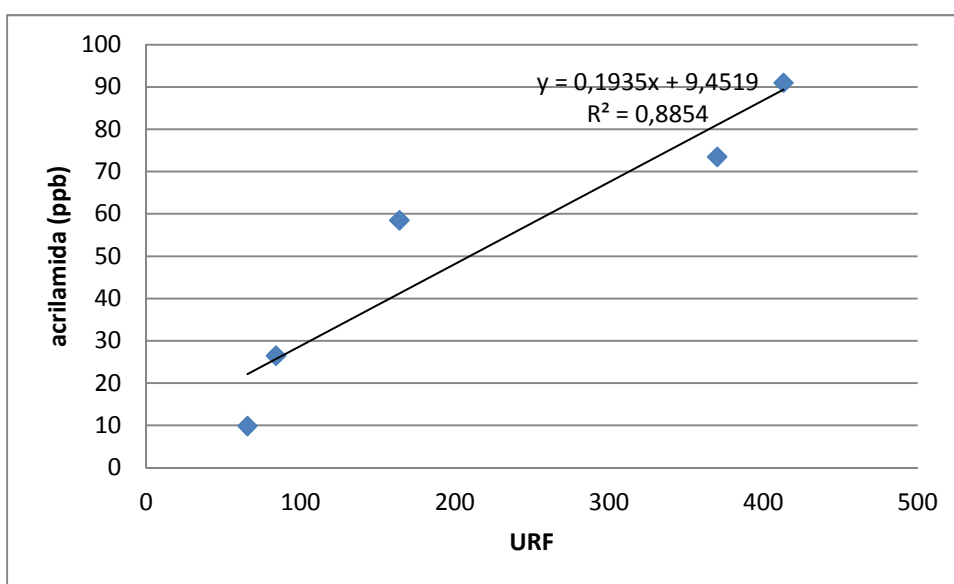


Figura 4.29 Relación entre acrilamida y URF durante el tostado del pan

De los indicadores clásicos el mejor para el control de acrilamida podría ser el GIM que también al igual que al acrilamida necesita azúcares y un aminoácido específico, en este caso la glutamina.

En todos los tiempos ensayados las muestras eran comestibles, esto indica que una persona en su dieta habitual puede consumir 10 veces más de acrilamida según el tiempo de tostado del pan. Pasados los dos minutos de

tostación todos los indicadores, excepto furosina incrementaron su valor a más del doble, igual que lo hizo la acrilamida. Tiempos de 1 ó 2 minutos en los que los valores de humedad no bajen del 17% serían los adecuados ya que el producto adquiere características organolépticas deseables y la formación de compuestos tóxicos no se dispara.

Influencia del tamaño en fritura

Los picatostes son un producto elaborado de forma casera para acompañar sopas y cremas. En la tabla 3.26 vemos como el contenido en acrilamida del producto final es significativamente más alto (7 veces mayor, 388 µg/kg) cuando las dimensiones del pan son menores ya que el contenido de humedad final fue mucho menor. Los indicadores se comportaron de igual forma al estudio de tostado anterior, menor valor de furosina a mayor de acrilamida y también de HMF, furfural y GIM. Cuando se suman los valores obtenidos en el pan frito a los de pan tostado las relaciones obtenidas entre acrilamida, HMF, furfural y GIM permanecen altas $R^2= 0,7207$, sin embargo en este caso la mejor se obtuvo con el furfural ($R^2=0,9466$).

La diferencia de dimensiones de una muestra respecto a otra no llega a ser del doble sin embargo debido al pequeño tamaño es fácil la pérdida de humedad en el producto lo que generó 7 veces más de acrilamida.

La contribución de la acrilamida proveniente de alimentos preparados de forma casera no debe ser despreciada y tiene que ser conocida por la población en general. En este sentido junto con la Caja de Herramientas, principalmente dirigida a las industrias, se dan recomendaciones completas en periódicos, revistas e Internet, donde existen paginas específicas (<http://www.acrylamidefacts.org>) que a veces incluyen eslogan como “dorado más que carbonizado”.

4.2.3.2. Productos de bollería

Este estudio se realizó en productos de bollería habitualmente consumidos en nuestra área que fueron preparados por una industria elaboradora para su venta en el comercio. Se analizaron bollos que mostraban coloraciones de distinta intensidad (Tabla 3.27).

Todas las muestras con mayor coloración presentaban valores de humedad inferiores lo que demuestra el tratamiento térmico más intenso.

En general se detectan valores más elevados de acrilamida e indicadores de pardeamiento químico (furosina, HMF, furfural y GIM) en las muestras con más intensidad de color. Así para acrilamida el valor medio de las muestras que poseían más color fue de 32,6 µg/kg versus 24,0 µg/kg para las de menos color, en furosina 221 mg/100g de proteína versus 215 mg/100g de proteína, en HMF 11,8 mg/kg versus 2,6 mg/kg, en furfural 1,6 mg/kg versus 0,78 mg/kg y en GIM 1,23 mg/kg versus 0,58 mg/kg para las muestras con más color frente a las de menos color siendo la diferencia entre los valores medios estadísticamente significativa ($p < 0,01$) para todas las variables excepto para furosina y furfural.

Los valores de furosina son muy variables, desde 62 mg/100g de proteína de la escarcha redonda hasta 488 mg/100g de proteína de la medianoche (a), no se encontraron diferencias estadísticas ($p < 0,05$) entre los bollos con diferente intensidad excepto entre las muestras de media noche, suizo grande y hojaldre en el que el comportamiento fue diferente, en la primera mayor valor a mayor intensidad y en las dos últimos (suizo grande y hojaldre) al revés, mayor valor a menor intensidad de tratamiento como era de esperar para indicadores de primeras etapas de la reacción de Maillard.

El valor medio de acrilamida en productos de bollería fue de 28,9 µg/kg, valores bajos en comparación con el contenido de acrilamida en rebozados, empanados, panes tostados a tiempos superiores a 3 minutos o patatas fritas, del orden de los del pan tostado dos minutos y superiores a los del pan de molde integral y papillas de cereales. Estos valores van desde los 15 µg/kg de la palmera mallorquina (b) hasta los 47,3 µg/kg de la caracola (a). Los productos con un contenido ≥ 40 µg/kg son la caracola(a), la palmera mallorquina(a) y la torta Inés Rosales. Los que presentan niveles más bajos ≤ 20 µg/kg son la palmera mallorquina (b), la palmera (b) y el hojaldre (a). Las diferencias entre la misma muestra con diferente intensidad de color fueron estadísticamente significativas ($p < 0,05$) para todas los bollos excepto para la media noche y suizo tanto grande como pequeño. Notables diferencias entre tratamientos fueron observados en la caracola, palmera mallorquina y palmera, donde los incrementos en los valores de acrilamida para las muestras más tostadas oscilaban entre el 68% para la palmera y el 215% para la palmera mallorquina.

Es difícil comparar estos valores con los de la bibliografía ya que la elaboración de estos productos es muy variable, junto a los ingredientes básicos (harina, agua, sal y levadura o agentes gasificantes) se pueden presentar otros como grasa o aceite, azúcares, huevos, productos lácteos, miel, frutas, frutos secos, especias y chocolate dependiendo de recetas propias de regiones o países concretos. Se han publicado valores entre 12 y 280 µg/kg y en ellos se incluyen productos tan dispares como croissants, magdalenas, obleas, gofres (Svensson y col., 2003, Koningsy col, 2003 Cressey y col. 2011 y Normandin y col., 2013)

Los valores de HMF obtenidos para estos productos oscilan entre 0,41 mg/kg (suizo pequeño b) y 60 mg/kg (palmera mallorquina a). Valores menores o próximos a 1 mg/kg se encontraron en ambas medias noches, suizo pequeño (b) y ambas escarchas. Se encontraron diferencias estadísticas entre intensidad de color ($p < 0,05$) para todas las muestras excepto para caracola.

Los valores de furfural oscilaron entre 0,08 mg/kg (escarcha larga) y 4,33 mg/kg (suizo pequeño a). Se encontraron diferencias estadísticas entre intensidad de color ($p < 0,05$) para todas las muestras excepto para el hojaldre.

Los valores de GIM fueron entre 0,01 mg/kg (media noche b) y 2,14 mg/kg (palmera a). Valores superiores a 1 mg/kg se encontraron en el 47% de las muestras. Se encontraron diferencias estadísticas entre intensidad de color ($p < 0,05$) en todos los bollos.

Los productos de bollería analizados son todos productos horneados pero elaborados con diferentes ingredientes y proceso lográndose texturas diferentes en el producto final que les hace a unos retener más humedad que a otros. Los productos hojaldrados son los que presentan menor humedad (8,62%) y los elaborados de forma semejante al pan (suizos y medias noches) mayor humedad (20,5%). Si separamos ambos grupos, los valores obtenidos para los hojaldrados son superiores para la acrilamida e indicadores de pardeamiento químico e inferiores en furosina (acrilamida 30,4 versus 26,3; HMF 9,4 versus 2,1; furfural 1,2 versus 1,0; GIM 1,2 versus 0,3 y furosina 157 versus 346). Precisamente los hojaldrados de diferente color son los únicos bollos en los que existieron diferencias estadísticas para el contenido de acrilamida. Por tanto será en este tipo de productos donde se tenga que prestar especial atención ya que en el peor de los casos (palmera mallorquina) el consumir un producto más o menos tostado hace ingerir 3 veces más de acrilamida.

La relación entre humedad y contenido de acrilamida también ha sido encontrada por otros autores, Ahrné y col., (2007) la estableció durante el horneado del pan blanco. Por otra parte el efecto del grosor del producto que condiciona la velocidad de secado y que hace que productos con menos volumen presenten mayor contenido de acrilamida también han sido descritos (Açar y Gökmen 2009).

La tabla 4.5 muestra las correlaciones obtenidas entre las variables analizadas. La acrilamida sólo se correlacionó significativamente con el GIM y

entre indicadores de pardeamiento hubo correlaciones entre furosina y HMF; furosina y GIM y entre HMF y GIM.

Tabla 4.5 Relaciones entre indicadores en tostado en productos de bollería

Correlaciones						
		ACRILAMIDA	LN fursoina	GIM	LN HMF	LN furfural
ACRILAMIDA	Correlación de Pearson		,134	,426**	,260	,008
	Sig. (bilateral)		,349	,002	,066	,954
	N		51	51	51	51
LN fursoina	Rho de Spearman			-,634**	-,381**	-,100
	Sig. (bilateral)			,000	,006	,486
	N			51	51	51
GIM	Correlación de Pearson				,665**	,239
	Sig. (bilateral)				,000	,092
	N				51	51
LN HMF	Correlación de Pearson					,256
	Sig. (bilateral)					,070
	N					51

** . La correlación es significativa al nivel 0,01 (bilateral).

Si bien la relación entre acrilamida e indicadores de Maillard es habitualmente encontrada para un mismo producto con diferente intensidad de tratamiento es más difícil encontrarla en productos comerciales de diferente composición, así Rufián-Henares y col (2006b) no la obtuvieron entre acrilamida, con HMF, furosina o color.

GIM fue el único indicador clásico de las reacciones de pardeamiento químico que se correlacionó con acrilamida (Tabla 4.5 y figura 4.30, sólo representados los valores medios) y también se correlacionó con furosina (tabla 4.5 y figura 4.31).

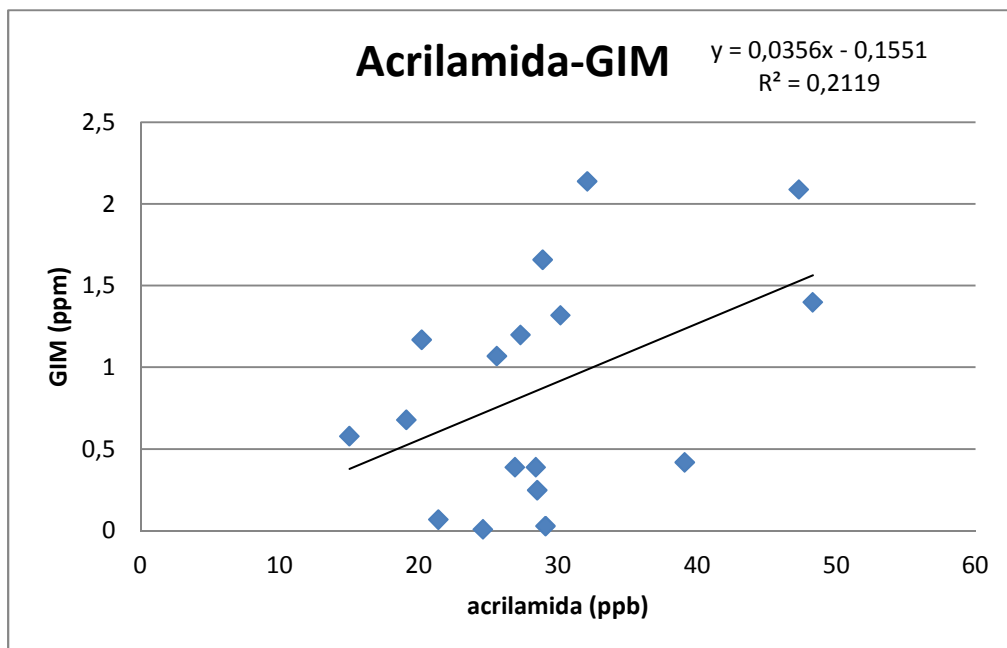


Figura 4.30 Relación entre acrilamida y GIM en productos de bollería

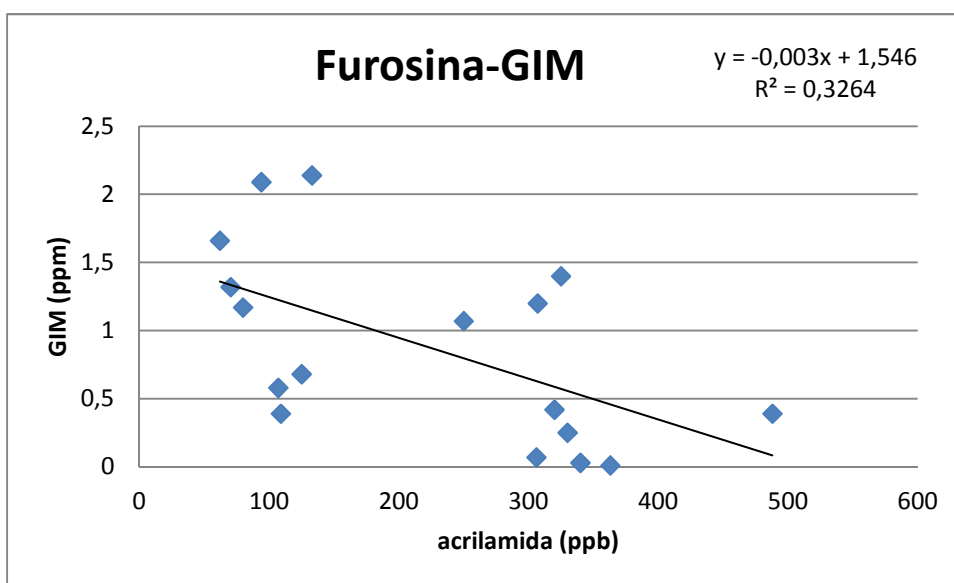


Figura 4.31 Relación entre furosina y GIM en productos de bollería

Al igual que en el pan tostado el GIM fue el indicador que más se correlacionó con la acrilamida, como ya se comentó GIM es un indicador exclusivo de reacción de Maillard en el que participa de forma principal un aminoácido como en el caso de la acrilamida, aunque en este caso es la glutamina en vez de la asparragina. También el GIM se correlacionó como en el pan tostado con la furosina. Por lo que a falta de realizar estudios programados podría utilizarse como indicador toxicológico (acrilamida) y nutricional (furosina).

5. CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado dos métodos de determinación de precursores de acrilamida. Los inespecíficos podrían usarse como control rápido de los mismos en patatas crudas.
2. La selección de la variedad de patata y su expresión en el etiquetado está relacionada con la calidad del producto pero no siempre con el riesgo toxicológico.
3. La adición de bisulfito sódico al 1%, ácido cítrico al 0,5-1%, bicarbonato sódico al 1% y ácido ascórbico al 0,5% al agua de remojo de patatas destinadas a fritura redujo el contenido de acrilamida en el producto final independientemente de la temperatura de fritura.
4. La adición de bisulfito sódico da lugar un producto final más claro y con menor contenido de acrilamida.
5. El remojo con ácido cítrico produce una reducción de acrilamida del 50% y el color es similar al obtenido con el remojo sin adición del ácido.
6. Se encontró correlación entre el color y el contenido de acrilamida en las patatas fritas tras distintos procesos de remojo.
7. Teniendo en cuenta la ingesta de patatas fritas tipo frances de la población encuestada el consumo de acrilamida es de $0,35\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$.
8. La acrilamida fue detectada en el 22% de las papillas de cereales analizadas con un valor medio inferior a $10\mu\text{g}/\text{kg}$.
9. La harina de garbanzos produce menor cantidad de acrilamida en el rebozado comparada con las harinas de arroz, maíz-trigo y trigo en productos con similares características organolépticas.
10. La sustitución de leche por agua como ingrediente del rebozado produce menor cantidad de acrilamida aunque el color obtenido en el producto fue más oscuro.
11. La utilización de huevo, en vez de leche o agua como ingrediente del rebozado, hace que el consumo de acrilamida sea menor independiente de la harina utilizada.

12. Enharinar antes de empanar incrementa el contenido de acrilamida en 3,5 veces.
13. El tostado del pan de molde a valores de humedad inferior al 17% produce un incremento notable en la formación de acrilamida.
14. Se propone una medida rápida de fluorescencia para estandarizar las condiciones de tostado de pan de molde.
15. La correlación entre acrilamida e indicadores clásicos de la reacción de Maillard (HMF, furfural y GIM) es muy alta en el tostado de pan de molde. El GIM es el único indicador que mantiene una alta correlación en productos de bollería con diferente composición.
16. Productos de bollería similares pero con diferente intensidad de color presentaban diferente contenido en acrilamida siendo más evidente en productos hojaldrados donde también el valor de acrilamida fue superior.

6. BIBLIOGRAFÍA

Açar OC, Gökmen V. Investigation of acrylamide formation on bakery products using a crust-like model. *Mol Nutr Food Res* 2009;53(12):1521–5

Adrian, J. Nutritional and physiological consequences of the Maillard reaction. *World Rev. Nutr. Diet.*, 1974, 19, 71-122.

Adrian, J.; Fragne, R. Le reaction de Maillard VIII. Role des pre-melanoidines sur la digestibilite azotée et la proteolyse in vitro. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1973, 27, 111-123.

Adrian, J.; Fragne, R.; Petit, L.; Godon, B.; Barbier, J. Nutritional repercussions of soluble products formed during the Maillard reaction. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1966, 20, 257-277.

Ahrné, L.; Andersson, C.G.; Floberg, P.; Rosén, J.; Lingnert, H. Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. *LWT Food Sci Technol*, 2007, 40, 1708-1715.

Alais, C., Linden, G. Manual de Bioquímica de los Alimentos. Barcelona: Masson, 1990.

Albalá-Hurtado, S.; Bover-Cid, S.; Izquierdo-Pulido, M.; Veciana-Nogués, T.; Vidal Carou, C. Determination of available lysine in infant milk formulae by HPLC. *J. Chrom.*, 1997, 778, 235-241.

Albalá-Hurtado, S.; Veciana-Nogués, T.; Mariné-Font, A.; Vidal Carou, C. Progress of Browning Reactions during Storage of Liquid Infant Milks. *J. Agric. Food Chem.*, 1999, 47, 4033-4037.

Amrein, T.M., Schönbachler, B., Escher, F. et al. Acrylamide in gingerbread: Critical factors for formation and possible ways for reduction. *J. Agric. Food Chem.*, 2004a, 52, 4282-4288.

Amrein, T.M.; Andres, L.; Manzardo, G.G.; Amado, R. Investigations on the promoting effect of ammonium bicarbonate on the formation of acrylamide in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, 54, 10253-10261.

Amrein, T.M.; Bachmann, S.; Noti, A.; Biedermann, M.; Barbosa, M.F.; Biedermann-Brem, S.; et al. Potential of acrylamide formation, sugars, and free asparagine in potatoes: A comparison of cultivars and farming systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 5556-5560.

Amrein, T.M.; Schönbachler, B.; Rohner, F., Lukac, H.; Schneider, H.; Keiser, A.; Escher, F.; Amado, R. Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest. *Eur. Food Res. Technol.*, 2004b, 219, 572-578.

Anderson, K.E.; Sinha, R.; Kulldorff, M.; Gross, M.; Lang, N.P.; Barber, C.; et al. Meat intake and cooking techniques: associations with pancreatic cancer. *Mut Res.*, 2002, 506-507, 225-231.

Anese, M.; Bortolomeazzi, R.; Manzocco, L.; Manzano, M.; Giusto, C.; Nicoli, M.C. Effect of chemical and biological dipping on acrylamide formation and sensory properties in deep-fried potatoes. *Food Res. Intern.*, 2009, 42, 142-147

AOAC. Moisture in flour.925.10. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K. (Ed), 15th edn. Arlington, Virginia, 1990.

AOAC. Moisture in frozen French-fried potatoes. 984.25. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Helrich, K. (Ed), 15th edn. Arlington, Virginia, 1990.

Archer, C.L.; Morse, P.; Jones, R.F.; Shirai, T.; Haas, G.P., Wang, C.Y. Carcinogenicity of the N-hydroxy derivative of 2-amino-1-methyl-6- phenylimidazo [4,5-b] pyridine, 2-amino-3,8-dimethyl-imidazo[4,5-f]quinoxaline and 3,2dimethyl-4-aminobiphenyl in the rat. *Cancer Letters*, 2000, 151, 55-60.

Arribas Lorenzo, G. Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesamiento de alimentos. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid. 2013. En: <http://eprints.ucm.es/22281/1/T34594.pdf> . Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Arribas-Lorenzo, G.; Morales, F.J. The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions. *Food Chem.* 2008, 109: 421–425.

Ashoor, S.H.; Zent, J.B. Maillard browning of common amino acids and sugars. *J. Food Sci.*, 1984, 49, 1206-1207.

Baardseth, P.; Blom, H.; Skrede, G.; Mydland, L.T.; Skrede, A.; Slinde, E. Lactic acid fermentation reduces acrylamide formation and other Maillard reactions in French fries. *J. Food Sci.*, 2006, 71, 28-33.

Bagdonaite, K.; Viklund, G.; Skog, K.; Murkovic, M. Analysis of 3-aminopropionamide: A potential precursor of acrylamide. *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2006, 69, 215-221.

Baliga, B.P.; Bayliss, M.E.; Lyman, C.M. Determination of free lysine -amino groups in cottonseed meals and preliminary studies on relation to protein quality. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1959, 84, 1-6.

Balogh, Z.; Gray, J.I.; Goma, E.; Booren, A.M. Formation and inhibition of heterocyclic aromatic amines in fried ground beef patties. *Food Chem. Toxicol.*, 2000, 38, 395-401.

Barrett, J.H., Smith, G., Waxman, R., Gooderham, N., Lightfoot, T., Garner, R.C., et al. Investigation of interaction between acetyltransferase 2 and heterocyclic amines as potential risk factors for colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 2003, 24, 275-282.

Barutcu, I.; Sahin, S.; Sumnu, G. Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *LWT- Food Sci. Technol.* 2009, *42*, 17-22.

Bassama, J.; Brat, P.; Bohuon, P.; Boulanger, R.; Gunata, Z. Study of acrylamide mitigation in model system: Effect of pure phenolic compounds. *Food Chem.*, 2010, *123*, 558-562.

Baum, M.; Böhm, N.; Görlitz, J.; Lantz, I.; Merz, K. H.; Ternité, R.; Eisenbrand, G. Fate of ¹⁴C acrylamide in roasted and ground coffee during storage. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2008, *52*, 600-608.

Becalski, A.; Lau, B.P.Y.; Lewis, D.; Seaman, S.W.; Hayward, S.; Sahagian, M.; et al. Acrylamide in French fries: Influence of free amino acids and sugars. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, *52*, 3801-3806.

Becalski, A.; Stadler, R.; Hayward, S.; Kotello, S.; Krakalovich, T.; Lau, B.P.Y., et al.. Antioxidant capacity of potato chips and snapshot trends in acrylamide content in potato chips and cereals on the Canadian market. *Food Addit. Contam.*, 2010, *27*, 1193-1198.

Bermudo, E.; Moyano, E.; Puignou, L.; Galceran, M.T. Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in typical Spanish products. *Talanta*, 2008, *76*, 389-394.

Bertelli, L.; Torreggiani, D.; Bertolo, G. Nonenzymatic browning in hydrolyzed concentrated cheese whey permeate. *Food Chem.*, 1996, *55*, 353-358.

Biedermann, M.; Grob, K. Model studies on acrylamide formation in potato, wheat flour and corn starch, ways to reduce acrylamide contents in bakery ware. *Mitt. Lebensm. Hyg.* 2003, *94*, 406-422.

Biedermann, M.; Noti, A.; Biedermann-Brem, S.; Mozzetti, V.; Grob, K. Experiments on acrylamide formation and possibilities to decrease the potential of acrylamide formation in potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 2002, *93*, 668-687.

Birlouez-Aragon, F.; Sabat, P.; Lutz, B.; Leclere, J.; Nicolas, M. Addition of lactose and vitamin C to growth milk reduces the nutritional quality of proteins. *Lait*, 1999, *79*, 595-606.

Blank, I.; Robert, F.; Goldmann, T.; Pollien, P.; Varga, N.; Devaud, S., et al. Mechanisms of acrylamide formation – Maillard-induced transformation of asparagine. En *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Eds. M. Friedman y D. Mottram, pp. 171-189. New York: Springer. 2005.

Blenkinsop, R.W.; Copp, L.J.; Yada, R.Y.; Marangoni, A.G. Changes in compositional parameters of tubers of potato (*Solanum tuberosum*) during lowtemperature storage and their relationship to chip processing quality. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, *50*, 4545-4553.

Boctor, A.M.; Harper, A. E. Measurement of available lysine in heated and unheated foodstuffs by chemical and biological methods. *J. Nutr.*, 1968, *94*, 289-96.

- Bohart, G.S.; Carson, J.F. Effects of trace metals, oxygen and light on the glucose-glycine browning reaction. *Nature*, 1955, *175*, 470-471.
- Bookwalter, G.N.; Kwolek, W.F. Predicting protein quality of corn-soy-milk blends after nonenzymatic browning. *J. Food Sci.*, 1981, *46*, 711-715.
- Booth, V.H. Problems in the determination of FDNB-available lysine. *J. Sci. Food Agric.*, 1971, *22*, 658-666.
- Brathen, E.; Kita, A.; Knutsen, S.H.; Wicklund, T. Addition of glycine reduces the content of acrylamide in cereal and potato products. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, *53*, 3259-3264.
- Brathen, E.; Knutsen, S.H. Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chem.*, 2005, *92*, 693-700.
- Brierley, E.R.; Bonner, P.L.R.; Cobb, A.H. Aspects of amino acid metabolism in stored potato tubers. *Plant Sci.*, 1997, *127*, 17-24.
- Brunton, N.P.; Gormley, R.; Butler, F.; Cummins, E.; Danaher, M.; Minihan, M.; O'Keefe, M.A. Survey of acrylamide precursors in Irish ware potatoes and acrylamide levels in French fries. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2007, *40*, 1601-1609.
- Bujard, E.; Finot, P.A. Measure de la disponibilite et du blocage de la lysine dans les laits industriels. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1978, *32*, 291-305.
- Burton, H.S.; McWeeney, D.J. Consideration of sugar stability. *Nature*, 1963, *197*, 266-268.
- Capuano, E.; Oliviero, T.; Açar, Ö.Ç.; Gökmen, V.; Fogliano, V. Lipid oxidation promotes acrylamide formation in fat-rich model systems. *Food Res. Int.*, 2010, *43*, 1021-1026.
- Cardenas, J.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Determination of furosine in honey. *J. Liq. Chrom. Relat. Tech.*, 2003, *26*, 317-326.
- Cardenas, J.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Furosine is a useful indicator in pre-baked breads. *J. Sci Food Agric.*, 2004, *84*, 366-370.
- Carpenter, K.J. The estimation of the available lysine in animal-protein foods. *Biochem. J.*, 1960, *77*, 604-610.
- Carpenter, K.J.; Ellinger, G.M. Protein quality and available lysine in animal products. *Poultry Sci.*, 1955, *34*, 1451-1452.
- Casado, F.J., Sanchez, A.H., Montano, A. Reduction of acrylamide content of ripe olives by selected additives. *Food Chem.*, 2010, *119*, 161-166.
- Chávez-Servín, J.L.; Castellone A.I.; López-Sabater, M.C. Evolution of potential and free furfural compounds in milk-based infant formula during storage. *Food Res Int.*, 2006, *39*, 536-543.

Cheftel, J.C.; Cheftel, H. Introducción a la bioquímica de los alimentos. Ed. Acribia, pp. 306-308. Zaragoza, 1980.

Claeys, W.L.; De Vleeschouwer, K.; Hendrickx, M. E. Kinetics of acrylamide formation and elimination during heating of an asparagine-sugar model system. *J. Agric. Food Chem.*, 2005a, 53, 9999-10005.

Claeys, W.L.; De Vleeschouwer, K.; Hendrickx, M.E. Effect of amino acids on acrylamide formation and elimination kinetics. *Biotechnol. Progress*, 2005b, 21, 1525-1530.

Clark, A.V; Tannenbaum, S.R. Isolation and characterisation of pigments from protein-carbonyl browning systems. Isolation, purification and properties. *J. Agric. Food Chem.*, 1970, 18, 891-894.

Claus, A.; Carla, R.; Schieber, A. Acrylamide in cereal products: A review. *J. Cereal Sci.*, 2008, 47, 118-133.

Claus, A.; Mongili, M.; Weisz, G.; Schieber, A.; Carle, R. Impact of formulation and technological factors on the acrylamide content of wheat bread and bread rolls. *J. Cereal Sci.*, 2008, 47, 546-554.

Commission Recommendation of 8 November 2013 on investigations into the levels of acrylamide in food (2013/647/UE).

Contreras-Calderón, J.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Indicators of non-enzymatic browning in the evaluation of heat damage of ingredient proteins used in manufactured infant fórmulas. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, 227, 117-124.

Cressey P, Thomson B, Ashworth M, et al. Acrylamide in New Zealand food and updated exposure assessment. MAF Technical Paper No: 2011/19. Risk Assessment Studies. Report No 43. <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/acrylamide-in-nz-food-updated-exposure-assessment.pdf>; 2012

Croft, M.; Tong, P.; Fuentes, D.; Hambridge, T. Australian survey of acrylamide in carbohydrate-based foods. *Food Addit. Contam.*, 2004, 21, 721-736.

Cross, A.J., Sinha, R. Meat-related mutagens/carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Environ. Mol. Mutagen.*, 2004, 44, 44-55.

Danehy, J.P. Maillard reactions, nonenzymatic browning in food systems with special reference to the development of flavour. *Adv. Food Res.*, 1986, 30, 77-138.

Dauberte, B.; Estienne, J.; Guerra, N. Formation of hydroxymethylfurfural in beverages based on fruit juices and in Spanish "torrefacto" coffees. *Ann. Fals. Expert. Chim. Toxicol.*, 1990, 83, 231-253.

Dearfield, K.L.; Douglas, G.R.; Ehling, U.H.; Moore, M.M.; Sega, G.A.; Brusick, D.J.. Acrylamide: a review of its genotoxicity and an assessment of heritable genetic risk. *Mutat Res* 1995, 330, 71-99.

De Meulenaer, B.; De Wilde, T.; Mestdagh, F.; Govaert, Y.; Ooghe, W.; Fraselle, S.; et al. Comparison of potato varieties between seasons and their potential for acrylamide formation. *J. Sci. Food Agric.*, 2008, *88*, 313–318.

De Vizia, B.; Ciccimarra, F.; De Cicco, N.; Auricchio, S. Digestibility of starches in infants and children. *J. Pediatr.*, 1975, *86*, 50-55.

De Wilde, T.; De Meulenaer, B.; Mestdagh, F.; Govaert, Y.; Ooghe, W.; Fraselle, S.; et al. Selection criteria for potato tubers to minimize acrylamide formation during frying. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 2199-2205.

De Wilde, T.; De Meulenaer, B.; Mestdagh, F.; Govaert, Y.; Vandeburie, S.; Ooghe, W.; et al. Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *J. Agric. Food Chem.*; 2005, *53*, 6550-6557.

De Wilde, T.; De Meulenaer, B.; Mestdagh, F.; Govaert, Y.; Vandeburie, S.; Ooghe, W.; et al. Influence of fertilization on acrylamide formation during frying of potatoes harvested in 2003. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 404-408.

Delatour, T.; Périsset, A.; Goldmann, T.; Riedeker, S.; Stadler, R.H. Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, *52*, 4625-4631.

Doerge, D.R.; da Costa, G.G.; McDaniel, L.P.; Churchwell, M.I.; Twaddle, N.C.; Beland, F.A.,. DNA adducts derived from administration of acrylamide and glycidamide to mice and rats. *Mut. Res.*, 2005, *580*, 131–141.

Dworschak, E.; Örsi, F. Study into the Maillard reaction occurring between methionine and tryptophan on the one hand and glucose on the other. I. Studies in aqueous solutions. *Acta Aliment. Acad. Sci. Hung.*, 1977, *6*, 59-71.

EC. 2002. Opinion of the scientific committee on food on new findings regarding the presence of acrylamide in food. European Commission. http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html.

ECHA. 2010. Acrylamide included in the REACH candidate list of substances of very high concern for authorisation. European Chemicals Agency. http://echa.europa.eu/documents/10162/13585/pr_10_05_acrylamide_20100330_en.pdf.

Edmonds, C.G.; Sethi, S.K.; Yamaizumi, Z.; Kasai, H.; Nishimura, S.; McCloskey, J.A. Analysis of Mutagens from Cooked Foods by Directly Combined Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Environ. Health Perspect.*, 1986, *67*, 35–40.

Edwards, P.M. The insensitivity of the developing rat fetus to the toxic effects of acrylamide. *Chem. Biol. Interact.*, 1976, *12*, 13-18.

EFSA, 2009. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Scientific Report of EFSA prepared by Data Collection and Exposure Unit (DATEX) on “Monitoring of acrylamide levels in food”. The EFSA Scientific Report, 2009, *285*, 1-26. Disponible en:

http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/285r.pdf. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

EFSA, 2010. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. EFSA Scientific Committee; Guidance on human health risk-benefit assessment of foods. *EFSA Journal* 2010, 8, 1673, 1-41. Disponible en:

http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/1673.pdf. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

EFSA, 2012. Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria. Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010. *EFSA Journal*, 2012, 10, 2938, 1-38. Disponible en:

http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/2938.pdf. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

EFSA (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal* 2015;13(6):4104

Eichner, K.; Ciner-Doruk, M. Early indication of the Maillard reaction by analysis of reaction intermediates and volatiles decomposition products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 115-135.

Elder, V.A.; Fulcher, J.G.; Leung, H.; Topor, M G. Method for reducing acrylamide in thermally processed foods. Patent US20040058045. 2004.

Ellis, G.P. The Maillard Reaction. En *Advances in Carbohydrate Chemistry*. Ed. M.L. Wolfram, vol. XIV. New York: Elsevier Science. 1959.

Elmore, J.S.; Mottram, D.S.; Muttucumaru, N.; Dodson, A.T.; Parry, M.A.J.; Halford, N.G. Changes in free aminoacids and sugars in potatoes due to sulphate fertilization and the effect on acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 5363-5366.

Erbersdobler, H.F.; Hupe, A. Determination of lysine damage and calculation of lysine bio-availability in several processed foods. *Z. Ernährungswiss.*, 1991, 30, 46-49.

Erbersdobler, H.F.; Somoza, V. Forty years of furosine -Forty years of using Maillard reaction products as indicators of the nutritional quality of foods. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, 51, 423-430.

Eriksson, S; Karlsson, P. Some analytical factors affecting measured levels of acrylamide in food products. *En Chemistry and safety of acrylamide in food*. Eds M. Friedman and D. Mottram, pp. 285-291. New York: Springer Science and Business Media, Inc. 2005.

Erkekoglu, P.; Baydar, T. Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods. *Nutr. Res. Rev.*, 2010, 23, 323-333.

EUPPA, (2007). Entrance control for raw material (potatoes) currently used in the French fries industry – Personal communication. Disponible en: www.euppa.eu

European Chemicals Bureau, Institute for Health and Consumer Protection, 2002. European Union Risk Assessment Report Acrylamide. Publications of the European Communities, Luxembourg. (ISBN 92-894-1250-X).

Evangelisti, F.; Calcagno, C.; Zunin, P. Relationship between blocked lysine and carbohydrate composition of infant fórmulas. *J. Food Sci.*, 1994, 59, 335-337.

FDA, 2004. Exploratory data on acrylamide in food: total diet study results. Disponible en: <http://www.cfsan.fda.gov/dms/acrydat2.html>. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Fennell, T.R.; Sumner, S.C.; Snyder, R.W.; Burgess, J.; Friedman, M.A.. Kinetics of elimination of urinary metabolites of acrylamide in humans. *Toxicol. Sci.*, 93, 2006, 256–267.

Fernández Artigas, P.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Blockage of available lysine at different stages of infant cereal production. *J. Sci. Food Agric.*, 1999a, 79, 851-854.

Fernández-Artigas, P.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Browning indicators in model system and baby cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 1999b, 47, 2872-2878.

Ferrer, E.; Alegría, A.; Farré, R.; Abellán, P.; Romero, F. High-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant fórmulas changes during heat treatment and storage. *J. Chromatogr. A*, 2002, 947, 85-95.

Ferrer, E.; Alegria, A.; Farré, R.; Abellan, P.; Romero, F. Hig-performance liquid chromatographic determination of furfural compounds in infant fórmulas during full shelf-life. *Food Chem.*, 2005, 89, 639-645.

Finot, P.A.; Magnenat, E. Metabolic transit of early and advanced Maillard products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 193-207.

Fiselier, K.; Bazzocco, D.; Gama-Baumgartner, F. & Grob, K. Influence of the frying temperature on acrylamide formation in French fries. *Eur. Food Res. Technol.*, 2006, 222, 414-419.

Fiselier, K.; Gama-Baumgartner, F.; Fiscalini, A.; Biedermann, M.; Grob, K.; Imhof, D.; Beer, M. Good manufacturing practice (GMP) for French fries low in acrylamide: results of a pilot project. *Mitt. Lebensm. Hyg.*, 2004, 95, 127-134.

Fiselier, K.; Grob, K. Legal limit for reducing sugars in prefabricates targeting 50 µg/kg acrylamide in French fries. *Eur. Food Res. Technol.*, 2005, 220, 451-458.

Food Drink Europe, 2014. Acrylamide Toolbox 2013. Disponible en: http://ec.europa.eu/food/food/chemicalsafety/contaminants/docs/toolbox_acrylamide_201401_en.pdf. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Frangne, R.; Adrian, J. The Maillard reaction. V. Enzymatic proteolysis of heated foods and significance of results. *Ann. Nutr. Aliment.*, 1967, 21, 163-74.

Franke, K.; Sell, M.; Reimerdes, E.H. Quality related minimization of acrylamide formation – An integrated approach. En *Chemistry and safety of acrylamide in food*. Eds. M. Friedman y D. Mottram, pp. 357-369. New York, Springer. 2005.

Fredriksson, H.; Tallving, J.; Rosen, J.; Aman, P. Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread. *Cereal Chem.*, 2004, *81*, 650-653.

Friedman, L.; Kline, O.L. Amino acid-sugar reaction. *J. Biol. Chem.*, 1950, *184*, 599-606.

Friedman, M. Acrylamide: inhibition of formation in processed food and mitigation of toxicity in cells, animals, and humans. Review. *Food & Function*, 2015, *6*, 1752-1772.

Friedman, M. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, *51*, 4504-4526.

Friedman, M.; Cuq, J.L. Chemistry, analysis, nutritional value, and toxicology of tryptophan. A review. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, *36*, 1079-1093.

Friedman, M.; Diamond, M.J.; Broderick, G. L. Dimethylourea as a tyrosine reagent and protein protectant against ruminal degradation. *J. Agric. Food Chem.*, 1982, *30*, 72-77.

Friedman, M.; Finot, P.A. Nutritional improvement of bread with lysine and g-glutamyllysine: studies in mice. *J. Agric. Food Chem.*, 1990, *38*, 2011-2020.

Friedman, M.; Henika, P.R. Mutagenicity of toxic weed seeds in the Ames test; Jimson weed (*Datura stramonium*), velvetleaf (*Abutilon theophrasti*), morning glory (*Ipomoea* spp) and sicklepod (*Cassia obtusifolia*). *J. Agric. Food Chem.*, 1991, *39*, 494-501.

Friedman, M.; Molnar-Perl, I. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 1. Heated amino acid-glucose systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1990a, *38*, 1642-1647.

Friedman, M.; Molnar-Perl, I. Inhibition of browning by sulfur amino acids. 2. Fruit juices and protein-containing foods. *J. Agric. Food Chem.*, 1990b, *38*, 1648-1651.

Galceran, M.T. Aminas heterocíclicas en alimentos cocinados. *Nutr. Clin. Diet. Hosp.*, 2002, *1*, 39-47.

Gama-Baumgartner, F.; Grob, K.; Biedermann, M. Citric acid to reduce acrylamide formation in French fries and roasted potatoes. *Mitt. Lebensm. Hyg*, 2004, *95*, 110-117.

Garayo J.; Moreira, R.G. Vacuum frying of potato crisps. *J. Food Eng.* 2002, *55*, 181-191.

García, M.A.; Ferrero, C.; Campana, A.; Bertola, N.; Martino, M.; Zaritzky, N. Methylcellulose coatings applied to reduce oil uptake in fried products. *Food Sci. Technol. Intern.*, 2004, *10*, 339-346.

García-Villanova, B.; Guerra Hernández, E.; Martínez Gómez, M.E.; Montilla, J. Liquid chromatography for the determination of 5-(Hydroxymethyl)-2-furaldehyde in breakfast cereals. *J. Agric. Food Chem.*, 1993, *41*, 1254-1255.

Gerendas, J.; Heuser, F.; Sattelmacher, B. Influence of nitrogen and potassium supply on contents of acrylamide precursors in potato tubers and on acrylamide accumulation in french fries. *J. Plant Nutrition*, 2007, *30*, 1499-1516.

Gertz C. Optimising the baking and frying process using oil-improving agents. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, *106*, 736-745

Gertz, C.; Klostermann, S. Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2002, *104*, 762-771.

Gertz, C.; Klostermann, S.; Kochhar P. Deep frying: the role of water from food being fried and acrylamide formation. *Ol. Corps Gras Lipides*, 2003, *10*, 297-303.

Gökmen, V.; Palazoglu, T.K.; Senyuva, H.Z. Relation between the acrylamide formation and time-temperature history of surface and core regions of French fries. *J. Food Engineer.*, 2006, *77*, 972-976.

Gökmen, V.; Şenyuva, H. Z. Improved method for the determination of hydroxymethylfurfural in baby foods using liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 2845-2849.

Gökmen, V.; Senyuva, H.Z. Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chem.*, 2007a, *103*, 196-203.

Gökmen, V.; Senyuva, H.Z. Effects of some cations on the formation of acrylamide and furfurals in glucose–asparagine model system. *Eur. Food Res. Technol.*, 2007b, *225*, 815-820.

Gómez-Arroyo, S.; Souza, V. In vitro and occupational induction of sister-chromatid exchange in human lymphocytes with furfuryl alcohol and furfural. *Mutat. Res.*, 1985, *156*, 233.

Gomis, D.B.; Alvarez, M.D.G.; Naredo, L.S.; Alonso, J.J.M. High-performance Liquid Chromatographic determination of furfural and hydroxymethylfurfural in apple juice and concentrates. *Chromatographya*, 1991, *32*, 45-48.

Gooderham, N.J.; Watson, D.; Rice, J.C.; Murray, S.; Taylor, G.W.; Davies, D.S. Metabolism of the Mutagen MeIQx In Vivo: Metabolite Screening by Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987, *148*, 1377-1382.

Goodno, C.C.; Swaisgood, H.E.; Catignani, G.L. A fluorimetric assay for available lysine in proteins. *Anal. Biochem.*, 1981, *115*, 203-211.

Granda, C.; Moreira, R.G.; Tichy, S.E. Reduction of acrylamide formation in potato crisps by low-temperature vacuum frying. *J Food Sci.*, 2004, *69*, 405-411.

Granvogl, M.; Jezussek, M.; Koehler, P.; Schieberle, P.; Quantitation of 3-aminopropionamide in potatoes-A minor but potent precursor in acrylamide formation. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 4751-4757.

Granvogl, M.; Schieberle, P. Thermally generated 3-aminopropionamide as a transient intermediate in the formation of acrylamide. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 5933-5938.

Grob, K. Options for legal measures to reduce acrylamide contents in the most relevant foods. *Food Addit. Contam.*, 2007, 24(S1), 71-81.

Grob, K. Reduction of exposure to acrylamide: achievements, potential of optimization, and problems encountered from the perspectives of a Swiss enforcement laboratory. *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 253-261.

Grob, K.; Biedermann, M.; Biedermann-Brem, S.; Noti, A.; Imhof, D.; Amrein, T. French fries with less than 100µg/kg. A collaboration between cooks and analysts. *Eur. Food. Res. Technol.*, 2003, 217, 185-194.

Guangyuan, L.; Tung-Hsi, Y.; Chi-Tang, H. Generation of flavour compounds by the reaction of 2-deoxyglucose with selected amino acids. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, 45, 233-236.

Guerra-Hernández, E.; Corzo, N. Furosine determination in baby cereal by Ion-Pair Reversed Phase Liquid Chromatography. *Cereal Chem.*, 1996, 73, 729-731.

Guerra-Hernández, E.; Corzo, N.; García-Villanova, B. Maillard reaction evaluation by furosine determination during infant cereal processing. *J. Cereal Sci.* 1999, 29, 171-176.

Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B.; Montilla Gomez, J. Determination of hidroxymetylfurfural in baby cereals by high-performance liquid chromatography. *J. Liq. Chrom.*, 1992, 15, 2551-2559.

Guerra-Hernández, E.; Leon, C.; García-Villanova, B.; Corzo, N. and Romera, J.M. Effect of storage on non-enzymatic browning of liquid infant milk formulae. *J. Sci. Food Agric.* 2002a, 82, 587-592.

Guerra-Hernández, E.; Leon, C.; García-Villanova, B.; Corzo, N.; Romera, J.M. Chemical changes in powdered infant fórmulas during storage. *Int. J. Dairy Technol.*, 2002b, 55, 234-239.

Guerra-Hernández, E.; Plata-Guerrero, R.M.; García-Villanova Ruiz, B. Acrylamide formation in different batter and breading formulation during deep-frying of zucchini and exposure estimation. *Ann. Nutr. Metab.*, 2013, 63(suppl1), 1841.

Guerra-Hernández, E.; Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B. Glucosylisomaltol, a new indicador of brownig reaction in baby cereals and bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2002c, 50: 7282-7287.

Haase, N.U.; Matthaeus, B.; Vosmann, K. Aspects of acrylamide formation in potato crisps. *J. Appl. Bot. Food Qual.*, 2004, 78, 144-147.

Haase, U.N.; Matthaus, B.; Vosmann, K. Acrylamide formation in foodstuffs - Minimising strategies for potato crisps. *Deut. Lebensm.-Rundsch.*, 2003, 99, 87-90.

Hackler, L.R.; Stillings, B.R. Aminoacid composition of heated-processed soy-milk and its correlation with nutritive value. *Cereal Chem.*, 1967, 44, 70-77.

Hagmar, L.; Tornqvist, M.; Nordander, C.; Rosen, I.; Bruze, M.; Kautiainen, A. et al. Health effects of occupational exposure to acrylamide using hemoglobin adducts as biomarkers of internal dose. *Scand. J. Work Environ. Health*, 2001, 27, 219-226.

Halford, N.G.; Curtis, T.Y.; Muttucumaru, N.; Postles, J.; Elmore, J.S.; Mottram, D.S. The acrylamide problem: a plant and agronomic science issue. *J. Exp. Bot.*, 2012a, 63, 2841-2851.

Halford, N.G.; Muttucumaru, N.; Powers, S.J.; Gillatt, P.N.; Hartley, L.; Elmore, J.S. and Mottram, D.S. Concentrations of Free Amino Acids and Sugars in Nine Potato Varieties: Effects of Storage and Relationship with Acrylamide Formation. *J. Agric. Food Chem.*, 2012b, 60, 12044-12055.

Hamlet, C.G.; Sadd, P.A.; Liang, L. Correlations between the amounts of free asparagine and saccharides present in commercial cereal flours in the UK and the generation of acrylamide during cooking. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 6145-6153.

Harris, C.H.; Johnson, J.M. Monitoring nonenzymatic browning in cakes prepared with high fructose corn syrup by high performance liquid chromatography. *J. Food Quality*, 1987, 10, 417-424.

Hashiba, H.; Okuhara, A. Iguchi, N. Oxygen-dependent browning of soy sauce and some brewed products. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 93-97.

Hayase, F.; Sato, M.; Tsuchida, H.; Kato, H. Volatile components formed by thermal degradation of non dialyzable melanoidin prepared from a sugar-butylamine reaction system. *Agric. Biol. Chem.*, 1982, 46, 2987-2996.

HEATOX. The HEATOX Project. 2006; Disponible en: www.heattox.org. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Hellenäs, K.E. (2014) en HEATOX- Heat-generated food toxicants, identification, characterisation and risk minimisation. Project No 506820. Deliverable reference number: 59. Guidelines to authorities and consumer organisations on home cooking and consumption. Available at:

http://www.slv.se/upload/heattox/documents/d59_guidelines_to_authorities_and_consumer_organisations_on_home_cooking_and_consumption.pdf

Hebeisen, T.; Guthapfel, N.; Ballmer, T.; Ruest, W.; Torche, J.M. Adequate varieties diminish acrylamide formation. *AgrarForschung*, 2005, 12, 58-63.

Hedegaard, R.V.; Granby, K.; Frandsen, H.; Thygesen, J.; Skibsted, L.H. Acrylamide in bread. Effect of prooxidants and antioxidants. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008, 227, 519-525.

Hendriksen, H.V.; Kornbrust, B.A.; Ostergaard, P.R.; Stringer, M.A. Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *J. Agric. Food Chem.*, 2009, 57, 4168-4176.

Henle, T.; Walter, H.; Krause, I.; Klostermeyer, H. Efficient determination of individual Maillard compounds in heat-treated milk products by amino acid analysis. *Int. Dairy J.* 1991, 1, 125-135.

Hermosin, J.; Ledl, F.; Gómez-Sánchez, A. Influence of oxidized lipids on the non-enzymatic browning reaction: interaction between linolenic acid and an Amadori compound. *Chem. Phys. Lipids.*, 1992, 63, 265-270.

Hidalgo, A.; Rossi, M.; Pompei, C. Furosine as a freshness parameter of shell egg. *J. Agric. Food Chem.*, 1995, 43, 1673-1677.

Hidalgo, F. J.; Delgado, R. M.; Navarro, J. L.; Zamora, R. Asparagine decarboxylation by lipid oxidation products in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2010, 58, 10512-10517.

Hidalgo, F.J.; Gallardo, E.; Zamora, R. Strecker type degradation of phenylalanine by 4-hydroxy-2-nonenal in model systems. *J. Agric. Food Chem.* 2005, 53, 10254-10259.

Hidalgo, F.J.; Zamora, R. Non-enzymatic browning and fluorescence development in a (E)-4,5-epoxy-(E)-2-heptenal/lysine model system. *J. Food Sci.*, 1993, 58, 667-670.

Hodge, J.E. Dehydrated foods. Chemistry of browning reactions in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 1953, 1, 928-943.

Hodge, J.E.; Rist, C.E. The Amadori rearrangement under new conditions and its significances for non-enzymatic browning reactions. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 316-322.

Hoenicke, K.; Gatermann, R. Studies on the stability of acrylamide in food during storage. *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 268-273.

Hogervorst, J.G.; Baars, B.J.; Schouten, L.J.; Konings, E.J.; Goldbohm, R.A.; van den Brandt P.A.;. The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research. *Crit. Rev. Toxicol.*, 2010, 40, 485-512.

Holsinger, V.H.; Posati, L.P. Chemical estimation of available lysine in dehydrated dairy products: 479. En: *Protein nutritional quality of foods and feeds, part I. Assay methods biological, biochemical, and chemical*. Ed. M. Friedman, pp 626-635. Marcel Dekker, New York, 1975.

IARC, 1994. Some industrial chemicals. *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Vol. 60*: 389-433. Lyon: International Agency for Research on Cancer, IARC. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol60/mono60.pdf>.

Jackson LS and Al-Taher F,. Effects of consumer food preparation on acrylamide formation. In: *Chemistry and Safety of Acrylamide in Food*. Eds Friedman M and Mottram D, Springer+Business Media Inc., 2005, 447–465.

Jägerstad, M.; Skog, K. Formation of meat mutagens. En: *Nutritional and toxicological consequences of food processing*, Friedman, M., (Ed.), Plenum: New York (USA), 1991: 83-105.

JECFA. 2005. Joint FAO/WHO expert committee on food additives: Sixty-fourth meeting. En <http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

JECFA. 2011. Evaluation of certain contaminants in food. In Seventy-second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives. http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_959_eng.Pdf.

Jeuring, H.P.; Kupperts, F.J.E.M. High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Assoc. Of. Anal. Chem.*, 1980, 63, 1215-1218.

Johnson, K.A.; Gorzinski, S.J.; Bodner, K.M.; Campbell, R.A.; Wolf, C H.; Friedman, M A.; et al.. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of fischer 344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1986, 85, 154-168.

Jung, M.Y.; Choi, D.S.; Ju, J.W. A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries. *J. Food Sci.*, 2003, 68, 1287–1290.

Kakade, M.L.; Evans, R.J. Chemical and enzymatic determinations of available lysine in raw and heated navy beans (*Phaseolus vulgaris*). *Can. J. Biochem.*, 1966, 44, 648-50.

Kanjahn, D.; Jarms, U.; Maier, H.G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 1. Evaluation of the method. *Deut. Lebensm-Rundsch.*, 1996, 92, 328-331.

Kanjahn, D.; Maier, H.G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 2. Coffee. *Deut. Lebensm-Rundsch.*, 1997a, 93, 44-46.

Kanjahn, D.; Maier, H.G. Hydroxymethylfurfural and furfural in coffee and related beverages. 3. Coffee related beverages. *Deut. Lebensm-Rundsch.*, 1997b, 93, 110-112.

Kasai, H.; Nishimura, S.; Nagao, M.; Takahashi, Y.; Sugimura, T. Fractionation of a Mutagenic Principle from Broiled Fish by High- Pressure Liquid Chromatography. *Cancer Lett.* 1979, 7, 343-348

Kato, Y.; Watanabe, K.; Sato, Y. Effect of some metals on the Maillard reaction of ovoalbumin. *J. Agric. Food Chem.*, 1981, 29, 540-543.

Keating, G.A.; Sinha, R.; Layton, D.; Salmon, C. P.; Knize, M.G.; Bogen, K.T., et al.. Comparison of heterocyclic amine levels in home-cooked meats with exposure indicators (United States). *Cancer Causes & Control*, 2000, 11, 731-739.

Keramat, J.; LeBail, A.; Prost C.; Jafari, M. Acrylamide in Baking Products: A Review Article. *Food Bioprocess Technol.*, 2011, 4, 530-543.

Knol, J.J.; Van Loon, W.A.M.; Linssen, J.P.H.; Ruck, A-L.; Van Boekel, M.A.J.S.; Voragen, A.G.J. Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose–asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 6133-6139.

Kolek, E.; Simko, P.; Simon, P. Effect of NaCl on the decrease of acrylamide content in a heat-treated model food matrix. *J. Food Nutr. Res.*, 2006, 45, 17-20.

Konings E.J.; Ashby P.; Hamlet, C.G.; Thompson, G.A. Acrylamide in cereal and cereal products: a review on progress in level reduction. *Food Addit. Contam.*, 2007, 24, 47-59.

Konings, E.J.M.; Baars, A.J.; Van Klaveren, J.D.; Spanjer, M.C.; Rensen, P.M.; Hiemstra, M.; et al. Acrylamide exposure from foods of the Dutch population and an assessment of the consequent risk. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, 41, 1569-1579.

Kotsiou, K.; Tasioula-Margari, M.; Kukurova, K.; Ciesarova, Z. Impact of oregano and virgin olive oil phenolic compounds on acrylamide content in a model system and fresh potatoes. *Food Chem.*, 2010, 123, 1149-1155.

Kowalczyk, D.; Gustaw, W.. Effect of hydrocolloid coatings on quality parameters of french fries. *Zywnosc-Nauka Technologia Jakosc*, 2009, 16, 72-80.

Kraft, R.A.; Morgan, A.F. The effect of heat treatment on the nutritive value of milk proteins. IV. The biological value of unheated and autoclaved dried skim milk. *J. Nutr.*, 1952, 45: 567-581.

Kramhöller, B.; Ledl, F.; Lerche, H.; Severin, T. HPLC separation of some characteristic components in reactions mixtures of disaccharides with amines model system for milk and cereal products. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 1992, 194, 431-433.

Kumar D, Singh BP and Kumar P, An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 2004,145, 247–256.

Lee, H.S.; Rouseff, R.L.; Nagy, S. HPLC determination of furfural and 5-HMF in citrus juice. *J. Food Sci.*, 1986, 51, 1075-1079.

Lee, T.C.; Pintauro, S.M.; Chichester, C.O. Nutritional and toxicological effects of nonenzymatic Maillard Browning. *Diabetes*, 1982, 31, 37-46.

Leung, K.S.; Lin, A.; Tsang, C.K.; Yeung, S.T.K. Acrylamide in Asian foods in Hong Kong. *Food Addit. Contam.*, 2003, 20, 1105-1113.

Levine, R.A.; Smith, R.E. Sources of variability of acrylamide levels in cracker model. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, *53*, 4410-4416.

Lindsay, R.C.; Jang, S. Chemical intervention strategies for substantial suppression of acrylamide formation in fried potato products. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 2005, *561*, 393-404.

Lineback, D. EU acrylamide workshop. *Food Addit. Contam.*, 2007, *24(S1)*, 3-4.

Lineback, D.; Wenzl, T.; Ostermann, O.P.; de la Calle, B.; Anklam, E.; Taeymans, D. Overview of acrylamide monitoring databases. *J. AOAC Int.*, 2005, *88*, 246-252.

Lineback, D.R.; Coughlin, J.R.; Stadler, R.H. Acrylamide in Foods: A Review of the Science and Future Considerations. *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 2012, *3*, 15-35.

Lo Coco, E.; Novelli, V. HPLC determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in fruit juice. *J. Chromatogr. Sci.*, 1997, *35*, 578-583.

Lo Coco, F.; Clemente, V.; Novelli, V., Ceccon, L. Liquid chromatographic determination of 2-furaldehyde and 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in beer. *Anal. Chim. Acta*, 1995, *36*: 57-64.

LoPachin, R.M.; Gavin, T. Acrylamide-induced nerve terminal damage: relevance to neurotoxic and neurodegenerative mechanisms. *J Agric Food Chem.*, 2008, *56*, 5994-6003.

López-Fandiño, R.; Corzo, N.; Villamiel, M.; Delgado, T.; Olano, A.; Ramos, M. Assessment of quality of comercial UHT milks by chromatographic and electrophoretic methods. *J. Food Prot.*, 1993, *56*, 263-269.

Low, M.Y.; Koutsidis, G.; Parker, J.K.; Elmore, J.S.; Dodson, A. T.; Mottram, D. S. Effect of citric acid and glycine addition on acrylamide and flavor in a potato model system. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 5976-5983.

Mabrouk, A.F. Flavour of browning reaction products (foods). American Chemical Society, Symposium series, American Chemical Society, Washington, 1979, *115*, 206-245.

MAGRAMA, 2014. La alimentación mes a mes en España. Disponible en: <http://www.magrama.gob.es/es/alimentacion/temas/consumo-y-comercializacion-y-distribucion-alimentaria/panel-de-consumo-alimentario/ultimos-datos/>. Último acceso 10 de Noviembre de 2015

Majcher, M.A.; Jelen, H.H. Acrylamide formation in low-fat potato snacks and its correlation with colour development. *Food Addit. Contam.*, 2007, *24*, 337-342.

Martínez Augustin, O.; Martínez de Victoria, E. Proteínas y péptidos en nutrición enteral. *Nutr. Hosp.*, 2006, *21*, 1-14

Martins, S.I.F.S.; Jongen, W.M.F.; Boekel, M.A.J.S. A review of Maillard reaction in food and implications to kinetic modeling. *Trends Food Sci. Technol.*, 2001, *11*, 364-373.

Masson, L.; Muñoz, J.; Romero, N.; Camilo, C.; Encina, C.; Hernández, L.; et al. Acrilamida en patatas fritas: Revisión actualizada. *Grasas y Aceites*, 2007, 58, 185-193.

Masson, L.; Romero, N.; Castro, J.; Robert, P. Informe de avance Proyecto HEATOX 506820. 2005. Vvageningen, Holanda.

Matsuura-Endo, C.; Ohara-Takada, A.; Chuda, Y.; Ono, H.; Yada, H.; Yoshida, M.; et al. Effects of storage temperature on the contents of sugars and free amino acids in tubers from different potato cultivars and acrylamide in chips. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2006, 70, 1173-1180.

Matthäus, B.; Haase, N.U.; Vosmann, K. Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, 106, 793-801.

Matthäus, 2002. BAGKF, Bundesanstalt für Getreide- Kartoffel und Fettforschung. Available at: http://www.bfr.bund.de/cm/343/acrylamidgehalte_von_im_backofen_zubereitete_n_pommes_frites_und_von_reibekuchen.pdf.

Mauron, J. The Maillard reaction in food, a critical review from the nutritional standpoint. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 5-35.

McPherson, J.D.; Shilton, B.H.; Walton, D. Casein biochemistry. *Biochem. J.*, 1988, 27, 1901-1907.

Medeiros Vinci, R.; Mestdagh, F.; De Meulenaer, B. Acrylamide formation in fried potato products – Present and future, a critical review on mitigation strategies *Food Chem.*, 2012, 133, 1138-1154.

Medeiros Vinci, R.; Mestdagh, F.; De Muer, N.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Effective quality control of incoming potatoes as an acrylamide mitigation strategy for the French fries industry. *Food Addit. Contam., Part A*, 2010, 27, 417-425.

Mestdagh, F.; Castelein, P.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Importance of oil degradation components in the formation of acrylamide in fried foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 6141-6144.

Mestdagh, F.; De Meulenaer, B.; Van Peteghem, C. Influence of oil degradation on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *Food Chem.*, 2007, 100, 1153-1159.

Mestdagh, F.; De Meulenaer, B.; Van Poucke, C.; Detavernier, C.; Cromphout, C.; Van Peteghem, C. Influence of oil type on the amounts of acrylamide generated in a model system and in French fries. *J. Agric. Food Chem.*, 2005, 53, 6170-6174.

Mestdagh, F.; De Wilde, T.; Castelein, P.; Németh, O.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Impact of the reducing sugars on the relationship between acrylamide and Maillard browning in French fries. *Eur. Food Res. Technol.*, 2008b, 227, 69-76.

Mestdagh, F.; De Wilde, T.; Delporte, K.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Impact of chemical pre-treatments on the acrylamide formation and sensorial quality of potato crisps. *Food Chem.*, 2008, *106*, 914-922.

Mestdagh, F.; De Wilde, T.; Fraselle, S.; Govaert, Y.; Ooghe, W.; Degroodt, J.; et al. Optimization of the blanching process to reduce acrylamide in fried potatoes. *Food Sci. Tec.*, 2008b, *41*, 1648-1654.

Mestdagh, F.; Lachat, C.; Baert, K.; Moons, E.; Kolsteren, P.; Van Peteghem, C.; et al. Importance of canteen lunch on dietary intake of acrylamide. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2007, *51*, 509-516.

Mestdagh, F.; Maertens, J.; Cucu, T.; Delporte, K.; Van Peteghem, C.; De Meulenaer, B. Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chem.*, 2008c, *107*, 26-31.

Milic, B.L.; Piletic, M.V. The mechanism of pyrrole, pyrazine and pyridine formation in non-enzymic browning reaction. *Food Chem.*, 1984, *13*, 165-180.

Miller, E.L.; Carpenter, K.J., Milner, C.K. Availability of sulfur amino acids in protein foods. III. Chemical and nutritional changes in heated cod muscle. *Br. J. Nutr.*, 1965, *19*, 547-564.

Miller, M.J.; Carter, D.E; Sipes, I.G. Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher-344 rats. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 1982, *63*, 36-44.

Morales, F.J., Arribas-Lorenzo, G. The formation of potentially harmful compounds in churros, a Spanish fried-dough pastry, as influenced by deep frying conditions. *Food Chem.*, 2008, *109*, 421-425.

Morales, F.J.; Romero, C.; Jiménez Pérez, S. An enhanced liquid chromatographic method for 5-hidroxymethylfurfural determination in UHT milk. *Chromatographia*, 1992, *33*, 45-47.

Morales, F.J.; Romero, C.; Jiménez Pérez, S. New methodologies for kinetic study of 5-hydroxymethyl-furfural formation and reactive lysine blockage in heated treated milk model system. *J. Food Prot.*, 1995, *58*, 128-133.

Morales, F.J.; Romero, C.; Jimenez-Perez, S. Chromatographic determination of bound hydroxymethylfurfural as an index on milk protein glycosylation. *J. Agric. Food Chem.*, 1997, *45*, 1570-1573.

Morales, F.J.; Romero, C.; Jiménez-Pérez, S. Evaluation of heat-induced changes in Spanish commercial milk: hydroxymethylfurfural and available lysine content. *Int. J. Food Sci. Technol.*, 1996, *31*, 411-418.

Morawski, J.; Ivie, K.; Dincer, A.K. Uses in HPLC in alcoholic beverages and ethanol processing. *Food Technol.*, 1989, *37*, 57-60.

Moreira, R.G.; Castell-Perez, M.; Barrufet, M. A. Deep-fat frying: Fundamentals and applications. Gaithersburg, MD: Aspen Publishers, 1999.

Mottram, D.S.; Wedzicha, B.L.; Dodson, A.T. Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 2002, *419*, 448-449.

Moye, C.J.; Krzeminski, Z.S. The formation of 5-hydroxymethylfurfural from hexoses. *Aust. J. Chem.*, 1963, *16*, 258-269.

Muttucumaru N, Powers SJ, Elmore JS, Mottram DS, Halford N,. Effects of nitrogen and sulfur fertilization on free amino acids, sugars, and acrylamide-forming potential in potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, *61*, 6734–6742.

Nafisi, K.; Markakis, P. Inhibition of sugar-amine browning by aspartic and glutamic acids. *J. Agric. Food Chem.*, 1983, *31*, 1115-1117.

Nagao, M.; Sato, S.; Sugimura, T. Mutagens produced by heating foods: 521-536. En: *The Maillard reaction in foods and nutrition*, Waller, G. R. y Feather, M. S., (Eds.), American Chemical Society, symposium Series, 215, Washingtton D.C. (USA), 1983.

Namal Senanayake, S.P.J. Green tea extract: Chemistry, antioxidant properties and food applications-A review. *J. Funct. Foods*, 2013, *5*, 1529-1541.

Napolitano, A.; Morales, F.J.; Sacchi, R.; Fogliano, V. Relationship between virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, *56*, 2034-2040.

Negisi, T., Nagao, M., Hiramoto and Hayatsu, H. A list of mutagenic heterocyclic amines: 7-19. En: *Mutagens in food: detection and prevention*. Hayatsu, H. (Ed.), CRC Press: Boca Raton, Florida (USA), 1990.

Nielsen, J.J.; Weidner, K.A. Column chromatographic method for the determination of available lysine. *Acta Agric. Scand.*, 1966, *16*, 144-146.

Nobuyuki, I.; Hasegawa, R.; Imaidi, K.; Tamano, S.; Hagiwara, A.; Hirose, M.; et al. Carcinogenicity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5-b] pyridine (PhIP) in the rat. *Mutat. Res.*, 1997, *376*, 107-114.

Normandin L, Bouchard M, Ayotte P, et al. Dietary exposure to acrylamide in adolescents from a Canadian urban center. *Food Chem Toxicol* 2013;*57*:75–83.

Noti, A.; Biedermann-Brem, S.; Biedermann, M.; Grob, K.; Albisser, P.; Realini, P. Storage of potatoes at low temperature should be avoided to prevent increased acrylamide formation during frying and roasting. *Mitt. Lebensmittelunters. Hyg.*, 2003, *94*, 167-180.

Nursten, H.E. Maillard browning reactions in dried foods. In “Concentration and drying of foods” MacCarthy. (Ed), *Elsevier Applied Science Publishers*, London, 1989. 53-68

Nursten, H.E. Recent developments in studies of the Maillard reaction. *Food Chem.*, 1980, 6, 263-277.

Obretenov, T.D.; Argirov, O.K.; Rashkov, I.B. On melanoidin formation with furfural participation, synthesis of melanoidins from furfural and glycine. *J. Food Process. Preserv.*, 1983, 7, 115-126.

O'Brien, J.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. Alterations of Maillard metabolites and secondary pathology in rats fed Maillard reaction products. En: *Maillard reaction chemistry, food and health*. Labuza, T.P.; Reineccius, G.A.; Monnier, V.; O'Brien, J. y Baynes, J. (Eds.), 1994, pp: 397-401.

O'Brien, J.; Morrissey, P.A.; Flynn, A. The effect of Maillard reaction products on mineral homeostasis in the rat. 214. En: Proc. Euro-food tox II, Institute of toxicology. *Swiss Federal Institute of Technology*, Zurich, 1986.

O'Brien, J.; Morrissey, P.A. Nutritional and toxicological aspects of the Maillard browning reaction in foods. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 1989, 28, 211-248.

Ohara-Takada, A.; Matsuura-Endo, C.; Chuda, Y.; Ono, H.; Yada, H.; Yoshida, M.; et al. Change in content of sugars and free amino acids in potato tubers under short-term storage at low temperature and the effect on acrylamide level after frying. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 2005, 69, 1232-1238.

Olsson, K.; Svensson, R.; Roslund, C.A. Tuber components affecting acrylamide formation and colour in fried potato: Variation by variety, year, storage temperature and storage time. *J. Sci. Food Agric.*, 2004, 84, 447-458.

Omura, H.; Jahan, N.; Shimohara, K.; Murakami, H. Formation of mutagens by the Maillard reaction, en *The Maillard Reaction in Foods and Nutrition*. Walter, G.R. and Feather, MS., Eds., 1983, American Chemical Society, Washington, D. C.

Ono, H.; Chuda, Y.; Ohnishi-Kameyama, M. Yada, H.; Ishizaka, M.; Kobayashi, H.; et al. Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese food. *Food Addit. Contam.*, 2003, 20, 215-220.

O'Reilly, R. The nature of the chemical grouping is responsible for the colour of the products of the Maillard reaction, Ph.D. Thesis University of Reading, Reading, 1982.

Oz, F.; Kaya, M. The inhibitory effect of red pepper on heterocyclic aromatic amines in fried beef Longissimus dorsi muscle. *J. Food Process. Pres.*, 2011, 35, 806-812.

Paleologos, E.K.; Kontominas, M.G. Effect of processing and storage conditions on the generation of acrylamide in precooked breaded chicken products. *J. Food Protect.*, 2007, 70, 466-470.

Parker, J.K.; Balagiannis, D.P.; Higley, J.; Smith, G.; Wedzicha, B.L.; Mottram, D.S. Kinetic model for the formation of acrylamide during the finish-frying of commercial French fries. *J. Agric. Food Chem.*, 2012, 60, 9321-9331.

Pedreschi, F.; Kaack, K.; Granby, K. Acrylamide content and color development in fried potato strips. *Food Res. Int.*, 2006, 39, 40-46.

Pedreschi, F.; Kaack, K.; Granby, K. Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2004, 37, 679-685.

Pedreschi, F.; Kaack, K.; Granby, K. The effect of asparaginase on acrylamide formation in French fries. *Food Chem.*, 2008, 109, 386-392.

Pedreschi, F.; Kaack, K.; Granby, K.; Troncoso, E. Acrylamide reduction under different pre-treatments in French fries. *J. Food Eng.*, 2007, 79, 1287-1294

Pedreschi, F.; Leon, J.; Mery, D.; Moyano, P.; Pedreschi, R.; Kaack, K.; Granby, K. Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips. *J. Food Eng.*, 2007, 79, 786-793.

Pedreschi, F.; Mariottia, S.M.; Granby, K. Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment. *J. Sci. Food Agric.*, 2014, 94, 9-20.

Pedreschi, F.; Moyano, P.; Kaack, K.; Granby, K. Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Res. Int.*, 2005, 38, 1-9.

Pedreschi, F.; Travisany, X.; Reyes, C.; Troncoso, E. Pedreschi, R. Kinetics of extraction of reducing sugar during blanching of potato slices. *J. Food Eng.*, 2009, 91, 443-447.

Pelucchi, C.; Bosetti, C.; Galeone, C.; La Vacchia, C. Dietary acrylamide and cancer risk: An updated meta-analysis. *Int. J. Cancer*, 2015, 136, 2912-2922.

Pence, B.C.; Landers, M.; Dunn, D.M.; Shen, C.L.; Miller, M.F. Feeding of a well-cooked beef diet containing a high heterocyclic amine content enhances colon and stomach carcinogenesis in 1,2-dimethylhydrazine-treated rats. *Nutr. Cancer*, 1998, 30, 220-226.

Pigman, W.; Johnson, K.C. Reaction of carbohydrates with nitrogenous substances. II. The tetraacetates of N-D-glucosylaniline. *J. Am. Chem. Soc.*, 1953, 75, 3464-3466.

Pittet, A.; Périsset, A.; Oberson, J.M. Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.*, 2004, 1035, 123-130.

Pokorny, J. Browning for lipid-protein interactions. *Prog. Food Nutr. Sci.*, 1981, 5, 421-425.

Pollien, P.; Lindinger, C.; Yeretzyan, C.; Blank, I. Proton transfer reaction mass spectrometry, a tool for on-line monitoring of acrylamide formation in the headspace of Maillard reaction systems and processed food. *Anal. Chem.*, 2003, 75, 5488-5494.

Porretta, S.; Sandei, L. Determination of 5-Hydroxymethyl-2-Furfural (HMF) in tomato products, proposal of a rapid HPLC method and its comparison with the colorimetric method. *Food Chem.*, 1991, 39, 51-57.

Powell, R.C.T.; Spark, A.A. Effect of zirconium and aluminium compounds and pH on the Maillard reaction. *J. Sci. Food Agric.*, 1971, 22, 596-599.

Puangsoombat, K.; Jirapakkul, W.; Smith, J.S. Inhibitory activity of Asian spices on heterocyclic amines formation in cooked beef patties. *J. Food Sci.*, 2011, 76, 174-180.

Rabasseda, J.; Rauret, G.; Galceran, T. Liquid chromatographic determination of available lysine in soybean and fish meal. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, 1988, 2, 350-353.

Rada-Mendoza, M.; García-Baños, J.L.; Villamiel, M.; Olano, A. Study on nonenzymatic browning in cookies, crackers and breakfast cereals by maltulosa and furosine determination. *J. Cereal Sci.*, 2004, 39, 167-173.

Ramírez-Jiménez, A.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Effect of toasting time on the browning of sliced bread. *J. Sci. Food Agric.*, 2001, 81, 513-518.

Ramírez-Jiménez, A.; Garcia-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Nonenzymatic browning during storage of infant cereals. *Cereal Chem.*, 2004, 81, 399-403.

Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Browning indicators in bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2000, 48, 4176-4181.

Ramírez-Jiménez, A.; Guerra-Hernández, E.; García-Villanova, B. Evolution of non-enzymatic browning during storage of infant rice cereal. *Food Chem.*, 2003, 83, 219-225.

Raposeiras-Roubín, S.; Rodiño-Janeiro, B.K.; Grigorian-Shamagian, L.; Moure-González, M.; Seoane-Blanco, A.; Varela-Román, A.; et al. Productos de glicación avanzada: nuevo marcador de disfunción renal en pacientes con insuficiencia cardíaca crónica. *Med. Clin. (Barc.)*. 2011, 136, 513-521.

Recomendación 2007/331/CE de la Comisión, de 3 de mayo de 2007, relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos (DO L 123 de 12.5.2007, p. 33).

Recomendación 2010/307/CE de la Comisión, de 2 de junio de 2010, relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos (DO L 137 de 3.6.2010, p. 4).

Recomendación 2013/647/UE de la Comisión, de 8 de noviembre de 2013 relativa a la investigación de los niveles de acrilamida en los alimentos (DO L 301 de 12.11.2013, p.15)

Rendleman, J.A.; Inglett, G.E. The influence of Cu (II) in the Maillard reaction. *Carbohydr. Res.*, 1990, 201, 311-326.

Resmini, P.; Pellegrino, L. Occurrence of protein-bound lysylpyrrolaldehyde in dried pasta. *Cereal Chem.*, 1994, 71, 254-262.

Resmini, P.; Pellegrino, L.; Battelli, G. Accurate quantification of furosine in milk and dairy products by a direct HPLC method. *Ital. J. Food Sci. Nutr.*, 1990, 3, 173-183.

Resmini, P.; Pellegrino, L.; Pagani, M.A.; De Noni, I. Formation of 2-acetil-3-D-glucopyranosylfuran (glucosylisomaltol) from nonenzymatic browning in pasta drying. *Ital. J. Food Sci.*, 1993, 4, 341-353.

Richards, E.L. 1956. Citado por O'Brien, J. y Morrissey, P.A., 1989.

Riesen, W.H.; Clandinin, D.R.; Elvehjem, C.A.; Cravens, W.W. Liberation of essential amino acids from raw, properly heated, and overheated soybean-oil meal. *J. Biol. Chem.*, 1947, 167, 143-150.

Risner, C.H.; Kiser, M.J.; Dube, M.F. An aqueous high performance liquid chromatographic procedure for the determination of 5-hydroxymethylfurfural in honey and other sugar containing materials. *J. Food Sci.*, 2006, 71, C179-C184.

Rivero-Urgell, M. Avances en alimentación infantil: nuevos ingredientes nutracéuticos que mejoran las leches para lactantes. *Rev. Esp. Nutr. Comunitaria*, 2005, 11, 182-186.

Rivero-Urgell, M.; Santamaría-Orleans, A.; Rodríguez-Palermo, M. La importancia de los ingredientes funcionales en las leches y cereales infantiles. *Nutr Hosp.*, 2005, 20, 135-146.

Rizzi, G.P. Chemical structure of coloured Maillard reaction products. *Food Rev. Int.*, 1997, 13, 1-28.

Roach, J.A.G.; Andrzejewski, D.; Gay, M.L.; Nortrup, D.; Musser, S.M. Rugged. LC-MS/MS survey analysis for acrylamide in foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 7547-7554.

Robert, F.; Vuataz, G.; Pollien, P.; Saucy, F.; Alonso, M.I.; Bauwens, I.; et al. Acrylamide formation from asparagine under low-moisture Maillard reaction conditions, 1. Physical and chemical aspects in crystalline model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 6837.

Rohrmann, S.; Hermann, S.; Linseisen, J. Heterocyclic aromatic amine intake increases colorectal adenoma risk: finding from a prospective European cohort study. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2009, 89, 1418-1424.

Rolland, J. Subproductos lácteos. En "Ciencia y tecnología de la leche" Amiot J. (Ed.), Acribia, S.A, Zaragoza. 1991, Capítulo XIII, 371-394.

Roumeu-Nadal, M.; Chávez-Servín, J.L.; Castellote, A.I.; Rivero, M.; López-Sabater, M.C. Oxidation stability of the lipid fraction in milk powder fórmulas. *Food Chem.*, 2007, 100, 756-763.

Rubenthaler, G.; Pomeranz, Y.; Finney, K.F. Effects of sugar and certain free amino acids on bread characteristics. *Cereal Chem.*, 1963, 40, 658-665.

Rufián, J.A.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E.J. Available lysine and fluorescence in heated milk proteins/dextrinomaltose or lactose solutions. *Food Chem.*, 2006c, 98, 685-692.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Relationship between acrylamide and thermal processing indexes in commercial breakfast cereals. A survey of Spanish breakfast cereals. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2006b, 50, 756-762.

Rufián-Henares, J.A.; Arribas-Lorenzo, G.; Morales F.J. Acrylamide content of selected Spanish foods: A survey of biscuits and bread derivatives. *Food Addit. Contam.*, 2007, 24, 343-350.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Analysis of heatdamage indices in breakfast cereals: Influence of composition. *J. Cereal Sci.*, 2006a, 43, 63-69.

Rufián-Henares, J.A.; Delgado-Andrade, C.; Morales, F.J. Application of a fast high-performance liquid chromatography method for simultaneous determination of furanic compounds and glucosylisomaltol in breakfast cereals. *J. AOAC Int.*, 2006c, 89, 161-165.

Rufián-Henares, J.A.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Furosine content, loss of o-phthaldialdehyde reactivity, fluorescence and colour in stored enteral formula. *Int. J. Dairy Technol.*, 2002a, 55, 121-126.

Rufián-Henares, J.A.; García-Villanova, B.; Guerra-Hernández, E. Maillard reaction in enteral formula processing: furosine, loss of o-phthaldialdehyde reactivity and fluorescence. *Food Res. Int.*, 2002b, 35, 527-533.

Rufián-Henares, J.A.; Guerra-Hernández, E., García-Villanova, B. Generation of furosine and color in infant/enteral formula-resembling systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 5354-5358.

Rydberg, P.; Eriksson, S.; Tareke, E.; Karlsson, P.; Ehrenberg, L.; Törnqvist, M. Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 7012-7018.

Sadd, P.A.; Hamlet, G.H.; Liang, L. Effectiveness of methods for reducing acrylamide in bakery products. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 6154-6161.

Sahin, S.; Sumnu, G.; Oztop, M.C. Effect of osmotic pretreatment and microwave frying on acrylamide formation in potato strips. *J. Sci. Food Agric.*, 2007, 87, 2830-2836.

Sanny, M.; Luning, P.A.; Marcelis, W.J.; Jinap, S.; Van Boekel, M.A.J.S. Impact of control behaviour on unacceptable variation in acrylamide in French fries. *Trends Food Sci. Technol.*, 2010, 21, 256-267.

Sarriá, B.; Lopez-Fandiño, R.; Vaquero, M.P. Does processing of a powder or in-bottle-sterilized liquid infant formula affect calcium bioavailability? *Nutrition*, 2001, 17, 326-331.

Schamberger, G.P.; Labuza, T.P. Effect of green tea flavonoids on Maillard browning in UHT milk. *LWT- Food Sci. Technol.*, 2007, 40, 1410-1417.

Schettgen, T.; Weiss, T.; Drexler, H.; Angerer, J. A first approach to estimate the internal exposure to acrylamide in smoking and non-smoking adults from Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health*, 2003, 206, 9-14.

Schroeder, L.J.; Iacobellis, M.; Smith, A.H. The influence of water and pH on the reaction between amino compounds and carbohydrates. *J. Biol. Chem.*, 1955, 212, 973-983.

Scientific Committee on Food. 2002. Disponible en: <http://www.europa.eu.int>. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Seal, C.J.; de Mul, A.; Eisenbrand, G.; Haverkort, A.J.; Franke, K.; Lalljie, S.P.D. et al. Risk-benefit considerations of mitigation measures on acrylamide content of foods - A case study on potatoes, cereals and coffee. *Br. J. Nutr.*, 2008, 99, S1-S46.

Seiquer, I.; Navarro, M.P. Influencia de los productos de la reacción entre lípidos oxidados (4,5 (E)-epoxy-2 (E)-heptenal y 4,5 (E)-epoxy-2 (E)- decenal) y lisina sobre la utilización de zinc y calcio: ensayos en células Caco-2. *Grasas y Aceites*, 2003, 54, 350-357.

Shih, F.F.; Boue, S.M.; Daigle, K.W.; Shih, B.Y. Effects of flour sources on acrylamide formation and oil uptake in fried batters. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 2004, 81, 265-268.

Shipp, A.; Lawrence, G.; Gentry, R.; McDonald, T.; Bartow, H.; Bounds, J.; et al. Acrylamide: review of toxicity data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, 36, 481-608.

SNFA, Swedish National Food Administration, 2002. Analysis of acrylamide in food. Disponible en: <http://www.slv.se>, 24 April 2002. Último acceso 10 de Noviembre de 2015.

Stadler, R.H. Acrylamide formation in different foods and potential strategies for reduction. Proceedings of ACS Symposium on "Chemistry and Safety of Acrylamide in Food". *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2005, 561, 157-169.

Stadler, R.H.; Blank, I.; Varga, N.; Robert, F.; Hau, J.; Guy, P.A.; et al. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 2002, 419, 449-450.

Stadler, R.H.; Robert, F.; Riediker, S.; Varga, N.; Davídek, T.; Devaud, S.; et al. In-depth mechanistic study on the formation of acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, 52, 5550-5558.

Stadler, R.H.; Scholz, G. Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutr. Rev.*, 2004 62, 449-67.

Stadler, R.H.; Verzeqnessi, L.; Varga, N.; Grigorov, M.; Studer, A.; Riediker, S.; et al. Formation of vinylogous compounds in model Maillard reaction systems. *Chem. Res. Toxicol.*, 2003, 16, 1242-1250.

Stadtman, F.H.; Chichester, C.O.; Mackinney, C. Carbon dioxide production in the browning reaction. *J. Am. Chem. Soc.*, 1952, *74*, 3194-3196.

Stavric, B. Biological significance of trace levels of mutagenic heterocyclic aromatic amines in human diet: a critical review. *Food Chem. Toxicol.*, 1994, *32*, 977-994

Stepanenko, B.N.; Serbyuk, O.G. The content of acyclic forms of various sugars in aqueous solutions. *Biokhimiya.*, 1950, *15*, 155-164.

Stich, H.F.; Stich, W.; Rosin, M.P.; Powrie, W.D. Mutagenic activity of pyrazine derivatives: a comparative study with *Salmonella typhimurium*, *Sacharomyces cerevisiae* and Chinese hamster ovary cells. *Food Cosmet. Toxicol.*, 1980, *18*, 581.

Sumano, K.; Shibamoto, T. Analysis of acrolein from heated cooking oils and beef fat. *J. Agric. Food Chem.*, 1987, *35*, 909-912.

Summa, C.; Wenzl, T.; Brohee, M.; De La Calle, B.; Anklam, E. Investigation of the correlation of the acrylamide content and the antioxidant activity of model cookies. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 853-859.

Sun, J.B.; Severson, R.F.; Kays, S.J. Quantitative technique of measuring volatile components of baked sweet-potatoes. *Hortscience*, 1993, *28*, 1110-1113.

Surdyk, N.; Roseän, J.; Andersson, R.; Aman, P. Effects of Asparagine, Fructose, and Baking. Conditions on Acrylamide Content in Yeast-Leavened Wheat Bread. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, *52*, 2047-2051.

Svensson, K.; Abramsson, L.; Becker, W.; Glynn, A.; Hellenäs, K.E.; Lind, Y.; et al. Dietary intake of acrylamide in Sweden. *Food Chem. Toxicol.*, 2003, *41*, 1581-1586.

Taeymans, D.; Wood, J.; Ashby, P.; Blank, I.; Studer, A.; Stadler, R.H., et al. A review of acrylamide: An industry perspective on research, analysis, formation, and control. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2004, *44*, 323-347.

Tareke, E.; Rydberg, P.; Karlsson, P.; Eriksson, S.; Törnqvist, M. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 2002, *50*, 4998-5006.

Tateo, F.; Bononi, M.; Andreoli G. Acrylamide levels in cooked rice, tomato sauces and some fast food on the Italian market. *J. Food Compos. Anal.*, 2007, *20*, 232-235.

Taubert, D.; Harlfinger, S.; Henkes, L.; Berkels, R.; Schömig, E. Influence of Processing Parameters on Acrylamide Formation during Frying of Potatoes. *J. Agric. Food Chem.*, 2004, *52*, 2735-2739.

Torres, M.D.A.; Parreño, W.C. Thermal processing and quality optimization. In J. Singh & L. Kaur (Eds.), *Advances in potato chemistry and technology* (First edition ed., pp. 163–219). Elsevier. 2009.

Totani, N.; Yawata, M.; Takada, M., Moriya, M. Acrylamide content of commercial frying oil. *J. Oleo Sci.*, 2007, *56*, 103-106.

- Totlani, V.M.; Peterson, D.G. Epicatechin carbonyl-trapping reactions in aqueous maillard systems: Identification and structural elucidation. *J. Agric. Food Chem.*, 2006, *54*, 7311-7318.
- Tressl, R.; Wondrak, G.T.; Garbe, L.A. Pentoses and hexoses as sources of new melanoidin-like Maillard polymers. *J. Agric. Food Chem.*, 1988, *46*, 1765-1776.
- Truong VD, Pascua YT, Reynolds R, Thompson RL, Palazoğlu TK, Atac Mogol B, Gökmen V,. Processing Treatments for Mitigating Acrylamide Formation in Sweetpotato French Fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2014, *62*, 310–316.
- Vadlamani, K.R.; Seib, P.A. Effect of zinc and aluminum ions in breadmaking. *Cereal Chem.*, 1999, *76*, 355-360.
- Vagnarelli, P.; De Sairo, A.; Cuzzoni, M.T.; Mazza, P.; De Carli, L. Citotoxicity and clastogenic activity of ribose-lysine browning model system. *J. Agric. Food Chem.*, 1991, *39*, 2237-2239.
- Van Boekel, M.A.J.S. Formation of flavour compounds in the Maillard reaction. *Biotechnol. Adv.*, 2006, *24*, 230-234.
- Van Boekel, M.A.J.S.; Zia-Ur-Rehman. Determination of hydroxi-methylfurfural in heated milk by high-performance liquid chromatography. *Milk Dairy J.*, 1987, *41*, 297-306.
- Vattem, D.A.; Shetty, K. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation an its reduction. *Inn. Food Sci. Em. Technol.*, 2003, *4*, 331-338.
- Vigo, M.S.; Malec, L.S.; Gómez, R.G.; Llosa, R.A. Spectrophotometric assay using o-phthalaldehyde for determination of reactive lysine in dairy products. *Food Chem.*, 1992, *44*, 363-365.
- Vivanti, V.; Finotti, F.; Friedman, M. Level of acrylamide precursors asparagine, fructose, glucose and sucrose in potatoes sold at retail in Italy and in the United States. *J. Food Sci.*, 2006, *71*, 81-85
- Volgunov, G.P., Pokhno, M.T. Effect of substrate moisture on the formation of melanoidin substances. *Biokhimiya.*, 1950, *15*, 67-74.
- Vorria, E.; Giannou, V.; Tzia, C. Hazard analysis and critical control point of frying – safety assurance of fried foods. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, *106*, 759-765.
- Wagner, R.; Grosch, W. Key odorants of French fries. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1998, *75*, 1385-1392
- Wang, H.; Lee, A.W.M.; Shuang, S.; Choi, M.M.F. SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour-based indigenous Chinese foods. *Microchem. J.*, 2008, *89*, 90-97.

Wang, Y.Y., Vuolo, L.L.; Spingarn, N.E.; Weisburger, J.H. Formation of mutagens in cooked foods V. the mutagen reducing effect of soy protein concentrates and antioxidants during frying of beef. *Cancer Letters*, 1982, 16, 179-189.

Webb, B.H. Color development in lactose solutions during heating with special reference to the color of evaporated milk. *J. Dairy Sci.*, 1935, 18, 81-96.

Weisburger, J.H. Carcinogenesis in our food and cancer prevention: 137-151. En: Nutritional and toxicological consequences of food processing, Friedman, M. (Ed.), Plenum Press, New York (USA), 1991.

Weisshaar, R. Acrylamide in heated potato products - analytics and formation routes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2004, 106, 786-792.

Weisshaar, R.; Gutsche, B. Formation of acrylamide in heated potato products - model experiments pointing to asparagine as precursor. *Deut. Lebensm-Rundsch.*, 2002, 98, 397-400.

Wenzl, T.; Beatriz de la Calle, M., Anklam E. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Addit. Contam.*, 2003, 20, 885-902.

Whittaker, A.; Marotti, I.; Dinelli, G.; Calamai, L.; Romagnoli, S.; Manzelli, M.; et al. The influence of tuber mineral element composition as a function of geographical location on acrylamide formation in different Italian potato genotypes. *J. Sci. Food Agric.*, 2010, 90, 1968-1976.

WHO (World Health Organization). Health implications of acrylamide in food. *Joint FAO/WHO consultation, Geneva, Switzerland, 25-27 June 2002.*

Wicklund, T.; Ostlie, H.; Lothe, O.; Knutsen, S.H.; Brathen, E.; Kita, A. Acrylamide in potato crisp - the effect of raw material and processing. *Food Sci. Tech.*, 2006, 39, 571-575.

Williams, J.S.E. Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps. *Food Chem.*, 2005, 90, 875-881.

Williams, M.A.; Humphreys, R.C.; Reader, H.P. The analysis of 5-hydroxymethylfurfural in port by high performance liquid chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1983, 34, 57-60.

Wise, A.; Rowland, I.R.; Mallet, A K. Dietary lactose and the metabolic activity of the caecal microfloras of weaning and adult rats. *Food Chem. Toxicol.*, 1984, 22, 113.

Wolf, J.C.; Thompson, D.R.; Reineccius, G.A. Initial losses of available lysine in model systems. *J. Food Sci.*, 1977, 42, 1540-1544.

Xu, Y.; Cui, B.; Ran, R.; Liu, Y.; Chen, H.; Kai, G.; et al. Risk assessment, formation, and mitigation of dietary acrylamide: current status and future prospects. *Food Chem Toxicol.*, 2014, 69, 1-12

- Yamaizumi, Z.; Kasai, H.; Nishimura, S.; Edmonds, C.G.; McCloskey, J.A. Stable Isotope Dilution Quantification of Mutagens in Cooked Foods by Combined Liquid Chromatography-Thermospray Mass Spectrometry. *Mutat. Res.*, 1986, 173, 1-7.
- Yasuhara, A.; Tanaka, Y.; Hengel, M.; Shibamoto T. Gas chromatographic investigation of acrylamide formation in browning model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 3999-4003.
- Yaylayan, V.A.; Stadler, R.H. Acrylamide formation in food: a mechanistic perspective. *J. AOAC Int.*, 2005, 88, 262-267.
- Yaylayan, V.A.; Wnorowski, A.; Perez-Locas, C. Why asparagine needs carbohydrate to generate acrylamide. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, 51, 1753-1757.
- Yoshimura, J.; Funabashi, M.; Simon, H. On the catalysis of the Amadori rearrangement, *Carbohydr. Res.*, 1969, 11, 276-281.
- Yuan Y, Zhang H, Miao Y and Zhuang H. Study on the methods for reducing the acrylamide content in potato slices after microwaving and frying processes. *RSC Advances*, 2014,4, 1004–1009.
- Yusa, V.; Quintas, G.; Pardo, O.; Martí, P.; Pastor, A. Determination of acrylamide in foods by pressurized fluid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry used for a survey of Spanish cereal-based foods. *Food Addit. Contam.*, 2006, 23, 237–244.
- Zamora, R.; Delgado, R.M.; Hidalgo, F.J. Conversion of 3-aminopropionamide and alkylaminopropionamides into acrylamide in model systems. *Mol. Nutr. Food Res.*, 2009, 53, 1512-1520.
- Zamora, R.; Gallardo, E.; Hidalgo, F.J. Strecker degradation initiated by 2,4-decadienal or methyl 13-oxooctadeca-9,11-dienoate in model systems. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 1308-1314.
- Zamora, R.; Hidalgo, F.J. Linoleic acid oxidation in the presence of amino compounds produces pyrroles by carbonyl amine reactions. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, 1258, 319-327.
- Zeng, X.H.; Cheng, K.W.; Du, Y.G.; Kong, R.; Lo, C.; Chu, I. K.; et al. Activities of hydrocolloids as inhibitors of acrylamide formation in model systems and fried potato strips. *Food Chem.*, 2010, 121, 424-428.
- Zhang, Y.; Chien J.; Zhang, X.; Wu, X.; Zhang, Y. Addition of antioxidant of bamboo leaves (AOB) effectively reduces acrylamide formation in potato crisps and French fries. *J. Agric. Food Chem.*, 2007, 55, 523-528.
- Zhang, Y.; Xu, W.; Wu, X.; Zhang, X.; Zhang, Y. Addition of antioxidant from bamboo leaves as an effective way to reduce the formation of acrylamide in fried chicken wings. *Food Addit. Contam.* 2007, 24, 242-251.

Zhang, Y.; Zhang, G.; Zhang, Y. Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: Review and recent developments. *J. Chromatogr. A*, 2005, *1075*, 1-21.

Zhang, Y.; Zhang, Y. Effect of natural antioxidants on kinetic behaviour of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine–glucose model system. *J. Food Eng.*, 2008, *85*, 105-115.

Zhang, Y.; Zhang, Y. Formation and Reduction of Acrylamide in Maillard Reaction: A Review Based on the Current State of Knowledge. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 2007, *47*, 521-542.

Zhang, Y.; Zhang, Y. Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea. *Asia Pacific J. Clin. Nutr.*, 2007, *16*, 131-136.

Zyzak, D.V.; Sanders, R.A.; Stojanovic, M.; Tallmadge, D.H.; Eberhart, B.L.; Ewald, D.K.; et al. Acrylamide formation mechanism in heated foods. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, *51*, 4782-4787.

DIFUSIÓN DE LOS RESULTADOS

Publicaciones

- R. Plata-Guerrero , E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Determination of Reducing Sugar and Asparagine in Potatoes. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*.2009, 32: 2556–2568.

Comunicaciones a Congresos

- R. Plata-Guerrero , E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Determinación de Precursores de Acrilamida en Patata. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos CESIA 2006. Córdoba, Noviembre 2006.
- R. Plata-Guerrero , E. Guerra-Hernández, B. García-Villanova. Determinación de n-carboximetil-lisina en ingredientes proteicos y en el procesado de fórmulas infantiles. IV Congreso de Ingeniería y Tecnología de Alimentos CESIA 2006. Córdoba, Noviembre 2006.
- “20th International Congress of Nutrition” (Granada, Spain, September 15-20, 2013). Entidad organizadora: International Union of Nutritional Sciences: IUNS. Carácter: Internacional. Tipo de participación: Póster.
Título: “Acrylamide formation in different batter and breading formulation during deepfrying of zucchini and exposure estimation”
Autores: Guerra-Hernández, E. ; Plata-Guerrero, R y García-Villanova Ruiz, B.
Publicación actas de congreso: Ann Nutr Metab 63(suppl1) 1841-1842 (2013).