

**Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ingeniería**



**Análisis de condiciones operativas en el proceso de fritura de snacks
para mantener niveles bajos de acrilamidas**

Trabajo de graduación presentado por
Andrea Silva Villa de León, para optar al grado académico de
Maestría en Tecnología de Alimentos y Gestión

Guatemala

2012

**Análisis de condiciones operativas en el proceso de fritura de snacks
para mantener niveles bajos de acrilamidas**

**Universidad del Valle de Guatemala
Facultad de Ingeniería**



**Análisis de condiciones operativas en el proceso de fritura de snacks
para mantener niveles bajos de acrilamidas**

Trabajo de graduación presentado por Andrea Silva Villa de León,
para optar al grado académico de
Maestría en Tecnología de Alimentos y Gestión

**Guatemala
2012**

Vo. Bo.:

(f) 
MSc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz
Asesor

Tribunal Examinador:

(f) 
MSc. Ana Silvia Colmenares de Ruiz
Asesor

(f) 
Licda. Patricia Palacios de Palomo

(f) 
Dra. Mónica Orozco

PREFACIO

El presente trabajo fue elaborado con el fin de aportar a la industria de alimentos metodología e información sobre acrilamidas y poder priorizar los recursos para analizar materias primas y productos elaborados.

El envío de reactivos del extranjero, el tiempo y funcionamiento adecuado de ciertos equipos, además de contar con el financiamiento para la realización de este trabajo de graduación fueron ciertas limitantes que durante este año se presentaron.

Agradezco a la Licda. Odette de Bocaletti, Licda. Irma Orellana, Licda. Ana Luisa Mendizábal, Licda. Ana Silva Colmenares y al Ing. Adolfo Villatoro por el conocimiento y apoyo otorgado a mi persona para la realización de distintas etapas de este trabajo.

ÍNDICE

PREFACIO	v
Lista de cuadros	vii
Lista de figuras	ix
RESUMEN	xi
I. Introducción	1
II. Marco teórico	2
III. Antecedentes	17
IV. Justificación	27
V. Objetivos	28
VI. Metodología	29
VII. Resultados y discusión de resultados	31
VIII. Conclusiones	45
IX. Recomendaciones	46
X. Bibliografía	47
XI. Anexo	49

Lista de cuadros

Cuadro 1. Concentración de azúcares y aminoácidos libres en distintos alimentos	4
Cuadro 2. Formación potencial de acrilamidas en muestras de papa analizadas con base en su contenido de azúcares reductores y aminoácidos libres	11
Cuadro 3. Comparación del potencial de formación de acrilamidas entre distintas variedades.....	12
Cuadro 4. Niveles de acrilamidas en distintos alimentos de distintos países	14
Cuadro 5. Ingesta diaria de acrilamidas relacionada con distintos tipos de cáncer en humanos.....	20
Cuadro 6. Determinación de acrilamidas en alimentos, cocinados en laboratorio con prácticas caseras, con distintas metodologías	24
Cuadro 7. Pruebas realizadas durante la evaluación de la metodología de análisis	32
Cuadro 8. Resultados cromatograma en curvas de calibración.....	35
Cuadro 9. Tiempos de retención por cada molécula identificada en todas las pruebas.....	36
Cuadro 10. Resultados cromatograma en muestras con alta concentración	36
Cuadro 11. Características de las materias primas	38
Cuadro 12. Características de los almidones	39
Cuadro 13. Características de las frituras de yuca y maíz	39
Cuadro 14. Análisis del color.....	41

Cuadro 15. Propiedades físicas de reactivos utilizados en etapa de bromación.....	49
Cuadro 16. Propiedades físicas del solvente	49
Cuadro 17. Propiedades físicas de estándar interno y estándar	50
Cuadro 18. Propiedades físicas de estándar interno y estándar bromados.....	50

Lista de figuras

Figura 1. Estructura química de la acrilamida	2
Figura 2. Aporte por categorías de alimentos más importantes en una dieta expuesta a acrilamidas	21
Figura 3. Concentración de acrilamidas en diferentes productos de papa.....	22
Figura 4. Concentración de acrilamidas en diferentes productos de maíz.....	22
Figura 5. Concentración de acrilamidas en pan tostado, en función del tiempo de tostado	25
Figura 6. Grado de oscurecimiento asociado con el tiempo de tostado en pan blanco y pan café.....	25
Figura 7. Cromatograma mezcla en alta concentración (Prueba IV)	37
Figura 8. Diagrama de estabilidad y actividad de agua	40
Figura 9. Prueba de fritura, Muestra “A” 180°C y Muestra “B” 140°C respectivamente	42
Figura 10. Producto grueso, a 180°C con textura no uniforme y coloración café no deseable.....	43
Figura 11. Muestra C yuca frita 1:33 min. en freidor industrial	43
Figura 12. Muestra D yuca frita 1:44 min. en freidor industrial	43
Figura 13. Muestra PY211-1:40 min, fritura yuca.....	52
Figura 14. Muestra PY211-2:00 min. fritura yuca con mayor intensidad de color café	52
Figura 15. Muestras fritas	53
Figura 16. Purificación.....	53

Figura 17. Etapa de derivatización, muestras bromadas. Coloración amarilla.....	54
Figura 18. Muestras después de refrigeración durante la noche	54
Figura 19. Eliminación de exceso de bromo con tiosulfato de sodio	54
Figura 20. Sistema de extracción	55
Figura 21. Fase acuosa y fase orgánica que contiene acrilamida	55
Figura 22. Filtro de lana de vidrio, separación del sulfato de sodio	55
Figura 23. Rotavapor giratorio al vacío	56
Figura 24. Sistema de evaporación y control de temperatura	56
Figura 25. Sistema analítico para cromatografía de gases	56

RESUMEN

Las acrilamidas son moléculas pequeñas y simples, que se pueden formar en los alimentos por la aplicación de diferentes mecanismos. Principalmente en la cocción y fritura de alimentos que contienen alto contenido de azúcares reductores y del aminoácido de asparagina. La reacción de Maillard es conocida por proporcionarle a los alimentos su color y sabor al ser calentados a altas temperaturas. Su presencia es conocida en alimentos como papas fritas, horneadas o azadas, y otros productos derivados de cereales.

En el 2002, la acrilamida ha sido reconocida por la Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) y la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) como potencial precursor de cáncer en humanos. A pesar de estar igualmente presente en alimentos, que otros elementos carcinogénicos en alimentos, las acrilamidas pueden controlarse. Son pocos los estudios científicos realizados al respecto, y no es posible concluir al consumo y exposición a las acrilamidas como evidencia del cáncer.

Los niveles de acrilamidas aumentan al incrementar el tiempo de calentamiento. Existe información disponible, sobre alimentos y su contribución a la exposición de los consumidores a las acrilamidas. En una población general, se conoce que el promedio de la ingesta diaria de acrilamidas es de 0.3 a 0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ -peso. Por lo que para los niños, significa que consumen de dos a tres veces lo que un adulto ingiere. Además, no cabe descartar que algunos consumidores puedan ingerir niveles más altos al promedio.

Un buen ejemplo es el café, productos elaborados a partir de papa y maíz, entre otros; donde las acrilamidas se forman en el proceso de tostado, fritura u horneado, respectivamente.

Hasta el momento, no se han detectado niveles significativos de acrilamidas en alimentos frescos o hervidos. Únicamente, al calentar los alimentos a temperaturas entre 100 a 120°C se han detectado niveles de acrilamidas en alimentos ricos en carbohidratos entre 100 a 4,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y niveles más bajos en alimentos ricos en proteína (<100 $\mu\text{g}/\text{kg}$). Se han encontrado niveles máximos de acrilamidas a procesos térmicos entre 175 a 180°C.

El presente trabajo comprendió de dos partes: La primera consistió en la implementación de su metodología de análisis por cromatografía de gases (GS/MS) por medio de la derivatización con bromo; la segunda parte fue la caracterización de las materias primas y de dos frituras, yuca y maíz. Se analizó su contenido de acrilamidas encontrando que ambas frituras no las contenían.

I. Introducción

La utilización de temperaturas altas en combinación con ciertas características inherentes e los alimentos, dan lugar a la formación de compuestos que no están presentes en los alimentos frescos. Sin embargo pueden formarse algunos compuestos tóxicos que inciden en la seguridad del alimento. La formación de estos compuestos está relacionada con su proceso tecnológico o culinario. Se conocen los hidrocarburos aromáticos, nitrosaminas y las acrilamidas.

La exposición a las acrilamidas se ha atribuido principalmente al humo del tabaco, sin embargo en el 2002, la Administración Nacional de Alimentos de Suecia (NFA) anunció que las acrilamidas son altamente reactivas y que contienen cierto potencial carcinogénico. La OMS ha recomendado los niveles máximos de acrilamidas en agua ($0.5 \mu\text{g}/\text{kg}$), y en Europa se ha limitado su presencia en envolturas plásticas ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$). Varios estudios han determinado distintos niveles tolerables de la ingesta de acrilamidas, para efectos neurotóxicos se estima $40 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día y para efectos cancerígenos se estimó de $2.6 \mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día.

Es importante para la industria de alimentos, controlar, reducir y cuantificar el contenido de acrilamidas en los alimentos elaborados. La OMS cataloga a las acrilamidas como posibles precursores de cáncer en humanos. Por lo que, como un aporte a la industria, se revisó el método de cromatografía de gases (GC-MS) para la determinación de acrilamidas en frituras o aperitivos. La implementación del método toma una serie de etapas en la preparación de muestras y se basa principalmente en la reacción de bromación del doble enlace de la molécula de acrilamida. Se recomienda la implementación de un método más seguro para la salud del analista, ya que la comercialización de bromo se ha restringido con el tiempo, y de un método más ágil.

El presente trabajo constó de dos partes, la primera fue la implementación del método para el análisis de las acrilamidas por cromatografía de gases (GS/MS), lo que permitió determinar los tiempos de retención en la cromatografía realizada con una columna HP-5MS, determinando así para el estándar 2,3-dibromopropionamida un tiempo de 9.264 ± 0.472 minutos y para el estándar interno 2,3-dibromo,N,N-dimetilpropionamida 8.718 ± 0.030 minutos, en la segunda parte del trabajo consistió en el estudio de los parámetros que pueden influenciar la presencia de acrilamidas en las frituras. Se analizaron frituras de consumo común, los cuales, por su contenido de azúcares reductores y su baja actividad de agua, son alimentos que por las condiciones de fritura en las que se procesan tienen un riesgo alto de formar acrilamidas. Reducir este factor de riesgo es importante para los consumidores, por lo que se recomienda la utilización de levaduras naturales que reducen el contenido de asparagina en aquellos alimentos procesados en altas temperaturas y, por ende, reducir la formación de acrilamidas.

II. Marco teórico

A. Síntesis química

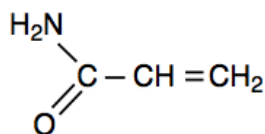
Los métodos de procesamiento y preservación de productos alimenticios por medio de tratamientos térmicos (cocción, horneado, asado, fritura, esterilización) a temperaturas entre 90 y 220°C son comúnmente utilizados. Las altas temperaturas pueden conducir a la formación de componentes tóxicos que reducen tanto la seguridad del alimento como su valor nutricional (Claeys *et al.*, 2005).

Algunas de las posibilidades de formación más comunes son:

- Formación vía acroleína o ácido acrílico, el cual se deriva de la degradación de lípidos, carbohidratos y aminoácidos libres.
- Formación vía deshidratación/descarboxilación de ciertos ácidos orgánicos comunes, como ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico
- Formación directa de aminoácido

(FAO/WHO, 2002)

Figura 1. Estructura química de la acrilamida.



(Claeys *et al.*, 2005)

Los componentes que se conocen como carcinogénicos y mutagénicos, que se forman en los distintos procesos mencionados, son: aminas heterocíclicas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, y nitrosaminas. Y ahora las acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Se conoce a las acrilamidas como moléculas que pueden reaccionar por dos mecanismos, iónico y radical libre, y su presencia en alimentos en su forma libre fue inesperada (Ahn *et al.*, 2002).

Las acrilamidas son muy reactivas, principalmente, por la presencia de un doble enlace. La polimerización de las acrilamidas ocurre por medio de la reacción de radicales libres con su doble enlace. Y reacciona como un electrófilo en los carbonos 1,4- por la adición de grupos nucleófilos como SH⁻ o NH₂⁻. En el cuerpo humano, las acrilamidas se metabolizan como glicidamida (GA), compuesto reactivo formado por epo-oxidación, que induce a reacciones

mutagénicas y cancerígenas. También forma un aducto con la hemoglobina, el cual es utilizado para la determinación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Se han propuesto varios mecanismos teóricos, sobre la formación de acrilamidas en alimentos cocinados. El mecanismo más probable, para su formación es a través de la reacción de Maillard o pardeamiento no enzimática. Es la reacción entre aminoácidos (principalmente asparagina) y un grupo carbonilo reactivo (como glucosa), que incluye intermediarios como la base de Schiff (Claeys *et al.*, 2005). Es decir, reacciona con un azúcar reductor a altas temperaturas (mayores a 120°C) (Konings *et al.*, 2010).

En esta reacción puede formarse la acroleína como precursor de las acrilamidas. Paralelo a la reacción de Maillard, puede formarse 2-propanol acroleína, debido a la transformación de lípidos o por degradación de aminoácidos, proteínas y carbohidratos (Claeys *et al.*, 2005).

La oxidación de la acroleína a ácido acrílico y subsecuente su reacción con amonio, generado en la pirolisis de nitrógeno proveniente de compuestos presentes en alimentos, resulta la formación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Otros investigadores, Backalski, Lau, Lewis y Seaman (2003) determinaron que las acrilamidas pueden formarse directamente del re-arreglo de componentes que contienen nitrógeno, de forma natural en los alimentos, sin la necesidad de involucrar la acroleína (Claeys *et al.*, 2005). Las poliacrilamidas provenientes de herbicidas o las utilizadas en suelos no son fuente de acrilamidas en alimentos cocinados (Claeys *et al.*, 2005).

Sin embargo, todos los alimentos tienen un número de variables que pueden influenciar en la formación de acrilamidas. No solo propiedades intrínsecas o factores composicionales que pueden afectar, por ejemplo, variaciones en condiciones de almacenamiento y estaciones climáticas. Entre los factores extrínsecos es posible encontrar aditivos y el medio de calentamiento, que pueden afectar la formación de acrilamidas significativamente. Así como los efectos individuales de estos factores deben conocerse, también los efectos de sus conjugaciones. Únicamente su entendimiento a este nivel permitirá ser más precisos en las especificaciones de alimentos y otros sistemas, respecto a la formación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Factores que afectan la primera etapa de la reacción de Maillard, como pH y actividad de agua (a_w) son los que influyen principalmente la formación de acrilamidas. El Cuadro 1 expone algunos valores de azúcares reductores y contenidos de asparagina en distintos alimentos (Claeys *et al.*, 2005).

Cuadro 1. Concentración de azúcares y aminoácidos libres en distintos alimentos (mg/kg).

Producto	Asparagina	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Comentario
Papa	2,010-4,250	97-2,550	30-1,537	430-1,597	Distintos cultivos, Peso fresco
	6,350-36,540				Diferentes niveles nutricionales, Base seca
		170-270	60-250	1,480-2,080	Variedad Panda, Saturna y Tomensa, Peso fresco
		97-1,800	24-330		Variedad Fontane, Lady Claire, y Naturella con distinto N-fertilizante, Peso fresco
	11,500	370	180		Base seca
Maíz	< 10				Almidón de maíz
		64-139	155-156	73-366	Mazorca de maíz amarillo, Peso fresco
	596-1,073				Harina de maíz (Oh545o2)
Trigo	167				Harina
	20				Harina oscura
Centeno	173				Centeno alto en proteína
Café	Aprox. 20-30	5,000-6,500 ¹		18,000-95,000	Granos, desde inmaduros (negros) a maduros
Espinaca	505-1,621				Distintos niveles nutricionales
		2	51		Peso fresco
Cocoa	309				En polvo
Carne	0.17-0.40				Bovina, distintos músculos
	1.1-10.7				Cerdo, variedad respecto a calidad

(Claeys *et al.*, 2005)

Además de los azúcares reductores y aminoácidos, se encontró que las grasas y aceites pueden participar en la formación de acrilamidas. Otros factores que requieren considerarse en los alimentos, son matrices ricas en carbohidratos y matrices ricas en proteínas (Claeys *et al.*, 2005).

En lo que corresponde a la variedad de papa que se procesa, la industria debe encontrar el tipo de papa que se adapte tanto a su proceso como a los niveles de acrilamidas que forma en su proceso. El almacenamiento de las papas como materia prima tiene un gran impacto en la formación de las mismas, por lo que optimizando sus condiciones. En particular la temperatura debe ser menor a 10°C, para reducir los niveles de azúcares reductores debido a la degradación

¹ Azúcares reductores

del almidón durante su almacenamiento. Otro factor importante es la tecnología utilizada en la producción de los derivados de papa (Boroushaki *et al.*, 2010).

B. Efecto de distintos factores sobre la formación de acrilamidas

1. **Azúcares reductores.** Almidones y azúcares, como sacarosa, lactosa y maltosa pueden fácilmente hidrolizarse con el calentamiento a temperaturas superiores a 100°C a un pH levemente ácido. Consecuentemente, el proceso térmico genera continuamente monosacáridos provenientes de carbohidratos complejos, tales como glucosa, deoxi-glucosa, ribosa, gliceraldehído, glioxal, entre otros, pueden generar acrilamidas a partir de asparagina (Claeys *et al.*, 2005).

Mientras más corta la cadena del azúcar más acrilamidas son generadas, lo que concuerda con la reacción de Maillard. Generalmente, mientras más corta la cadena de carbonos del azúcar, es mayor la pérdida de lisina en la reacción de Maillard y por ende es más reactivo el azúcar. Ya que al ser corta la cadena, está sujeta a la formación de la estructura hemiacetal cíclico y subsecuentemente el grupo carbonil fácilmente se queda disponible para un ataque nucleofílico por la alfa-amina de la asparagina (Claeys *et al.*, 2005).

La producción de acrilamidas, se ha reportado ser proporcional a los niveles de glucosa y fructosa en alimentos. Por ejemplo, las acrilamidas contenidas en una papa calentada, aumenta su contenido si se incrementa el contenido de glucosa o fructosa en un 3%. Con dosis aún más altas, el contenido de acrilamidas disminuye o disminuye la velocidad de producirse, presuntamente por el aumento de reacciones de eliminación (Claeys *et al.*, 2005).

Respecto a la reactividad encontrada con glucosa, fructosa, galactosa y sacarosa, la síntesis de acrilamidas es comparable. En un sistema de asparagina-azúcar, condiciones secas, se obtuvo una menor generación de acrilamidas con sacarosa (0.48) que con glucosa (1.0) o fructosa (1.8). Además, la adición de un 40% de sacarosa a una harina de papa o harina de trigo no dio como resultado un incremento de acrilamidas. Sin embargo, al adicionar fructosa en vez de sacarosa, sí se obtuvo un incremento de acrilamidas, tanto en la harina de papa como en la de trigo (Claeys *et al.*, 2005).

2. **Aminoácidos.** Varios experimentos demostraron que la asparagina, y no los azúcares reductores, le proporciona la mayor parte de la estructura molecular a las acrilamidas. La asparagina representa el 40% del total de los aminoácidos contenidos en la papa, y el 14% y el 18% de los aminoácidos libres en la harina de trigo y centeno con alto contenido proteico, respectivamente (Claeys *et al.*, 2005).

Con base en la proporción de asparagina/glucosa una razón de 0.5 equimolar, es favorable para la formación de acrilamidas. Aunque la asparagina y los aminoácidos en general tienen un rol importante en la formación de acrilamidas en alimentos procesados con tratamientos

térmicos, el contenido de acrilamidas es poco o para nada, correlacionado con la concentración total de asparagina en tubérculos de papa (Claeys *et al.*, 2005).

Sin embargo, para la harina de trigo y harina de centeno, esta correlación tiene una mayor relación con la síntesis de acrilamidas. Más aún, al agregar fructosa a la harina de trigo, con niveles bajos de asparagina, no influencia al contenido de acrilamidas en la costra o exterior de pan con levadura. Solamente al agregar asparagina, se determina un mayor contenido de acrilamidas significativo (Claeys *et al.*, 2005).

Por lo que la asparagina tiende a ser más determinante respecto a la formación de acrilamidas en cereales, así como los azúcares reductores en papa. No se han encontrado otros aminoácidos que contribuyan a la formación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

3. Grasas y aceites. Ciertas investigaciones sugieren que la formación de acrilamidas también se ve favorecida por el mecanismo de acroleínas, sintetizado a partir de glicerol o como resultado de la oxidación de ácidos grasos polinsaturados y la degradación de sus productos. Ya que cuando los aceites son calentados por encima de su punto de humo, el glicerol se degrada como acroleína. La formación de acroleínas aumenta conforme el nivel de instauración del aceite sea más alto, por lo que el punto de humo es más bajo (Claeys *et al.*, 2005).

No obstante, parece ser que las acrilamidas no son sintetizadas por los precursores presentes en aceite (especialmente acroleínas) y la formación de acrilamidas no es de naturaleza oxidativa. Las grasas oxidadas compiten con otros compuestos carbonilos, por lo que contribuyen a la proporción asparagina/carbonilos afectando la formación de acrilamidas. El tipo de aceite influencia la tasa de producción de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

4. Matrices ricas en carbohidratos vs. matrices ricas en proteínas. Carne frita o asada y productos derivados de pescado contienen bajos niveles de acrilamidas al compararse con papa o productos derivados de cereales. Aun así, la generación de acrilamidas es mayor en un sistema compuesto por asparagina y glucosa en papa que en una matriz compuesta con harina de trigo o con carne de res (Claeys *et al.*, 2005).

Es un hecho que la composición de una matriz alimenticia influencia promoviendo, neutralizando o retardando la formación de acrilamidas. Por lo que son factores catalíticos asociados como, la capacidad de formación enlaces con agua la cual favorece la competencia de reacciones y aumenta la capacidad de retener las acrilamidas formadas por medio de una reacción posterior, formación de enlaces (Claeys *et al.*, 2005).

Al fortificar almidón de trigo y harina de trigo con asparagina a la papa, presenta una contracción de acrilamidas cinco veces menor al contenido de acrilamidas únicamente en papa (Claeys *et al.*, 2005).

Considerando un alimento rico en proteínas vs un alimento alto en almidón, se observa que la degradación de acrilamidas es más pronunciada en un sistema de carne de res que en otras matrices. Por lo que en este tipo de casos, resalta el mecanismo de eliminación (Claeys *et al.*, 2005).

La formación de enlaces entre acrilamidas y proteínas en carne de res es poco convincente, debido a que las acrilamidas son muy bien conocidas por reaccionar con los aminoácidos de las proteínas. La formación de aductos con hemoglobina es un ejemplo. Por lo que la hipótesis se sostiene debido a que la adición de β -lactoglobulina a un sistema de asparagina-glucosa resulta en contener una baja concentración de acrilamidas respecto al agregar a su homólogo que se encuentra en la carne de res (Claeys *et al.*, 2005).

La adición de lisina o cisteína a un sistema de asparagina-glucosa, debido a la reactividad de su grupo amino libre, reduce la formación de acrilamidas. Una reducción en esta síntesis, también es observada con la adición de glicina, alanina, glutamina o ácido glutámico a una muestra homogenizada de papa (Claeys *et al.*, 2005).

Difícilmente se forman acrilamidas en almidón puro. El almidón no se involucra en la formación de acrilamidas y tampoco parece influenciar en la reacción de eliminación de las mismas. Por lo que al encontrarse una matriz de almidón rica en proteína, estas últimas conducen a la reacción de eliminación de las acrilamidas, lo que dificulta la acumulación de acrilamidas a altas concentraciones (Claeys *et al.*, 2005).

5. Tamaño de partícula. La formación de acrilamidas no se ve favorecida ni menos beneficiada por partículas finas o gruesas en papa. Sin embargo, esto no se puede generalizar, ya que para los cereales y sus derivados el tamaño de partícula incide directamente debido al contenido proteico y de almidón del cereal.

Parte del almidón se daña por efectos mecánicos durante la molienda de los granos, cuya intensidad varía dependiendo de la molienda y dureza del grano. A mayor daño en gránulos de almidón, mayor susceptibilidad a hidrólisis enzimática (Claeys *et al.*, 2005).

El grado de molienda afecta tanto el contenido de asparagina como el de azúcares reductores. Niveles bajos de acrilamidas pueden ser causa de harinas poco molidas (Claeys *et al.*, 2005).

6. pH. Tanto la reacción de Maillard como la formación de acrilamidas dependen del pH del medio.

El pH afecta la reactividad de los azúcares reductores y del grupo amino. Un pH alto favorece el rompimiento de la molécula de azúcar y favorece la forma no-protonada del grupo amino, ambas consideradas como la forma reactiva de cada uno (Claeys *et al.*, 2005).

El pH óptimo para la formación de acrilamidas es alrededor de 7-8. La formación de acrilamidas en un sistema de asparagina-glucosa puede disminuirse en un 99% al reducir el pH de 7 a 4. Esto causa que la forma no-protonada del grupo alfa-amino de la asparagina se convierta en su forma amino-protonada ($-\text{NH}_3^+$), por lo que se bloquea la formación de la base de Schiff's, la cual es esencial en la etapa de formación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Se ha demostrado que al sumergir chips de maíz horneados o fritos y papas fritas en una solución de ácido cítrico de 0.1-0.2% o 1-2% respectivamente, reduce la producción de acrilamidas. Mismos resultados se obtuvieron al tratar rodajas de papa en una solución de 1-2% de ácido cítrico previo a su fritura a 150°C. El ácido cítrico no afecta la concentración de asparagina ni la concentración de azúcares reductores, por lo que la reducción en la formación de acrilamidas es directamente consecuencia del efecto del pH (Claeys *et al.*, 2005).

En experimentos realizados a temperaturas de fritura entre 179-190°C, no es significativo el efecto del ácido cítrico respecto al contenido de acrilamidas. Esto únicamente causa cambios de color y textura en el alimento. Sin embargo, la fritura se ve afectada y acelera la rancidez (Claeys *et al.*, 2005).

El calentamiento causa una disminución del pH debido a la disociación de agua (Claeys *et al.*, 2005).

7. Humedad y actividad de agua (a_w). La formación de acrilamidas parece ser un fenómeno que toma lugar en el área superficial de los alimentos. Su formación es limitada a los métodos de cocción formando una costra en áreas con baja humedad en el alimento. Alimentos húmedos, como papa fresca o masas, la formación de acrilamidas es despreciable (Claeys *et al.*, 2005).

Si la humedad de la papa se sitúa entre 10-20%, la concentración de acrilamidas es comparable con la obtenida en muestras secas. Esto coincide con la reacción de Maillard, la cual es más eficiente una humedad entre 12-18%. A humedades bajas, no solo se acelera la formación de acrilamidas sino que la reacción de eliminación también (Claeys *et al.*, 2005).

8. Ambiente *in situ*. Se ve afectado por factores intrínsecos (como el tipo de cultivo) y factores extrínsecos (como almacenamiento, pre-tratamientos) que son variables. Sin embargo, cuando se traslada un sistema cerrado (laboratorio) a uno abierto (industrial), la temperatura y condiciones favorables para la formación de acrilamidas dependen del fenómeno de transferencia de calor que toma lugar (Claeys *et al.*, 2005).

9. Medio de calentamiento. Debido a que el alimento y el medio de calentamiento (aire seco, aceite) entran en contacto, el fenómeno dinámico de transferencia de calor y de masa, afectan la formación de acrilamidas. Ya que existen distintos factores relacionados: propiedades térmicas y fisicoquímicas del alimento, del medio de calentamiento y del equipo de procesamiento, la geometría a del alimento y la temperatura del medio de calentamiento (Claeys *et al.*, 2005).

Por lo general, el medio de calentamiento alcanza temperaturas entre 180-200 °C, pero el alimento en sí se enfría por efectos de evaporación de la humedad. La mayoría de alimentos mantienen una humedad interna, con la temperatura disminuyendo desde un alto valor en su superficie hasta 100°C debajo de su costra. Temperaturas arriba de los 100°C, únicamente son alcanzadas cuando el alimento llega a estar totalmente seco. Durante el proceso de fritura en aceite, el fenómeno de transferencia de masa toma lugar principalmente en el intercambio de agua por aceite. El vapor de agua crea un tipo buffer alrededor del alimento, restringiéndolo de la transferencia de calor, y conservando la temperatura del alimento por debajo a la temperatura del aceite (Claeys *et al.*, 2005).

El tipo de medio utilizado en la fritura y la utilización de aditivos (como agentes antiespumantes) pueden influenciar la transferencia de calor, aumentando la tensión superficial del aceite. El cambio de la tensión superficial afecta el tamaño de burbujas de vapor que rodean el alimento y son liberadas como consecuencia de la transferencia de calor. Por ejemplo, en papas fritas, un alto contenido de acrilamidas se observó cuando se utilizó aceite de palma o cuando se adiciona silicón al aceite de fritura. El aceite de palma contiene entre 6-8% diglicéridos que probablemente aumentan al aumentar la transferencia de calor por la emulsión de componentes (Claeys *et al.*, 2005).

Una correlación entre el grado de degradación del aceite expresado como el contenido de materiales polares y el nivel de acrilamidas no se ha encontrado. Sin embargo, se observa un incremento de acrilamidas en papas al agregar una mezcla de distintos aceites (como sésamo, maíz y oliva) dependiendo de la cantidad utilizada. Al calentar con cada uno de estos aceites por separado, no se incrementan los niveles de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

Debido a la evaporación del agua, los resultados pueden variar en lo que respecta a la formación de acrilamidas, expresada en peso previo a calentamiento o en términos de base seca.

Por ejemplo, papas conteniendo aprox. 80% de agua, la pérdida de masa durante el calentamiento en horno se debe a la evaporación del agua y puede ser hasta el 50% de su peso fresco. Esto implica que los valores de acrilamidas expresados en base fresca pueden ser doblemente mayores al expresado en base seca. Al freír en un sartén, la pérdida de agua se compensa con el aceite absorbido, por ende la pérdida de masa es menor. Este fenómeno, sobre la pérdida de agua y absorción de aceite, se vuelve mas intenso a mayores temperaturas y menor grosor del alimento (Claeys *et al.*, 2005).

10. Variedad del cultivo. Distintos cultivos de cereales o papas se han caracterizado en base a las concentraciones de los precursores de acrilamidas. Lo cual se refleja en el cuadro 2, con los rangos de asparagina o azúcar determinados (Claeys *et al.*, 2005).

En el cuadro 2 de Amrein *et al* (2003) y en el cuadro 3 de Biedermann *et al* (2002) se encuentran algunas variedades de papa y sus respectivos niveles de aminoácidos y azúcares reductores, relacionados con el potencial de formación de acrilamidas de cada una (Claeys *et al.*, 2005)

Ambos cuadros comparan la formación de acrilamidas en papas comerciales de diferentes cultivos. Sin embargo, los resultados no descartan la influencia del tipo de cultivo respecto a la formación de acrilamidas, pero parece ser que otros factores son igual de importantes. Estos resultados no están relacionados con factores relevantes como sus condiciones de almacenamiento (Claeys *et al.*, 2005).

Además, existen diferencias individuales entre los cultivos ya que dependen de su contenido de azúcar. Algunas papas son verdes (por efectos de luz) y pueden contener 5.5 veces más azúcares reductores (Claeys *et al.*, 2005).

11. Almacenamiento. El almacenamiento de papas por debajo de 8-10°C causa un incremento fuerte en azúcares que se parten del almidón, el proceso se conoce como “endulzamiento a temperaturas bajas” (LTS, por sus siglas en ingles). La liberación de azúcares es una reacción de la papa para evitar su congelamiento. Desafortunadamente, a mayores niveles de azúcares reductores, mayor los niveles de acrilamidas generados. El incremento de azúcares reductores y del potencial de formación de acrilamidas no se puede obviar ni con 5 días de almacenamiento. Se ha demostrado que en un periodo de 40h de almacenamiento a 4°C, no se observa un incremento. Por lo que la temperatura ambiente aumenta la actividad enzimática en la papa. (Claeys *et al.*, 2005).

Cuando las papas se almacenan a temperatura de refrigeración por poco tiempo, y se reacondicionan a temperaturas un poco más altas (12- 25°C), disminuye el contenido de azúcares reductores nuevamente. A períodos largos, esto es irreversible (Claeys *et al.*, 2005).

Cuadro 2. Formación potencial de acrilamidas en muestras de papa analizadas con base en su contenido de azúcares reductores y aminoácidos libres.

Cultivo	n	Aminoácidos libres Totales	Ácido aspártico (µg/kg)	Ácido glutámico (µg/kg)	Glutamina (µg/kg)	Asparagina (µg/kg)	Glucosa + Fructosa (µg/kg)	Acrilamidas (µg/kg)
Agria	7	5946 -15%	427 -27%	435 -65%	892 -16%	2959 -13%	1020 -73%	703 -79%
Appell	1	7338	253	296	1588	3390	2574	1602
Binije	7	7152 -15%	473 -16%	559 -23%	1080 -18%	3200 -12%	1676 -55%	930 -45%
Charlotte	7	8003 -8%	467 -17%	492 -29%	1541 -16%	3640 -8%	877 -96%	579 -108%
Desirée	1	7233	437	377	1024	3568	1872	1239
Eba	6	5840 -11%	318 -13%	407 -33%	1216 -16%	2543 -12%	2802 -67%	1553 -96%
Erntestolz	2	6661 -16%	453 -13%	514 -4%	927	3538 -15%	232 -70%	194 -76%
Hermes	2	7417 -33%	446 -2%	231 -101%	960 -34%	4438 -45%	904 -45%	791 -85%
Lady Claire	2	6815 -1%	510 -7%	479 -6%	1484 -4%	3165	157 -25%	105 -7%
Markies	2	8337 -22%	407 -12%	458 -4%	1579 -24%	4392 -27%	552 -34%	494 -84%
Naturella	1	6778	319	389	1184	3494	6734	3823 0%
Nicola	3	7160 -18%	399	411 -24%	1141 -46%	3444 -25%	2587 -41%	1518 -3%
Panda	5	5995 -22%	538	555 -18%	799 -27%	2727 -22%	351 -98%	209 -111%
Santana	1	6171	291	354	1078	2518	1215	386

(Amrein *et al.*, 2004)

Cuadro 3. Comparación del potencial de formación de acrilamidas entre distintas variedades.

Cultivo	Cosecha	120°C, 40 min		160°C, 20min	
		Acrilamidas (µg/kg)	Eliminación (%)	Acrilamidas (µg/kg)	Eliminación (%)
Sirtema	2002	1400	66	1500	93
	2002	750	58	1200	95
Charlotte	2002	2350	70	2300	93
	2002	600	70	1400	92
	2002	150	57	650	91
	2002	120	45	700	83
	2002	500	57	1300	95
Agria	2001	1800	65	2200	92
	2001	2200	71	3100	94
	2001	500	77	1200	94
	2002	140	56	990	81
Bintje	2001	1150	78	1400	95
	2001	1300	72	2000	94
	2001	750	64	1600	91
	2001	1000	69	1150	96
	2001	700	50	1450	93
Urgenta	2001	6600	79	5750	96
	2001	3300	74	3200	97
	2002	308	42	1100	71
	2002	160	65	600	96
Ostara	201	3150	82	3250	98
	2001	1000	50	2000	89
	2002	180	52	830	87
Nicola	2002	70	74	260	96
	2002	2260	74	3500	97
Amandine	2002	2050	69	1420	96
Agata	2002	980	72	1000	97

(Biedermann *et al.*, 2002)

Respecto a los niveles de aminoácidos, durante el almacenamiento a 10°C existe una mayor acumulación de asparagina y glutamina que a 5°C (Claeys *et al.*, 2005).

La luz tiende a activar las enzimas de la papa, aumentando la concentración de azúcares reductores. Por lo que la papa debe ser almacenada en la oscuridad a más de 8°C. A mayores temperaturas, representa un problema para el almacenamiento a largo plazo (Claeys *et al.*, 2005).

Por lo que contar con la disponibilidad de papa de calidad por durante un año, requiere condiciones de almacenamiento exitosas y que prevengan la descomposición o germinación de la papa. Por lo que como alternativa para el almacenamiento a bajas temperaturas, es posible utilizar agentes químicos para evitar la germinación. Lo cual pueden estar o no aprobados por entidades gubernamentales y pueden aportar algún sabor extraño al producto. Aunque es imposible evitar la germinación de papas con un alto potencial de formación de acrilamidas (Claeys *et al.*, 2005).

La congelación es un factor que aumenta la formación de acrilamidas en papa, debido al daño que sufre el almidón, aumenta la concentración de precursores de acrilamidas. El almacenamiento de papas ya cocinadas no libera azúcares ni enzimas debido a que ya están inactivos (Claeys *et al.*, 2005).

Cereales pueden almacenarse por 2-3 años sin perder la calidad, mientras la humedad esté entre 20-24% en la cosecha y luego se reduzca a 14%. Se encontró en productos horneados elaborados, que contienen jengibre, su el almacenamiento a temperatura ambiente por 6 meses reduce las acrilamidas de 850 a 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Claeys *et al.*, 2005).

C. Condiciones recomendadas para reducir acrilamidas en alimentos

Estudios han demostrado que hay dos formas básicas para la reducción de acrilamidas en papalinas. La primera, es a través de la materia prima, la papa. Debido a que las papas tienen un potencial considerable para la formación de acrilamidas y la única que presenta concentraciones significativamente altas en sus productos derivados. Sus niveles pueden variar dependiendo de distintos factores, según el cultivo o tipo de papa (ver inciso x), otros factores ambientales (como fertilizantes, clima, ubicación, etc.), y sobretodo depende de los niveles de asparagina (Boroushaki *et al.*, 2010).

Para reducir el contenido de acrilamidas en alimentos, no hay mas que ajustar parámetros de proceso: tiempo y temperatura, o reducir la concentración de precursores de acrilamidas.

1. **Procesamiento intenso.** Durante el proceso térmico (horneado, fritura, o asado) el contenido de acrilamidas llega a alcanzar un máximo. Luego disminuye, debido al agotamiento de precursores de acrilamidas, reacción de eliminación, enlazando a las acrilamidas con constituyentes activos en el alimento (como tioles).

2. **Selección de materia prima con bajas concentraciones de azúcares reductores.** Para la producción de papas fritas y papalina, se selecciona una variedad de papa con un contenido bajo de azúcares reductores. Ya que la papa debe ser crujiente antes de su oscurecimiento. Variedades con un contenido menor a 0.2 g/kg de azúcares reductores no son

deseables, ya que se requiere un leve oscurecimiento. Por lo que el contenido óptimo de azúcares reductores, para estos productos, debe ser entre 0.2 – 1.0 g/kg.

3. **Sustitución azúcares** Otra opción que puede reducir la formación de acrilamidas es la sustitución de un azúcar reductor, altamente activo (fructosa), por uno de menor actividad (glucosa).
4. **Selección de materia prima con bajas concentraciones de aminoácidos.** Se puede seleccionar variedades con niveles bajos de asparagina. En el caso de los cereales, pueden seleccionarse con base en los mismos criterios (Cuadro 4). Se debe seleccionar una variedad cuidadosamente y tener en cuenta los efectos relacionados con el contenido nutritivo y la calidad del producto.

Cuadro 4. Niveles de acrilamidas en distintos alimentos de distintos países.

Alimento / Categoría	Niveles de Acrilamidas ($\mu\text{g}/\text{kg}$)			
	Promedio	Mediana	Mínimo – Máximo	No. de muestras
Papalinas de papa/Papa dulce ²	1,312	1,343	170-2,287	38
Chips de papa ³	537	330	< 50-3,500	39
Productos a base de pasta	36	36	< 30-42	2
Productos horneados	112	< 50	< 50-450	19
Galletas tipo cracker, tostadas y hojuelas de pan	423	142	< 30 – 3,200	58
Cereales para desayuno	298	150	< 30 – 1,346	29
Chips de maíz	218	167	34-416	7
Pan, suave	50	30	< 30-162	41
Pescado y mariscos, desmenuzados, en pasta	35	35	30-39	4
Aves de corral, desmenuzados, en pasta	52	52	39-64	2
Bebidas instantáneas de malta	50	50	< 50-70	3
Chocolate en polvo	75	75	< 50-100	2
Café en polvo	200	200	170-230	3
Cerveza	< 30	< 30	< 30	1

(FAO/WHO, 2002)

5. **Aplicación de pre-tratamientos para reducir precursores de acrilamida.:** Puede removerse (por medio de hidrólisis) o bloquear las moléculas de asparagina en un tratamiento previo al procesamiento.

² Rodajas delgadas y fritas

³ Rodajas gruesas y fritas

La hidrólisis de la asparagina, consiste en agregar un químico (catalizador ácido o básico) o una enzima (asparaginasa u otra amidasa) para formar ácido aspártico y amonio. Este es un método limitado por la alteración de las membranas que liberan asparagina para entrar en contacto con la asparaginasa. En la actualidad, la enzima asparaginasa es comúnmente utilizada en el medicamento para la leucemia linfoblástica aguda.

El bloqueo del grupo amino primario de la asparagina, previene la formación del intermediario N-glucósido que forma acrilamidas. De esta forma el grupo amino ya no tiene el potencial de formar la base de Schiff, la cual participa en la formación de acrilamidas.

Otro tratamiento similar, es la acetilación de asparagina a N-acetilasparagina.

6. **Blanqueo o escaldado.** Se aplica para reducir la formación de manchas cafés durante el calentamiento, disminuyendo los azúcares reductores de la superficie. El tratamiento reduce la absorción de aceite debido a la gelatinización del almidón en la superficie, y también extrae la asparagina, por lo que la formación de acrilamidas se reduce.

El sumergir la papa en agua fría es menos efectiva, debido a que el blanqueo permeabiliza las membranas permitiendo extraer precursores de acrilamidas.

La extracción por medio de agua en movimiento o por medio de movilizar las papas con agua, ayuda a eliminar el almidón de la superficie, sin embargo el almidón se requiere para la formación de la corteza del producto. Hervir las papas, previo a su fritura, atenúa la formación de acrilamidas.

7. **Antioxidantes.** El uso de BHT, sesamol y vitamina E en carne, presentó una mayor concentración de acrilamidas que una muestra control. Investigaciones relacionadas con el uso de antioxidantes para reducir precursores de acrilamidas no es definitivo debido a que se han obtenido resultados contradictorios. Es posible que estos protejan las acrilamidas formadas de radicales de iniciación en otras reacciones.

Sin embargo, se ha demostrado que el uso de especias que contengan flavonoides o romero, pueden reducir la formación de acrilamidas durante la fritura de papa rebanada.

Los gránulos de almidón contenidos en papa y en otras plantas, forma complejos con proteínas o polímeros biológicos presentes en el tejido. Es por eso que el contenido de acrilamidas aumentan al estar presente los compuestos fenólicos, ya que estos interactúan con proteínas alterando su estructura terciaria, conduciendo la disociación del almidón complejo aumentando la disponibilidad para reaccionar con las proteínas y se degradan con el tratamiento

térmico (fritura) presentándose ante el almidón. Aumentando así la los productos de la reacción de Maillard y acrilamidas.

El ácido ascórbico (vitamina C) se encuentra en tubérculos de papa en un rango de 8-30 mg/100g papa fresca. Pero disminuye en el almacenamiento de la misma. Este se elimina en tratamientos térmicos y enzimáticos. Al adicionar ácido ascórbico en solución al 1%, se reduce pobremente el contenido de acrilamidas. Sin embargo al aumentar la concentración de ácido ascórbico a 1.7% puede reducir el contenido significativamente, combinando una reducción de agua con el enlazamiento de agua.

8. **Fertilizantes** .El uso de fertilizantes con amonio o bicarbonato de amonio en cereales, aumenta el potencial de formar acrilamidas. Este actúa como agente catalizador de la reacción de transformación de asparagina a su forma acrilamida.

9. **Agentes leudantes** La sustitución de agentes leudantes con sales de amonio por carbonato de sodio o de potasio puede reducir los niveles de acrilamidas significativamente. Aunque el sabor es un factor a considerar. (Claeys *et al.*, 2005)

(Claeys *et al.*, 2005)

III. Antecedentes

A. Las acrilamidas

Las acrilamidas (AA) son intermediarios químicos (monómeros) principalmente producidos en la síntesis de poliacrilamidas. Las poliacrilamidas son utilizadas desde 1960, principalmente, como un floculante para la clarificación de agua potable y aguas de desecho. Sin embargo, también tiene un gran número de aplicaciones, por ejemplo: como aditivo en cosméticos, agentes de acondicionamiento para suelos y construcción, geles utilizadas en análisis de laboratorio, en la industria del papel y pizarras (Aureli *et al.*, 2007).

Existe documentación desde 1986 sobre la toxicidad en humanos por causa profesional y exposición accidental. Por lo que en base a los peligros toxicológicos de las acrilamidas, la Organización Mundial de la Salud (WHO/OMS) establece como referencia (la concentración que representa un riesgo tolerable para la salud del consumidor) para concentración de acrilamidas en agua potable de 0.50 µg/L (µg/kg). Debido a que las acrilamidas también son utilizadas en la industria de papel y construcción, la Unión Europea establece un como límite 10 µg/kg, para la migración de acrilamidas de materiales de empaque plásticos hacia los alimentos. Sin embargo, varios estudios (Aureli *et al.*, 2007) tratan sobre altos niveles de acrilamidas detectados en sangre humana debido a exposición accidental, como ejemplo, humo de cigarrillos y consumo de alimentos ricos en almidón horneados o fritos.

En 1994, la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC por sus siglas en inglés), clasificó a las acrilamidas como probablemente carcinogénicas para humanos, basados en efectos carcinogénicos en roedores (Konings *et al.*, 2010).

Las acrilamidas están presentes en alimentos a niveles considerablemente mayores que otros carcinogénicos conocidos también presentes en alimentos, como hidrocarburos aromáticos policíclicos⁴ y carbamato de etilo⁵ (Konings *et al.*, 2010).

En el 2002, investigadores científicos de Suecia (SNFA) presentaron un informe sobre la presencia de acrilamidas en una gran gama de alimentos, tales como papas fritas y chips de papa (Konings *et al.*, 2010).

⁴ Presente en ahumados, asados, aceites, margarinas, mayonesas, té, café cereales, mariscos y pescados (Valle y Florentino, 2002) .

⁵ Se encuentra en muchos alimentos fermentados, como derivados lácteos, cerveza, vino y pan. Causa tumefacción en roedores (Valle y Florentino, 2002) .

La comunidad científica mundial fue sorprendida por la toxicidad generada en alimentos, por lo que en el 2002 la FAO/WHO y la Unión Europea hicieron un llamado a nivel internacional e iniciar investigaciones respecto a la presencia de acrilamidas en alimentos y bebidas. Por lo que surgieron estudios biológicos realizados en distintos como ratas y cerdos; este último debido a la similitud de su fisiología cardiovascular y digestiva con la de los seres humanos (Aureli *et al.*, 2007).

El estimar a fondo el riesgo para la salud o seguridad de una ingesta de acrilamidas es de interés mundial, ya que la presencia de acrilamidas en alimentos cocinados es inevitable. Se ha demostrado que los humanos hemos estado altamente expuestos a las acrilamidas ocupacional y ambientalmente. Las acrilamidas, son componentes con consecuencias neurotóxicas para humanos y tumefacción carcinogénica en ratas crónicamente expuestas. Se producen en los alimentos cocinados ricos en almidón (Tardiff *et al.*, 2010).

B. Estudios realizados

Un estudio realizado en cerdos (2007), tratados con altas dosis (8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día) de acrilamidas durante 96 días demuestra que después de 45 días los niveles del AA-valina se reduce en un 75%; sin embargo los cerdos expuestos a bajas dosis (0.8 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día) de acrilamidas durante el mismo tiempo mantienen los niveles de AA-valina. Posiblemente debido a que los niveles de saturación en los glóbulos rojos de AA-valina son menores y no llegan a una reacción de eliminación (Aureli *et al.*, 2007).

Otro estudio sobre toxicología en Estados Unidos determina por medio de un modelo basado en la fisiología toxicocinética para comparar la dosis de acrilamidas y su metabolito glicidamidas (GA) en humanos y ratas, ingesta diaria tolerable (TDI siglas en inglés) para efectos neurotóxicos de AA se estima 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día. Para efectos cancerígenos se estimó de 2.6 y 16 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso-día, basado en acrilamidas y glicidamidas respectivamente. El margen de exposición (MoE) para efectos neurotóxicos se determinó un promedio de acrilamidas en consumidores de 300 y 500 basado en acrilamidas y glicidamidas respectivamente. El margen de exposición (MoE) para efectos cancerígenos se determinó un promedio de acrilamidas en consumidores de 200 y 1200 basado en acrilamidas y glicidamidas respectivamente (Tardiff *et al.*, 2010).

Es decir que para un ser humano de 70 kg de peso su ingesta tolerable diaria es de 182 μg para niveles carcinogénicos. Para los niveles neurotóxicos, la ingesta tolerable diaria debe ser mayor a 2,800 μg diarios (Tardiff *et al.*, 2010).

Las glicidamida (GA) son consideradas la principal causa de la actividad carcinogénica de

las acrilamidas. En estudio en ratas concluye que la actividad mutagénica de las acrilamidas se basan en la habilidad de la glicidamida de formar aductos (combinaciones) con ADN molecular y hemoglobina. Sin embargo, esto depende de la especie, sexo, dosis de acrilamidas, vías de administración de las mismas, polimorfismos genéticos independientemente de cada individuo y otros factores son los que influyen la capacidad de conversión de acrilamidas a su glicidamida en su forma epóxica. Sin embargo, la diversidad de estudios no presentan resultados que puedan correlacionar sus conclusiones (Aureli *et al.*, 2007).

En estudio epidemiológico de cohorte iniciado en 1986, realizado sobre Dieta y Cáncer en los Países Bajos, 2007, asocia la ingesta diaria de acrilamidas y cáncer en humanos (Konings *et al.*, 2010).

Los casos analizados al finalizar el estudio después de 11.3 años (Janneke, *et al.*, 2007) que la ingesta diaria de acrilamidas puede aumentar el riesgo de cáncer en humanos. Ya que se encontraron casos que relacionaban positivamente el cáncer en el endometrio y en ovarios en un grupo de mujeres no-fumadoras. El hábito de fumar puede inducir a la formación de hidrolasa epóxica, lo cual intensifica el metabolismo de glicidamidas, dejando las glicidamidas menos disponibles dañando el ADN del fumador (Janneke, *et al.*, 2007).

Algunos casos no demostraron una relación directa sobre cáncer y la ingesta de acrilamidas con cáncer de mama post-menopáusico (Janneke, *et al.*, 2007). Sin embargo, otros estudios (Johnson *et al.*, 1986) en roedores sí demuestran una relación directa.

En Dinamarca, fue positiva la asociación entre la ingesta de acrilamidas y los receptores de estrógeno con el riesgo de cáncer de mama. La relación es positiva para individuos con riesgo de cáncer en riñón e ingesta de acrilamidas, especialmente para fumadores. No se encontró relación con el cáncer en vejiga y en próstata. Otros resultados presentaron que existe relación con cáncer de pulmón en mujeres, pero no en hombres (Konings *et al.*, 2010).

No se encontró relación entre ingesta de acrilamidas y cáncer Colorectal, cáncer de mama (premenopausia), gástrico, pancreático, en el esófago, riesgo cerebral, en cuello y en tiroides, endometrio, en ovarios (Konings *et al.*, 2010).

Otros investigadores han publicado varias consecuencias en animales, tales como daños al sistema nervioso, incrementa la producción de radicales reactivos de oxígeno por leucocitos, incrementa en el plasma la proteína C-reactiva, tiene efectos tóxicos en la reproducción masculina, reduce niveles de dopamina, es genotóxica y carcinogénica. Además, varios estudios han demostrado que la ingesta de acrilamidas no se asocia con ciertos tipos de cáncer. Niveles seguros de ingesta diaria sobre acrilamidas se han considerado como tolerables, tales son la

ingesta de 40 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{día}$ con un margen de exposición de 300 $\mu\text{g}/\text{kg}$ en humanos (Boroushaki *et al.*, 2010).

Cuadro 5. Ingesta diaria de acrilamidas relacionada con distintos tipos de cáncer en humanos.

Relación negativa	Relación positiva
<p>Los casos estudiados han demostrado que no hay relación entre la ingesta diaria de acrilamidas y cáncer en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Vejiga • Próstata • Colorectal • De mama (premenopausia) • Gástrico • Pancreático • En el esófago • Riesgo cerebral • En cuello y en tiroides • Endometrio • Ovarios 	<p>Ciertos casos demostraron la asociación entre la ingesta diaria de acrilamidas y cáncer en:</p> <ul style="list-style-type: none"> • Receptores de estrógeno y riesgo de cáncer de mama • Cáncer de ovarios, pero no tiene relación con el riesgo de cáncer de mama en etapa postmenopáusica. • Cáncer en riñón, especialmente para fumadores • Cáncer de pulmón en mujeres, pero no en hombres
<p>(Konings, <i>et al.</i>, 2010)</p>	

C. Niveles de Acrilamidas en Alimentos

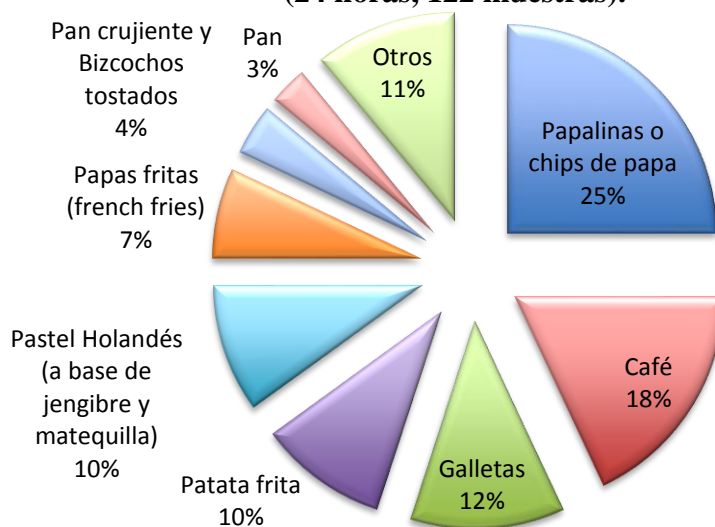
Los niveles de acrilamidas varían enormemente no solo entre alimentos, sino dentro de los mismos. Por ejemplo, en el 2006 se encontró que los niveles de acrilamidas en papas fritas pueden variar de un rango de 60 a 1,220 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y en papalinas o chips de papa de 310 a 2,800 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (Konings *et al.*, 2010).

En el estudio realizado en los Países Bajos (2002), el Laboratorio Autorizado para la Seguridad de Alimentos de del Consumidor analizó 122 productos alimenticios consumidos en una dieta de 24 horas, en dicho país. La ingesta promedio de acrilamidas, de 39 dietas, fue de 0.80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ peso. Los alimentos que aportaron la mayor cantidad de acrilamidas se encuentran en la figura 2 (Konings *et al.*, 2010).

Ciertos alimentos analizados, con el método de cromatografía líquida (LC-MS/MS), llamaron la atención en el estudio. Entre estos están las papas fritas (French fries) con 3,438 $\mu\text{g}/\text{kg}$, las aceitunas negras con 302 $\mu\text{g}/\text{kg}$ conteniendo mucho más que las aceitunas verdes (< 8 $\mu\text{g}/\text{kg}$). No es posible generalizar el consumo de acrilamidas y su contenido en alimentos, ya que este estudio se basó en el mercado holandés. Estos productos no solo dependen de su origen sino que varía su lote de producción, temporada climática, marcas y preparación casera (Konings *et al.*, 2010).

Los alimentos estudiados exceden tanto los límites establecidos por la Organización Mundial de Salud (FAO/WHO) para agua potable y los límites establecidos por la Unión Europea para la migración a través de materiales plásticos (Claeys *et al.*, 2005).

Figura 2. Aporte por categorías de alimentos, más importantes en una dieta expuesta a acrilamidas (24 horas, 122 muestras).



(Konings *et al.*, 2010)

Es imposible detener el desarrollo de acrilamidas o removerlas de los alimentos una vez hayan sido producidas, por lo que se han incrementado estudios para reducir los niveles de acrilamidas en alimentos (Borouhaki *et al.*, 2010).

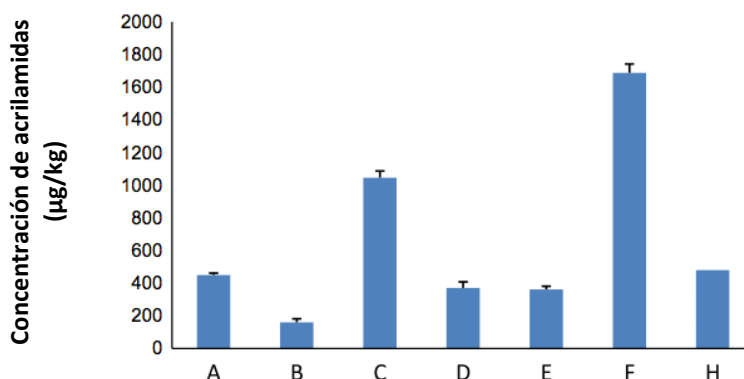
Un estudio realizado en papas de origen Iraní, demuestra que aperitivos de maíz contienen niveles significativamente bajos de acrilamidas al compararlos con los niveles encontrados en productos de papa. El mínimo determinado en producto de maíz fue 30 $\mu\text{g}/\text{kg}$, mientras para papa fue de 224 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Los máximos encontrados fueron de 410 $\mu\text{g}/\text{kg}$ y 1,688 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para productos de maíz y de papa respectivamente (Borouhaki *et al.*, 2010).

En la Figura 3, la muestra B contiene 244 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de acrilamidas, mientras la muestra F 1,688 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las diferencias respecto a la formación de acrilamidas se debe al tiempo de cocción, medio de cocción y temperatura de cocción. Por lo que los palitos de papa llegan a tener una mayor temperatura durante su proceso (muestra C) (Borouhaki *et al.*, 2010).

En la Figura 4 los productos M y N, poporopos, demostraron que tenían un mayor contenido de acrilamidas debido a su método de producción. Estos llevan un proceso de 200-

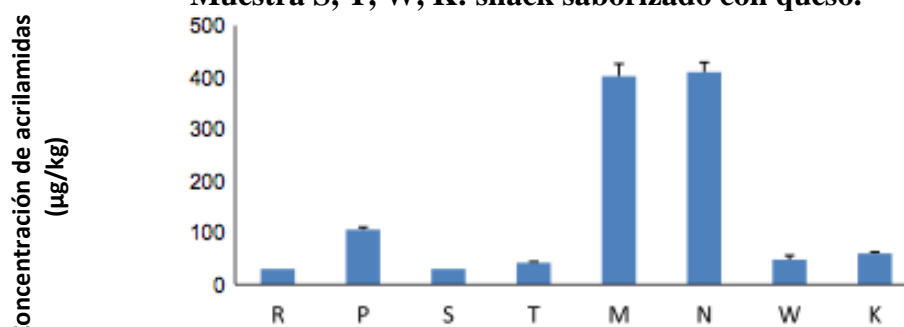
220°C por dos minutos, mientras las muestras S, T, W y K fueron procesadas a temperaturas entre 80-120°C en menos de un segundo. Las muestras R y P son productos extruidos que luego

Figura 3: Concentración de acrilamidas en diferentes productos de papa.
Muestra A, B, C y D hojuelas de papa sin sabor. Muestra E: palitos de papa. Muestra F: pellet de papa sin sabor. Muestra H: hojuelas de papa con sal.



(Boroushaki *et al.*, 2010)

Figura 4: Concentración de acrilamidas en diferentes productos de maíz.
Muestra M, N: Poporopos. Muestra P, R: snack de maíz frito y saborizados.
Muestra S, T, W, K: snack saborizado con queso.



(Boroushaki *et al.*, 2010)

pasaron por un proceso de fritura a temperaturas entre 160-165°C por 4:15 minutos (Boroushaki *et al.*, 2010).

Algunos estudios se han realizado a nivel mundial en distintos alimentos. En Austria, la concentración más alta de acrilamidas encontrada ha sido en papalinas con 1,500 µg/kg, galletas con 99 µg/kg, pan con 69 µg/kg, arroz y poporopos con 97 µg/kg y café con 169 µg/kg. Algunos alimentos ricos en carbohidratos, disponibles en el Mercado de Brasil, contenían entre 20 y 2,528 µg/kg. En Polonia, los niveles de acrilamidas encontrados en papalinas fueron de 352 a 3,647 µg/kg, los cuales dependían del tipo de papalina. En Japón, la mayoría de papalinas y aperitivos fritos a base de papa contenían concentraciones mayores a 1,000 µg/kg. En Irán, la

concentración mas alta fue de 1,688 $\mu\text{g}/\text{kg}$ menor a los niveles encontrados en Brasil y Polonia, pero mayores a los encontrados en Austria y Japón (Boroushaki *et al.*, 2010).

1. **Metodología para la determinación de acrilamidas.** El método utilizado para los estudios realizados en los Países Bajos es el establecido por Rosé n and Hellena's (2002), método estandarizado por el Comité Nórdico de Análisis en Alimentos (NMKL) (KONINGS *et al.*, 2010).





El método implementado por los investigadores Suizos en este estudio, consiste en la adición de una acrilamida marcada con deuterio o carbono como patrón interno (Ahn *et al.*, 2002). Luego de agregarla a la matriz, homogenizada y extraída en agua, se centrifuga el extracto, y la alícuotas sobrenadante es sujeta a una extracción en fase sólida. Luego se somete a un análisis de cromatografía líquida y espectrometría de masas (LC-MS-MS) donde el limite de cuantificación es de 0.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para muestras líquidas y 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ para otras muestras (Konings *et al.*, 2010).

La cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS) es una metodología también establecida para la detección de acrilamidas en agua, alimentos y materiales de empaque. Consiste en la bromación de una muestra de agua o un extracto líquido del alimento o material de empaque con 2,3-dibromopropionamida como marcador. Meta-acrilamida es utilizada como estándar interno. Este método ha sido utilizado por investigadores, para demostrar que los monómeros de acrilamidas no se bioacumulan en hongos desarrollados en suelos que contienen residuos de monómeros, o en tomates desarrollados en geles de poliacrilamidas. Recientemente, es un método utilizado en la demostración de cosechas de frijol, maíz, papas y remolacha desarrolladas en suelos tratados con poliacrilamidas que se determinaron libres de residuos de acrilamidas (Ahn *et al.*, 2002) .

El contenido de acrilamidas puede correlacionarse con la coloración café o emparedamiento del alimento pero es independiente de las características inherentes del mismo alimento. Esto se hizo relevante en un estudio realizado en pan tostado, donde se determinó la concentración de acrilamidas a lo largo de distintos tiempos de tostado (Figura 5) y se determinó la coloración del pan para cada intervalo de tiempo (Figura 6) (Ahn *et al.*, 2002).

El oscurecimiento en alimentos no es el único factor involucrado, ya que el tipo de cocción es un factor importante. Ya que el cocinar papas a la parrilla produce mayores niveles de acrilamidas que su fritura u horneado (Cuadro 6). Cuando las papas en hojuela se sobre-cocinaron, a un nivel aún comestible, el nivel de acrilamidas aumentó aun más. No se detectó acrilamidas en papas frescas o hervidas, tal como indicaron los estudios de SNFA en el 2002 (Ahn *et al.*, 2002).

Cuadro 6. Determinación de acrilamidas en alimentos, cocinados en laboratorio con prácticas caseras, con distintas metodologías.

Muestra ⁶	Concentración de acrilamidas (µg/kg)			
	GC-MS	LC- MS/MS	SNFA ⁷	
	Papas para hornear			
	Frescas	< 10	< 50	< 30
	Hervidas	< 10	< 50	< 30
	Rodajas, fritas	310	350	300-1100
	Papas tipo King Edward			
	Frescas	< 10	< 50	< 30
	Hervidas	< 10	< 50	< 30
	Rodajas, fritas	2800	3500	300-1100
	Papas cortadas en cuartos de papa			
	Horneadas	230	260	na
	Fritura, superficial en aceite	530	520	na
	Fritura, sumergida en aceite	420	330	na
	A la parrilla	1510	1530	na
	Hojuelas de papa fritas			
	Cocinada por 12 min. ⁸	3500	3500	300-1100
	Sobre-cocinada por 17 min. ⁹	12800	12000	na

(Ahn *et al.*, 2002)

D. Opinión y recomendaciones establecidas por entidades internacionales. La

Administración de Drogas y Alimentos (Food and Drug Administration, FDA) de los Estados Unidos y otras entidades regulatorias a nivel mundial no han determinado un nivel aceptable de acrilamidas en alimentos, únicamente han emitido recomendaciones y cuidados respecto al consumo moderado de alimentos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS/WHO) junto con la Organización de Alimentos y Agricultura (FAO) convocaron, en junio del 2002, la consulta de expertos en acrilamidas. Los cuales participaron junto con la FDA y concluyeron que la presencia de acrilamidas es un factor de mayor preocupación y recomendaron varios mecanismos de formación y toxicidad de las mismas en los alimentos.

⁶ Basados en la descripción del producto indicada en el material de empaque. Solamente se declaró la variedad de papa para el caso de King Edward, pero estos resultados no tienen relación con otras variedades de papa.

⁷ Datos de la investigación realizada por SNFA (Swedish National Food Administration) en el 2002.

⁸ Fritura según indicaciones del fabricante

⁹ Sobre-cocinada, pero aún comestible. Resultados obtenidos por extrapolación de la curva estándar y confirmados por la dilución del extracto de la muestra.

Figura 5. Concentración de acrilamidas en pan tostado, en función del tiempo de tostado. (Límite de detección 25 µg/kg)

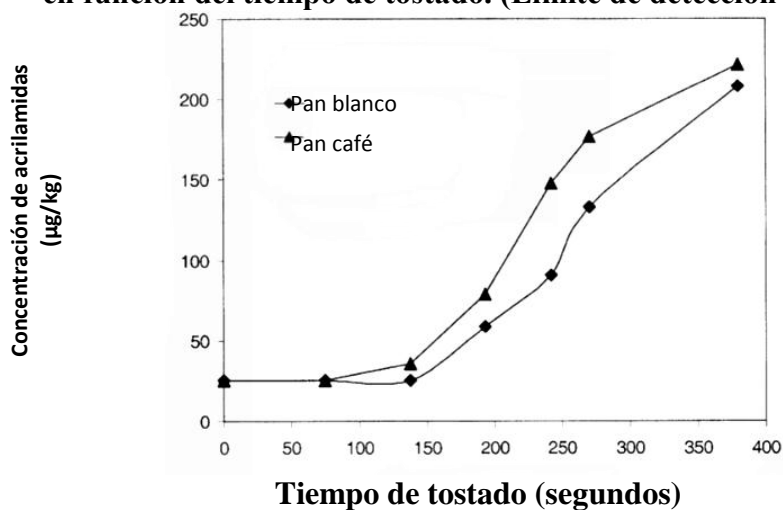
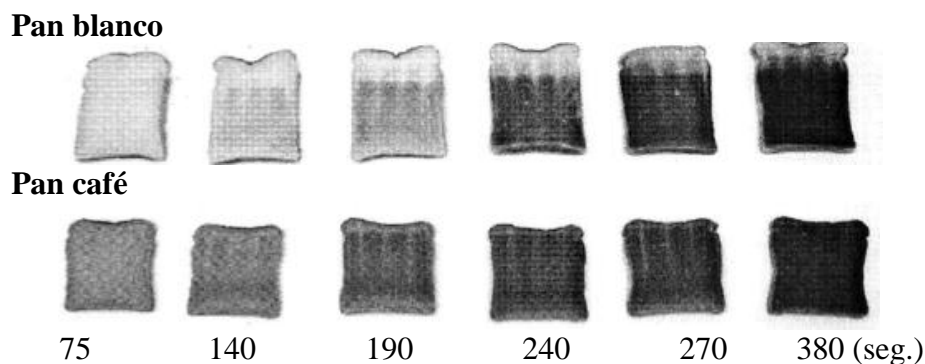


Figura 6. Grado de oscurecimiento asociado con el tiempo de tostado en pan blanco y pan café.



(Ahn *et al.*, 2002)

Los tres organismos internacionales recomendaron al mundo, ingerir con una dieta balanceada, rica en frutas y vegetales. También se recomendó que los alimentos no deban de cocinarse en exceso, por ejemplo, no por mucho tiempo o no a temperaturas muy altas. Aunque también se recomendó, principalmente en carnes y sus derivados, cocinarlas bien para destruir todos los microorganismos patógenos posiblemente presentes (bacterias, virus, etc.).

1. Retos para la comunidad actual:

- Desarrollar un método de determinación de acrilamidas rápido o de bajo costo, validado.
- Identificar los mecanismos responsables de la formación de acrilamidas en alimentos e identificar formas de reducir su exposición.
- Asesorar al consumidor respecto a la ingesta diaria de acrilamidas.

- Caracterizar el riesgo potencial y discrepancias asociadas con la exposición a las acrilamidas en alimentos, respecto a su toxicología en bases cuantitativas.
- Establecer una asociación pública/privada para desarrollar el conocimiento científico y tecnológico para determinar el riesgo en humanos.
- Informar y educar al consumidor e industria respecto a los riesgos asociados con las acrilamidas. (Posnick, 2007)

2. Recomendaciones para la industria y el consumidor:

- Freír y hornear productos de papa cortados, debe proporcionar una coloración amarilla-oro, no café.
- Seleccionar adecuadamente la material prima, en base a sus azúcares reductores.
- Para el almacenamiento a largo plazo de papas, destinadas para corte y fritura u horneado, evitar temperaturas debajo de 8°C.
- Para la fritura convencional de productos de papa cortados, la temperatura no debe exceder de 175°C.
- Para el horneado de productos de papa cortados, las temperaturas no deben ser mayores a 200°C y para hornos convencionales no debe ser mayor a 190°C (ventilación por convección).
- Evitar el uso de glucosa/dextrosa y otros azúcares o recubrimientos en productos que serán fritos u horneados.
- Los productos de papa parcialmente cocinados, deben estar etiquetados con sus instrucciones o uso previsto para cocinar hasta dar un tono amarillo-oro, no café. Se debe especificar temperatura y tiempo precisos para evitar la formación de coloraciones cafés.
- Evitar la coloración café en exceso, para productos derivados de cereales.
- En productos de panadería utilizar agentes leudantes que no sea bicarbonato de amonio, siempre que sea permitido y posible, utilizar el carbonato de sodio. (E.C., 2003)

IV. Justificación

El consumo de frituras como aperitivos en Guatemala se generaliza en todos los niveles socioeconómicos, todas las edades y sobre todo, su consumo es a nivel mundial. En Guatemala estos productos se venden con mayor frecuencia en la época escolar.

La última encuesta realizada por la Organización Mundial de la Salud en el 2009, se realizó con la participación de 5,592 alumnos y alumnas de primero, segundo y tercer curso, en establecimientos públicos y privados de la capital de Guatemala. Se determinó en un período de 30 días el 32.1% come al menos una vez al día productos tipo papalinas y otros productos similares. El 29.4% lo hacía una vez al día, 13.2% dos veces al día, 6.5% tres veces al día, 2.2% cuatro veces al día y el 3.8% cinco o más veces. Siendo su mayoría jóvenes entre 13 a 16 años (95.2% de los encuestados).

La población de niños y jóvenes entre 13 y 16 años, que representa el 30% de la población en Guatemala. Su constitución física (bajo peso y tamaño) y el consumo de alimentos que contienen acrilamidas.

Por lo que es importante reducir los niveles de exposición a las acrilamidas para los consumidores, sobre todo niños, quienes son más susceptibles a las concentraciones de acrilamidas que contienen los alimentos ricos en carbohidratos o proteínas, como lo son productos de panadería, comida rápida, cereales y sobre todo snacks.

El laboratorio de análisis Eurofins, en Estados Unidos, cuentan con el análisis para cuantificar acrilamidas en Cromatografía Líquida (LC-MSMS) recomendado por FDA, su límite de detección son 30.0 µg/kg. Sin embargo, en Guatemala no existe por ahora algún laboratorio que cuente con esta metodología. Tampoco existe una norma que delimite su contenido o exija su declaración en la etiqueta. Por lo que se debe procurar las condiciones para reducir estas concentraciones, evaluar la declaración de las mismas y educar al consumidor acerca de ellas.

Las acrilamidas se pueden controlar. Es por eso que la industria de alimentos en Guatemala, responsable de la producción de frituras y otros productos que generan acrilamidas, pueda controlar sus procesos para hacer su consumo más seguro para la población.

V. Objetivos

A. Generales

- Determinar las condiciones de proceso de producción de frituras de yuca y maíz, en los que se regule la formación de acrilamidas.

B. Específicos

- Establecer la metodología de análisis por cromatografía de gases para cuantificar el contenido de acrilamidas en muestras de frituras o aperitivos.
- Caracterizar la materia prima utilizada en producción respecto a la concentración de precursores de acrilamidas.
- Recomendar un proceso térmico como alternativa para el procesamiento de dichas frituras.

VI. Metodología

Parte 1 Implementación de metodología para la determinación de acrilamidas

El objetivo del método fue determinar la concentración de acrilamidas en muestras de frituras y determinar la concentración de acrilamida en cada estándar elaborado con una concentración previamente preparada y conocida de acrilamida, de esta forma determinar la recuperación de la acrilamida por diferencia. La metodología consistió en la evaluación de distintas etapas:

- Preparación de muestras
- Preparación de estándar interno y estándar, curva de calibración
- Derivatización o Bromación de muestras y estándares
(Tareke, E., *Et al. J. Agric. Food Chem.* 2002, Vol. 50, 4998 – 5006)
- Extracción de acrilamidas bromadas
- Cromatografía CG-MS
(Jung y Choi, *JFS: Food Chemistry and Toxicology.* Vol 68. No. 4 2003)

En el Anexo 1 se encuentra paso a paso la metodología establecida. Para la implementación eficiente del método de análisis de acrilamidas fue importante determinar tres aspectos críticos e importantes: preparación de la muestra, el análisis de cromatografía CG-MS y la estandarización del método.

Parte 2 Caracterización de la materia prima para sugerir las condiciones del procesamiento.

Se llevó a cabo análisis proximal, que incluyó determinación de:

- Humedad ((AOAC M. 14.003 13^a 1980))
- Proteína (por determinación de NH₄⁺ (AOAC 2.057 13^a. 1980)
- Grasa (por extracción con éter, AACC 30-26 8^a. ed 1983)
- Cenizas (AACC 08-01 y 08-16 8^a. ed 1983)
- Carbohidratos por diferencia.

Además de llevó a cabo el análisis de:

- Actividad de agua (Aqualab, Decagón Devices. Se realizó una calibración del equipo con estándares de Aw de 0.25 y Aw de 0.5. Los resultados son un promedio de dos determinaciones. La temperatura en que se llevaron a cabo las determinaciones fue de 21.3°C.
- Determinación de pH (AOAC 33.006-33.007 14^a. Ed. 1984, utilizando material de referencia con pH 4.0, 7.0 y 10.0)
- Determinación de azúcares por el método de membranas:
- Determinación de Sacarosa: Determinador de azúcar YSI 2700

Se analizó en laboratorio externo el contenido de acrilamidas, utilizando el método de:

- Realizado por: Eurofins Scientific Inc. Nutrition Analysis Center. Método interno:

Extracción, Carrez-precipitación, LC-MS/MS, con límite de cuantificación de 30.0 µg/kg. Aplicado a alimentos (que no contengan más del 30% de azúcar, tal como cocoa, azúcar, melaza, malta).

VII. Resultados y discusión de resultados

El trabajo consistió en dos partes, en la primera parte se implementó la metodología de análisis para cuantificar acrilamidas, a manera de optimizar las condiciones que el método requirió para su medición por medio de cromatografía de gases (CG-MS).

En la segunda parte, se hizo una revisión de los parámetros inherentes de las materias primas utilizadas en frituras de yuca y de maíz para estudiar la formación de acrilamidas.

A. Primera Parte

Se seleccionó la cromatografía de gases y espectrometría de masas como análisis para la cuantificación de acrilamidas debido a que en la literatura de referencia indicaba haber encontrado un nivel de detección de 5 $\mu\text{g}/\text{kg}$. En cambio la cromatografía líquida un nivel mínimo de 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Las pruebas realizadas se encuentran descritas en el Cuadro 7.

Para establecer una correcta preparación de muestras se realizaron distintas pruebas debido a que se detectaron algunos factores que no permitían la obtención de los resultados esperados sobre la metodología. Por los resultados de la Prueba I y II, se modificó el filtro de papel por el filtro de fibra de vidrio. Ya que por la solubilidad de la acrilamida en agua se determinó que era posible pérdida de las moléculas bromadas. La retención de esta molécula en el papel filtro se afecta su recuperación.

Respecto a la preparación del estándar interno y el estándar se prepararon según las indicaciones del método de referencia (ver Anexo 1) y se utilizaron distintas curvas de concentración para evaluar su respuesta en la columna del cromatógrafo. Sin embargo, no se obtuvieron los resultados esperados que permitieran determinar una precisión y exactitud del método, ya que no hubo relación entre los resultados y las concentraciones preparadas (ver cuadro 8). Tampoco se observó repetitibilidad en los resultados debido a que en el Estándar de 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ de acrilamida se observa una diferencia de 9 $\mu\text{g}/\text{L}$. Únicamente para el estándar de 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ el resultado es similar entre duplicados pero no es posible determinar una desviación estándar.

Respecto a la bromación o derivatización de la molécula de acrilamida y del estándar interno podemos determinar en la prueba III se logró realizar la reacción completa ya que no se encontró el estándar interno sin bromar. Sin embargo no fue posible identificar en los estándares, el estándar de acrilamida bromado, únicamente se identificó el estándar interno bromado. Por lo que podemos establecer que para la columna HP-5MS las concentraciones de 10-50 $\mu\text{g}/\text{L}$ de los estándares de acrilamida no son detectadas o la acrilamida al estar en un medio ácido y acuoso pueda formar otras moléculas por ser una molécula muy reactiva.

Cuadro 7 Pruebas realizadas durante la evaluación de la metodología de análisis

Prueba	Concentraciones y muestras analizadas	Equipo crítico para la extracción de acrilamida bromada	Puntos de mejora
Prueba I	Análisis de estándar interno a distintas concentraciones 25, 50 y 100 µg/L y análisis de muestras de frituras de yuca y de maíz.	En la etapa posterior a la extracción se utilizó baño maría para la evaporación del acetato de etilo, el cual se mantuvo a 60°C durante 12-16 horas.	No se identificó el estándar interno en la CG-MS por falta de estándar.
Prueba II	Análisis de estándares de Acrilamida (0, 25, 50, 150, 350 y 500 µg/L) y muestras de frituras de yuca y de maíz.		Sulfato de sodio anhidro se agregó previo a su extracción. Utilización de filtros con fibra de vidrio en vez de filtros de papel.
Prueba III	Análisis de estándares de Acrilamida (10, 20, 30, 40, y 50 µg/L). ¹⁰	En la etapa posterior a la extracción se utilizó rotavapor al vacío.	No se identificó acrilamida bromada en CG-MS.
Prueba IV	Análisis de estándar interno, estándar y mezcla preparados a altas concentraciones.		Rotavapor del laboratorio no es el adecuado.

En todas las pruebas se utilizó acetato de etilo como solvente único ya que el método de referencia de *Jung y Choi (2003)*, mencionaba que la mezcla de hexano y acetato de etilo proporcionaba en resultados muchas interferencias en los cromatogramas.

Respecto a la extracción de las acrilamidas la etapa importante es la evaporación para poder eliminar el acetato de etilo y obtener una muestra para la lectura en el análisis de cromatografía.

En la evaluación del desempeño de la prueba II se determinó que el baño maría utilizado para la evaporación del acetato de etilo era posible que provocara cierta pérdida, de la acrilamida bromada, al ambiente. Por lo que en la prueba III y IV se utilizó el rotavapor al vacío, para evitar dicha pérdida y realizar la evaporación de acetato de etilo tal y como lo indica el método de referencia.

Es importante en la etapa de evaporación mantener la temperatura de 65°C como máximo y detener la evaporación justo antes de llegar a sequedad. Ya que al eliminar

¹⁰ Método de referencia indicaba una curva de calibración entre 0.5 a 50 µg/L en agua, que corresponden a 5 – 500 µg/Kg de alimento. Método de referencia para la preparación de muestras y curva de calibración: Tareke, E., Et al. J. Agric. Food Chem. 2002, Vol. 50, 4998 - 5006.

Método de referencia para la cromatografía: JFS: Food Chemistry and Toxicology. Vol 68. No. 4 2003.

todo el acetato de etilo se sobrecalientan las moléculas bromadas y pueden generarse mayor cantidad de subproductos. La temperatura debe mantenerse ya que al no controlar la temperatura puede perderse en el ambiente las moléculas de interés. El punto de ebullición del acetato de etilo es 77°C , y para lograr su evaporación sin alterar los resultados era preciso mantenerse alejado de este punto. Además, se desconoce la temperatura de evaporación de las moléculas bromadas (ver Cuadros 15 la 18, Anexo 1).

Un factor que influye en la recuperación de las moléculas bromadas, es la utilización de los matraces adecuados para la reconstitución de las mismas en acetato de etilo (ver Anexo 1). En la Prueba I, para la evaporación, se utilizaron como matraces erlenmeyers de 50 mL los cuales fueron sustituidos en la Prueba III y IV por balones redondos de 250 mL debido a la utilización del rotavapor al vacío tal como lo indicaba el método de referencia. Sin embargo, al reconstituir con 200 μL de acetato de etilo no era posible abarcar todo el matraz internamente debido a su mayor tamaño. Por lo que se recomienda utilizar el método de evaporación en baño maría ya que los erlenmeyers utilizados son más prácticos para la reconstitución de los estándares y muestras o utilizar un kit micro escala.

El funcionamiento del rotavapor solo permitía la evaporación del acetato de etilo en 4 horas por muestra, lo cual limita la eficiencia del método ya que la evaporación no se mantuvo constante entre las muestras. Este equipo presentó fallas técnicas debido a la baja potencia de la bomba de vacío, y no se logró recuperar el acetato de etilo en el balón de recuperación. Además, en el cromatograma no se obtuvo una recuperación de la acrilamida bromada 2,3-Dibromo-propionamida.

Por lo que no es posible determinar si el rotavapor utilizado no es el equipo idóneo para este proceso. Por lo que no fue posible estandarizar el método ya que no se obtuvo una respuesta al trabajar los estándares. Por lo que se procedió con la Prueba IV.

En la prueba IV de altas concentraciones, el estándar de Acrilamida y la mezcla correspondiente, tenían concentración de Acrilamida de 9.6×10^6 veces más concentrada. El estándar interno solo y en su mezcla se preparó a una concentración 1.0×10^5 veces más concentrados.

Durante esta prueba, el estándar interno (N,N-Dimetil-2-Propenamida), el estándar de acrilamida y su mezcla requirieron mayor cantidad de agua de bromo, 70, 40 y 100 mL respectivamente, a la indicada en el método establecido anteriormente. Sin embargo, no se había confirmado la identificación de las moléculas bromadas de interés hasta que se realizó la prueba IV.

Respecto a la cromatografía no fue posible validar el método ya que las dificultades de las etapas anteriores dificultan obtener un método estandarizado, optimizado y validado.

El estándar, acrilamida sin bromar, no se identificó en ningún cromatograma. Por lo que esto demuestra que ambas moléculas (estándar interno y estándar) compiten por el

bromo en la reacción y éste selectivamente reacciona de preferencia con el estándar, acrilamida.

Se puede observar en el Cuadro 8, la identificación de los tiempos de retención en cada estándar evaluado. En la prueba III es posible identificar una concentración similar de las moléculas extraídas disueltas en acetato de etilo, pero sin relación en la cantidad recuperada del estándar interno bromado. En ninguna de las curvas de estándares preparadas se logró identificar el estándar, acrilamida, bromado. Únicamente se obtuvo una recuperación de esta molécula en la prueba IV, al realizar la evaluación de los estándares en altas concentraciones.

En la prueba III se utilizó 1 mL del estándar interno para todos los estándares de la curva (ver Cuadro 8). Y se identificó la molécula 2,3-dibromo,N,N-dimetilpropionamida (estándar interno bromado) en un tiempo de retención de 8.718 ± 0.030 min (Cuadro 8). Sin embargo no se muestra una linealidad, exactitud ni precisión en los resultados.

En la columna de GC-MS se identificó un tiempo de retención de 4.178 ± 0.053 min. para la molécula del estándar interno sin bromar, N,N-Dimetil-2-Propenamida (Cuadro 9). Se obtuvo un porcentaje de recuperación más alto para la prueba de estándares mezclados en alta concentración y para un estándar de la prueba I (ver Cuadros 8 y 10). La mayor concentración de esta molécula se encontró en la mezcla preparada en alta concentración, obteniendo como resultado un 3.4% del estándar interno sin haber reaccionado. Esto indica que esta muestra requería más agua de bromo en la etapa de bromación para aumentar el rendimiento del estándar interno bromado.

Se identificó en el cromatograma de la prueba IV, en altas concentraciones, la molécula bromada del estándar 2,3-dibromopropionamida en un tiempo de retención de 9.264 ± 0.472 min. Se obtuvo un 62.97% de estándar bromado: 2,3-dibromopropionamida, en la prueba de alta concentración, en cambio en la mezcla de estándares en altas concentraciones solamente se obtuvo 13.56% debido a que no era la única molécula con doble enlace que el bromo selecciona para reaccionar. Este resultado permitió validar que en ningún estándar de la prueba III fue recuperada esta molécula. Por lo que es posible que se requiera trabajar a una concentración mayor para este estándar o evaluar la recuperación adecuada en un matraz más pequeño, como erlenmeyers de 50 mL, para evitar la supuesta pérdida.

Cuadro 8 Resultados cromatograma en curvas de calibración.

Prueba	Muestra	Parámetro	Acetato de Etilo	N,N-Dimetil-2-Propenamida *	2,3-dibromo,N,N-dimetil-propionamida **	2,3-Dibromo-propionamida ***
I	Estándar Interno 25 µg/L	Tiempo de Retención (min)	-	-	8.675	No se utilizó estándar de acrilamida
		% Área	NP	NP	42.84	-
I	Estándar Interno 50 µg/L	Tiempo de Retención (min)	-	4.136	8.730	No se utilizó estándar de acrilamida
		% Área	NP	0.4	86.95	-
I	Estándar Interno 100 µg/L	Tiempo de Retención (min)	-	4.136	8.743	No se utilizó estándar de acrilamida
		% Área	NP	0.68	93.85	-
I	Muestras de alimentos (frituras de yuca y maíz)	Tiempo de Retención (min)	-	-	-	-
		% Área	NP	NP	NP	NP
III	Estándar 10 µg/L	Tiempo de Retención (min)	2.066	-	8.703	-
		% Área	89.69	NP	1.64	NP
III	Estándar 20 µg/L	Tiempo de Retención (min)	2.075	-	8.703	-
		% Área	86.97	NP	5.41	NP
III	Estándar 30 µg/L	Tiempo de Retención (min)	2.070	-	8.702	-
		% Área	89.64	NP	1.21	NP
III	Estándar 40 µg/L	Tiempo de Retención (min)	2.057	-	8.703	-
		% Área	83.83	NP	11.41	NP
III	Estándar 40 µg/L duplicado	Tiempo de Retención (min)	2.075	-	8.703	-
		% Área	92.98	NP	2.42	NP
III	Estándar 50 µg/L	Tiempo de Retención (min)	2.071	-	8.702	-
		% Área	98.28	NP	1.15	NP
III	Estándar 50 µg/L duplicado	Tiempo de Retención (min)	2.080	-	8.707	-
		% Área	82.67	NP	1.21	NP

NP: NP - No hay presencia

* N, * N-Dimetil-2-Propenamida o N,N-Dimetil-2-Acrilamida (Estándar Interno sin bromar)

** 2, *2,3-Dibromo,N,N-Dimetilpropionamida o 2,3-Dibromo,N,N-Dimetilacrilamida (Estándar interno bromado)

*** **2,3-Dibromopropionamida o 2,3-Dibromoacrilamida (Estándar bromado)

Cuadro 9 Tiempos de retención por cada molécula identificada en todas las pruebas.

Molécula identificada	Promedio tiempo retención (minutos)	Desviación estándar tiempo de retención (minutos)
Acetato de Etilo	2.033	0.060
N,N-dimetil-2-Propenamida *	4.178	0.053
2,3-dibromo,N,N-dimetilpropionamida **	8.718	0.030
2,3-Dibromopropionamida ***	9.264	0.472

* N,N-Dimetil-2-Propenamida o N,N-Dimetil-2-Acrilamida (Estándar Interno sin bromar)

** 2,3-Dibromo,N,N-Dimetilpropionamida o 2,3-Dibromo,N,N-Dimetilacrilamida (Estándar interno bromado)

*** 2,3-Dibromopropionamida o 2,3-Dibromoacrilamida (Estándar bromado)

Cuadro 10 Resultados cromatograma en muestras con alta concentración.

Prueba	Muestra	Parámetro	Acetato de Etilo	N,N-Dimetil-2-Propenamida *	2,3-dibromo,N,N-dimetilpropionamida **	2,3-Dibromopropionamida ***
I V	Estándar Interno Bromado concentrado	Tiempo de Retención (min)	1.939	4.195	8.775	-
		% Área	8.08	0.37	68.5	NP
I V	Estándar bromado concentrado	Tiempo de Retención (min)	1.957	-	-	8.93
		% Área	28.63	NP	NP	62.97
I V	Mezcla concentrada Estándar interno y Estándar	Tiempo de Retención (min)	1.943	4.245	8.771	9.598
		% Área	4.42	3.4	43	13.56

NP: No hay presencia

* N,N-Dimetil-2-Propenamida o N,N-Dimetil-2-Acrilamida (Estándar Interno sin bromar)

** 2,3-Dibromo,N,N-Dimetilpropionamida o 2,3-Dibromo,N,N-Dimetilacrilamida (Estándar interno bromado)

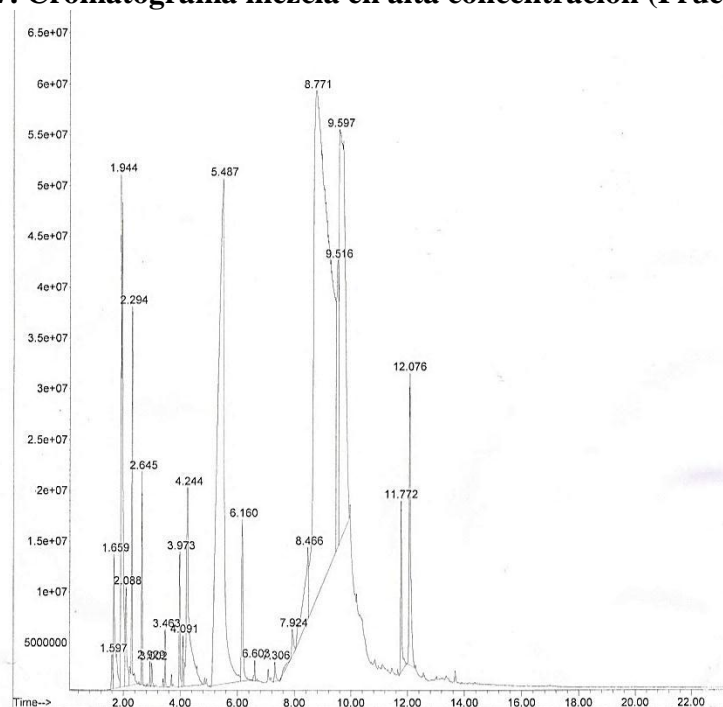
*** 2,3-Dibromopropionamida o 2,3-Dibromoacrilamida (Estándar bromado)

Se puede observar en el cromatograma de la mezcla, como ejemplo, la obtención de más de 15 subproductos en la reacción. Esto se debe a que los dobles enlaces de la acrilamida y del estándar interno, al estar expuestos a condiciones ácidas, en un medio acuoso, y a temperaturas de evaporación, tienden a reaccionar con el bromo, con el agua, y con otros compuestos que puedan reaccionar entre sí y formar subproductos alcanos, ésteres, y cíclicos o similares detectados en el cromatógrafo por su

peso molecular. Entre los subproductos encontrados están: Amonio, Bromuro de hidrógeno, Bromometano, N-propil acetato, Ester ácido acético 2-metilpropil, Ester butil de ócielos acético, Dibromoacetaldehído, p-xileno, 1,4-dibromo, entre otros. Debido a la cantidad de subproductos encontrados no es posible indicar que el método de cromatografía de gases no sea el adecuado, pero la reacción de bromación de las moléculas de acrilamida y del estándar interno no es la metodología adecuada para su determinación.

El objetivo principal era determinar si en muestras de frituras a base de yuca y maíz contenían acrilamidas, debido a que son alimentos ricos en proteínas que pasan por un proceso de altas temperaturas, lo cual en el método presente no pudo demostrar su contenido ni su ausencia. Es probable que en 10g de muestra de estos alimentos se encuentre una concentración mucho menor a $100\mu\text{g}/\text{kg}$. Estos alimentos no contienen los mismos aminoácidos que la papa, la cual es conocida por su alto contenido de acrilamidas. Sin embargo, se procedió con la segunda parte de este trabajo en donde sí es posible obtener un resultado acerca del contenido de acrilamidas realizando el análisis por un laboratorio externo.

Figura 7. Cromatograma mezcla en alta concentración (Prueba IV)



B. Segunda parte

Se midieron los parámetros importantes para caracterizar las materias primas y las frituras de yuca y de maíz, para determinar la susceptibilidad de ambas frituras ante la formación de acrilamidas.

Es importante conocer las características iniciales de la materia prima, ya que su variedad es importante pero aun así las características varían dependiendo de su suelo,

tratamientos realizados durante su siembra y sobre todo la época de cosecha. Sobre todo la cantidad de aminoácidos presentes varía según estos factores. La yuca tiene un bajo porcentaje de proteína, por lo que su contenido de aminoácidos es reducido. Se conoce en distintas variedades su cantidad de aminoácidos esenciales es deficiente, y el maíz solo carece de lisina y triptófano. Sin embargo no hay estudios del contenido de asparagina.

Por lo que es posible decir que no contiene la cantidad de asparagina suficiente para reaccionar con los azúcares reductores que durante el proceso de fritura se forman. Es importante utilizar yuca con una maduración cuyo contenido de azúcares reductores sea el mínimo, ya que se ha podido evaluar yucas muy dulces sensorialmente a causa de su maduración y es un factor importante evitar para reducir el contenido de acrilamidas.

A pesar del contenido de humedad, la yuca frita presenta menor contenido de grasa, debido a su estructura celular natural (ver Cuadro 16). El maíz tiene mayor contenido de amilosa y amilopectina (Cuadro 12) ya que mantienen su estructura celular durante todo su proceso, la estructura del almidón se mantiene. En cambio en la fritura de maíz, parte de una harina de maíz, donde todo su almidón se ha degradado por el proceso de molienda, lo que permite una mayor absorción del aceite en su estructura.

En el análisis proximal fue notable que la yuca como materia prima tiene mayor contenido de humedad (62.85%), por lo que esta materia prima lleva un proceso de fritura más severo debido que pierde alrededor del 60% de humedad, hasta contener 1.68%. La actividad de agua de las materias primas y su calentamiento permiten que la reacción de empareamiento no enzimático (reacción de Maillard) inicie con los valores de actividad de agua altos que contienen, cercanos a 0.60 (ver figura 8), por ende la formación de acrilamida. La yuca en el proceso de fritura pierde su actividad de agua de 0.99 a 0.13, por lo que durante pocos minutos (2:10 min) tiene las condiciones óptimas para la formación de acrilamidas. Por el contrario, el snack de maíz reduce su actividad de agua de 0.69 a 0.15 (ver cuadro 11 y 13). Pierde menor cantidad de agua. La fritura de maíz tiene menos tiempo (30 seg) debido a que su contenido de agua es menor.

Cuadro 11 Características de las materias primas

Parámetro	Yuca cruda	Harina de maíz
Variedad/Tipo	<i>Manihot utilissima</i> Roja	<i>Zea mays L.</i> U.S. Amarillo #1
Actividad de agua	0.99	0.69
pH (10g/100 mL agua)	4.59	5.96
Humedad (%)	62.85	13.63
Grasa (%)	0.27	0.32
Cenizas (%)	2.88	2.63
Proteína (%)	0.95	6.62
Carbohidratos (%)	33.04	76.83
Sacarosa (%)	1.0	1.9

Respecto al pH, es notable que las materias primas de yuca y maíz precocido tengan un pH leve inferior al pH óptimo para la formación de acrilamidas (pH 7-8) (ver

Cuadro 11). Por lo que el pH que contiene la yuca y la harina de maíz es ideal para prevenir su formación.

Cuadro 12 Características de los almidones¹¹

Parámetro	Yuca	Maíz	Papa
Tamaño del granulo	16.5 µm	15 µm	33 µm
Forma del granulo	Esférica truncada	Poligonal	Oval esférica
Almidón			
Amilosa	17%	28.3%	21%
Amilopectina	83%	71.7%	79%

Los snacks de maíz contienen niveles significativamente bajos de acrilamidas (< 100 µg/kg), al compararlos con los elaborados a partir de papa (> 1,000 µg/kg). El contenido de carbohidratos es importante para la reacción de Maillard, ya que mientras mas azúcares reductores tenga (glucosa, fructosa y sacarosa) más posibilidad hay que reaccionen con asparagina y formar la acrilamida.

Se analizaron ambas muestras en un laboratorio externo para validar el contenido de acrilamidas. El método consistía en una extracción, precipitación (método de Carrez) y luego su cuantificación por medio de cromatografía líquida (LC-MS/MS). Su límite de detección inferior es de 30.0 µg/kg. En ambas frituras se determinó su contenido de acrilamida era menor al límite de detección del método, menor a 30.0 µg/kg, por lo que el proceso actual de su elaboración y las características inherentes de sus materias primas no son factores que promuevan la formación de acrilamidas.

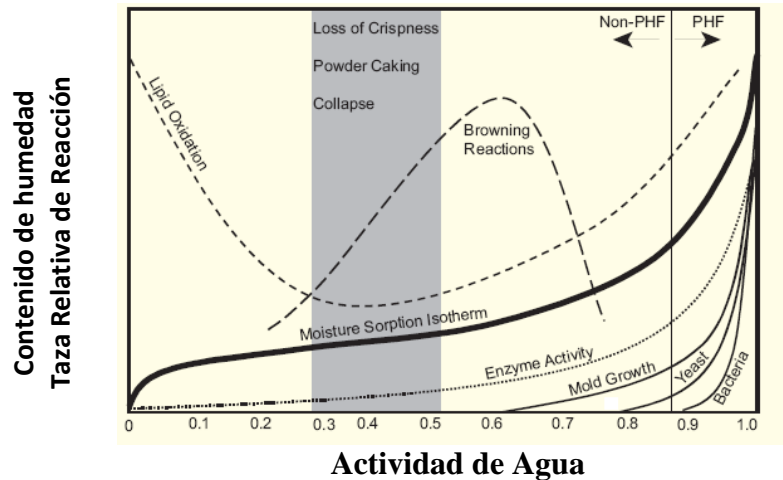
Cuadro 13 Características de las frituras de yuca y maíz

Parámetro	Fritura de yuca	Fritura de maíz
Actividad de agua	0.13	0.15
pH (10g/100 mL agua)	6.22	5.9
Humedad (%)	1.67	0.91
Grasa (%)	14.02	25.48
Cenizas (%)	5.19	2.56
Proteína (%)	0.75	4.93
Carbohidratos (%)	78.37	66.11
Sacarosa (%)	5.2	1.5
Acrilamidas (µg/kg)	< 30	< 30

¹¹ Caracterización fisicoquímica de almidones de tubérculos cultivados en Yucatán, México Ciênc. Tecnol. Aliment. vol.28 no.3 Campinas July-Sept. 2008

Es importante que mientras más procesos de calentamiento hayan formado parte del procesamiento de un alimento, mayor la probabilidad de formar acrilamidas. Sin embargo, ambas frituras estudiadas tuvieron distintos tiempos de residencia durante su fritura, y aun así la formación de acrilamidas fue mínima. Los procesos de extrusión y fritura al realizarse a temperaturas mayores a de 120°C inician la formación de acrilamidas.

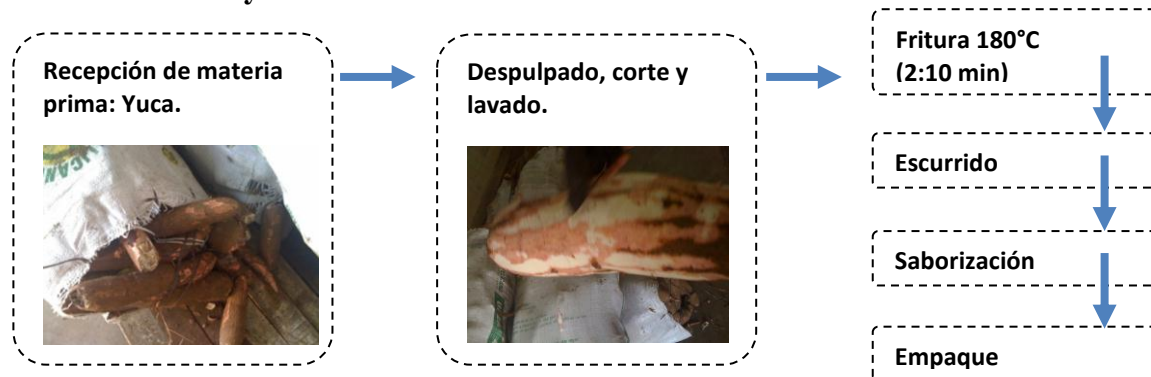
Figura 8. Diagrama de estabilidad y actividad de agua.



A continuación los procesos de fabricación de las frituras relacionados con el estudio. Por lo que los alimentos que llevan extrusión, reciben doble tratamiento térmico. Sin embargo, anteriormente se mencionó que la cantidad de actividad de agua que pierde la yuca es mayor, por lo que su tratamiento es más severo.

Los procesos de fabricación de los *snacks* evaluados son:

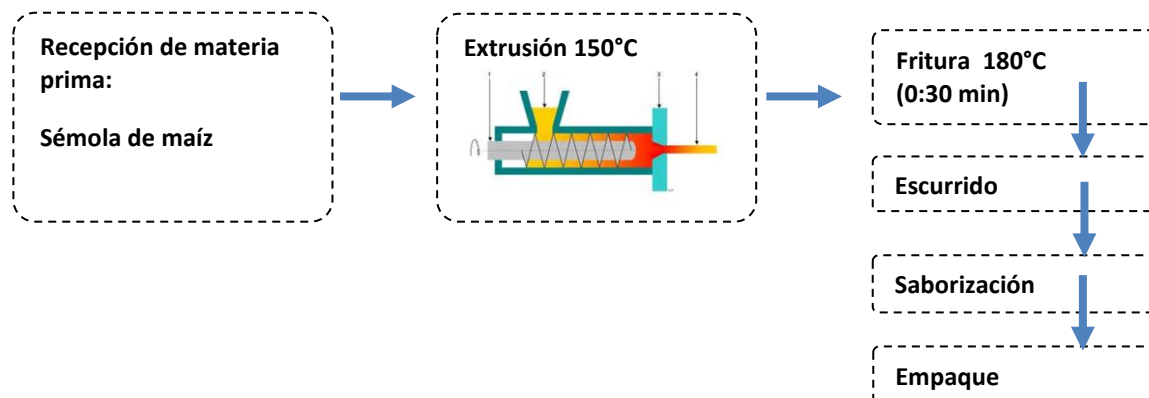
1. Fritura de yuca:



La yuca pasa por una etapa de lavado, en donde después de cortada es drenada en agua hacia la fritura. El lavado con agua se recomienda para reducir el contenido de asparagina en tubérculos que requieren dicha etapa. Sin embargo, es posible aumentar el

tiempo de lavado en agua para reducir aún más el contenido de asparagina y poder reducir la formación de acrilamida. Ya que la asparagina es un aminoácido polar.

2. Fritura de maíz:



En otra prueba de laboratorio se determinó para la yuca el tiempo de fritura en aceite a distintas temperaturas. En la primera muestra, “muestra A”, se introdujo en aceite a 180°C. La temperatura bajó a 140°C, y fue por 2:50 minutos que la yuca perdió su humedad. Se identificó la pérdida de humedad cuando se detuvo la extracción de la misma en forma de burbujas y la textura de la yuca era crujiente. La muestra “B” se introdujo en aceite a 140°C, bajando a una temperatura de 120°C por 5:00 min. Se pudo observar que la muestra B tenía una coloración más clara que la muestra A debido a la temperatura.

En el cuadro 14 el análisis del color en muestras de yuca frita a 180°C se observó que era más rojiza, más amarilla y menos blanca que la muestra frita a 140°C. Por lo que el color como ser un indicador de la reacción de Maillard puede indicar de igual forma, la formación de acrilamidas.

Cuadro 14 Análisis del color

Muestra A, Yuca Frita a 180°C x 2:50 min.					
	Muestra A	Duplicado	Triplicado	Promedio	Observación
L*	58.16	66.63	61.5	62.10 ± 4.27	Menos Amarilla
a*	2.89	-3.44	-0.58	-0.38 ± 3.17	Menos blanca
b*	25.73	25.18	32.69	27.87 ± 4.19	Más rojiza
Muestra B, Yuca Frita a 140°C x 5:00 min.					
	Muestra B	Duplicado	Triplicado	Promedio	
L*	69.53	91.14	70.02	76.90 ± 12.34	Más amarilla
a*	-2.97	-3.05	-4.76	-3.59 ± 1.01	Mas blanca
b*	20.66	1.11	20.52	14.10 ± 11.25	Menos rojiza

La temperatura de fritura es el único factor que determina la coloración de la muestra frita. Por lo que sí es posible reducir la coloración, la cual tiene relación al

contenido de acrilamidas, en un proceso a temperatura más baja como la de 140°C. Sin embargo, se reduciría la capacidad de producción ya que toma más tiempo eliminar la humedad de la materia prima.

Figura 9. Prueba de fritura, Muestra “A” 180°C y Muestra “B” 140°C respectivamente.



Otro factor importante que determina el tiempo de fritura de un alimento es el calibre o grosor de la hojuela. Debe de ser uniforme, tener entre 45 a 50 micras de pulgadas y tener un flujo regulado que ingrese al aceite, ya que al ingresar mayor cantidad del alimento es mayor la humedad que el aceite debe de extraer del mismo, por ende mayor el tiempo de fritura.

Se realizó otro experimento manteniendo la misma temperatura de 170°C con diferentes tiempos de fritura. Este experimento se realizó en un freidor industrial a 1:33 min y 1:44 min. Se puede observar que el emparedamiento es mayor en la muestra con mayor tiempo de fritura, y que a nivel industrial que pocos segundos de más en el tiempo de fritura inciden en su coloración. Por lo que a una temperatura alta como la de 170°C y un tiempo prolongado al necesario sí se relaciona con una coloración café indeseable y por ende un contenido de acrilamidas mayor a la muestra más amarilla.

La industria requiere capacidades altas de producción, y freír a una temperatura baja como la de 140°C implica costos altos de producción. Debido a que es imposible detener el desarrollo de las acrilamidas o removerlas de los alimentos una vez hayan sido producidas. Por lo que es posible controlar el contenido de los precursores de esta molécula, ya sea reduciendo el contenido de azúcares reductores o el con contenido de asparagina. Para reducir el contenido de asparagina es preciso evaluar las variedades de materia prima disponibles en el mercado. Hoy en día existen variedades de papa con un contenido mínimo de asparagina. Sin embargo, la yuca ha sido menos desarrollada en los mercados internacionales por lo que la disponibilidad de una variedad híbrida con menor contenido de asparagina es más difícil.

Sin embargo se recomienda analizar y validar si a lo largo de una corrida de producción, si existe o no la acumulación de acrilamidas debido a la utilización y calentamiento del aceite, el cual puede acumular dicho compuesto e ir concentrándolo a lo largo de su fritura.

Figura 10. Producto grueso, a 180°C con textura no uniforme y coloración café no deseable



Figura 11. Muestra C Yuca frita 1:33 min. en freidor industrial



Figura 12. Muestra D Yuca frita 1:44 min. en freidor industrial



Es posible utilizar las soluciones que a nivel comercial internacional se propone, por medio de reducir o remover el potencial de la asparagina con la enzima asparaginasa, sin alterar el sabor, apariencia o textura de los alimentos. La solución ofrecida por las empresas DSM y Novozymes funciona de la misma forma, convirtiendo a la asparagina en otro aminoácido llamado ácido aspártico, de tal forma que se previene la formación de acrilamida en un 90%. Los productos de estas empresas se derivan de *Aspergillus niger* y *Aspergillus oryzae* respectivamente. El uso de esta enzima está permitido por varios países como Estados Unidos, Australia, Nueva Zelanda y Dinamarca. Ha sido evaluada por el FAO/WHO, Comité Experto de Aditivos de Alimentos (JECFA) y por científicos de Canadá y se ha concluido su uso seguro en alimentos.

En el estado de California de Estados Unidos existe un listado de químicos que tienen el riesgo de producir cáncer. La acrilamida está incluida en este listado. Sin embargo, el listado llamado Proposition 65 (de Office of Environmental Health Hazard Assessment OEHHHA) exige que el fabricante del alimento comunique al consumidor en el punto de venta o en otro medio, sin ser obligatoria su declaración en el empaque, ya que eso no lo exige FDA.

Es de esperar que el consumidor guatemalteco esté preparado e informado correctamente de la existencia de estos compuestos, pueda regular el consumo de los alimentos que lo contienen a niveles bajos. Las empresas que producen alimentos como estos deben asegurarse de no exceder tiempos y temperaturas de fritura y horneado y utilizar enzimas recomendadas para reducir el contenido de acrilamidas en los alimentos fabricados. Así como las levaduras de origen natural que reducen el contenido de asparagina en alimentos, que el día de hoy comercializa la empresa Functional Technologies Corp., o las opciones mencionadas anteriormente que convierten la asparagina en ácido aspártico.

Sin embargo, estamos en un entorno en busca de una vida saludable, y los gobiernos y entidades regulatorias pueden llegar a establecer niveles permisibles máximos respecto al contenido de acrilamidas. Por lo que puede llegar a ser un requisito su declaración en la etiqueta nutricional. Y algunos productos alimenticios verse beneficiados y resaltar como valor agregado el no contener acrilamidas.

VIII. Conclusiones

1. El laboratorio de instrumental no cuenta con las condiciones adecuadas para el análisis de acrilamidas por cromatografía de gases.
2. Las condiciones de fritura recomendables para el proceso de fritura son:
 - Temperatura de fritura cercana a 140°C
 - La materia prima sí contiene el pH óptimo para evitar la formación de acrilamidas.
 - Uniformidad del calibre o grosor de la hojuela (45-50 micras de pulgada) para una cocción uniforme y no sobrecalentar la fritura.
 - El flujo de alimentación al freidor debe ser uniforme para mantener un tiempo de fritura constante con base en la humedad de cada producto.

IX. Recomendaciones

1. Se recomienda reducir la temperatura de procesos de fritura entre 120-140°C, mientras sea aceptable el producto al consumidor por su textura y apariencia.
2. Utilizar asparaginasa o levadura especial para reducir el contenido de asparagina en la materia prima y poder reducir el contenido de acrilamidas en snacks.
3. Seleccionar materia prima con un grado de madurez que contenga la menor cantidad de azúcares reductores para reducir la formación de acrilamidas en el proceso de calentamiento.
4. Debido al riesgo a la salud alto que implica este método se recomienda utilizar el método de cromatografía líquida (LC-MS) es más seguro debido a que no utiliza reactivos de alto riesgo y consiste en un método más simple en cuanto a su preparación. (Tareke, E., *Et al.* J. Agric. Food Chem. 2002, Vol. 50, 4998 - 5006.)

X. Bibliografía

- (1) AHN, J.S, *et al.* (2002) *Food Additives and Contaminants: Part A. Verification of the findings of acrylamide in heated foods.* Publisher Taylor & Francis, Vol. 19, No. 12. Pag. 1116 – 1124.
- (2) AMREIN, Thomas M. *et al.* (2004) *Potential for acrylamide formation in potatoes: data from the 2003 harvest.* Euro Food Research Technology Vol. 219. Pag. 572–578.
- (3) AURELI, Federica, *et al.* (2007) *An absorption study of dietary administered acrylamide in swine.* Food and Chemical Toxicology. Vol. 45. Pag. 1202–1209.
- (4) BIEDERMANN, Maurus, *et al.* (2002) *Experiments on Acrylamide Formation and Possibilities to Decrease the Potential of Acrylamide Formation in Potatoes.* Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, Vol. 93. Pag. 668-687.
- (5) BOROUSHAKI, Mohammad Taher, *et al.* (2010) *Determination of acrylamide level in popular Iranian brands of potato and corn products.* Food and Chemical Toxicology. Vol. 48. Pag. 2581–2584.
- (6) CLAEYS, Wendie L., Kristel de Vleeschouwer y Marc E. Hendriks. (2005). *Quantifying the formation of carcinogens during food processing: acrylamide.* Trends in Food Science & Technology, Vol. 16. Pag. 181-193.
- (7) E.C. (2003) *Health and Consumer Protection Directorate-General. Note of the meeting of experts on industrial contaminants in food: Acrylamide Workshop, 20–21 October 2003.* [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/acryl_guidance.pdf]
- (8) FAO/WHO. (2002) *Health implications of acrylamide in food, Report of a joint FAO/WHO consultation.* Ginebra, [http://www.who.int/foodsafety/publications/chem/en/acrylamide_full.pdf].
- (9) FDA. (2004) *Acrylamide in Food.* [<http://www.cfsan.fda.gov/~lrd/pestadd.html#acrylamide>]
- (10) GHSH. Ministerio de Salud Pública de Guatemala, Programa Nacional de Enfermedades Crónicas no Transmisibles, Organización Mundial de la Salud, Organización Panamericana de la Salud, Centro para Control y Prevención de Enfermedades de Atlanta. (2009) *Encuesta Mundial de Salud Escolar.* Capítulo Guatemala.
- (11) JANNEKE G. Hogervorst, Leo J. Schouten, Erik J. Konings, *et al.* (2007) *A Prospective Study of Dietary Acrylamide Intake and the Risk of Endometrial,*

Ovarian, and Breast Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* No. 16. Pag. 2304 - 2313.

- (12) JOHNSON, K.A., Gorzinski, S.J., Bodner, K.M., Campbell, R.A., Wolf, C.H., Friedman, M.A., Mast, R.W., (1986). *Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats.* **Toxicol. Appl. Pharmacol** Vol. 85, Pag. 154–168.
- (13) JUNG, M.Y., D.S. Choi y J.W. Ju. (2003). *A Novel Technique for Limitation of Acrylamide Formation in Fried and Baked Corn Chips and in French Fries.* *Food Chemistry and Toxicology* Vol. 68, Nr. 4, Pag. 1287-1290.
- (14) KONINGS, EJM, *et al.* (2010) *Validation of a database on acrylamide for use in epidemiological studies.* *European Journal of Clinical Nutrition.* Pag. 64, 534–540.
- (15) POSNICK Robin, Lauren y Sebastian Cianci. (2007) *Regulatory Report: Acrylamide, Furan and the FDA.* Reprinted form Food Safety Magazine, with permission of the publishers.
[<http://www.fda.gov/downloads/Food/FoodborneIllnessContaminants/ChemicalContaminants/UCM194483.pdf>]
- (16) TARDIFF, Robert G., *et al.* (2010) *Estimation of Safe Dietary Intake Levels of Acrylamide for Humans.* *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 48. Pag. 658–667.
- (17) VALLE Vega, Dr. Pedro y M en C. Bernardo Lucas Florentino. (2002) *Toxicología de Alimentos.* Instituto Nacional de Salud Pública y Centro Nacional de Salud Ambiental. Capítulo IV: Agentes Tóxicos Generados Durante el Procesamiento de Alimentos. México D.F. Pag. 206-210.

XI. Anexo

Determinación de acrilamidas

Tareke, E., Et al. J. Agric. Food Chem. 2002, Vol. 50, 4998 – 5006

Jung y Choi, JFS: Food Chemistry and Toxicology. Vol 68. No. 4 2003

- **Reactivos químicos:**

- *Sigm-Aldrich Co. (St. Louis, MO 63103, U.S.A.):*
 - Acrilamida para biología molecular, $\geq 99\%$ (HPLC)
 - N,N-Dimetilacrilamida 99%

- *Merck KGaA (64271 Darmstadt, Germany)*
 - Bromo
 - Ácido Bromhídrico 47%
 - Bromuro de Potasio
 - Tiosulfato de Sodio Pentahidratado
 - Sulfato de Sodio Anhidro
 - Carbón Grafitado
 - Acetato de Etilo

Cuadro 15 Propiedades físicas de reactivos utilizados en etapa de bromación.

	Bromuro de potasio	Acido Bromhídrico	Agua de Bromo
Descripción	Sólido cristalino, color blanco o incoloro. Higroscópico.	Disolución acuosa del hidruro de bromo.	Solución en agua líquida, color marrón.
Fórmula molecular	KBr	HBr	Br ₂
Peso molecular	120.98	80.9	-
Punto de ebullición	1435°C	-67°C	< 100°C
Peso específico (agua=1)	2.75	1.8	1
Presión de vapor	-	2445 kPa a 20°C	-
Solubilidad en agua	En agua 65.5 g/100 mL (20°C),	193 g/100 ml a 20°C	Completamente miscible.

Cuadro 16 Propiedades físicas del solvente.

	Acetato de etilo
Descripción	Es un líquido incoloro, con olor a frutas, menos denso que el agua.
Fórmula molecular	CH ₃ COOCH ₂ CH ₃
Peso molecular	88.1
Punto de ebullición	77 °C

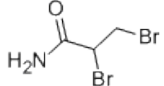
Cont. Cuadro 16

	Acetato de etilo (cont.)
Peso específico (agua=1)	0.902 (20/4)
Presión de vapor	73 mm Hg a 68°F (20°C)
Punto de inflamabilidad	24°F (-4.4°C)
Solubilidad en agua	Soluble

Cuadro 17 Propiedades físicas de estándar interno y estándar.

	Estándar interno, N,N-Dimetil-2- Propenamida o N,N- Dimetil-2-Acrilamida	Estándar, Acrilamida
Concentración	99.95%, con 0.05% Mequinol.	99%. Certificado indica 100%
Descripción	Líquido. Cas: 2680-03-7	Polvo blanco, incoloro. Cas: 79-06-1
Fórmula molecular	C ₅ H ₉ NO	C ₃ H ₅ NO
Estructura		
Peso molecular	99.13 g/mol	71.08 g/mol
Punto de ebullición	183.16°C	125°C a 25 mmHg
Densidad	0.962 g/cm ³ a 25°C	-
Presión de vapor	-	0.03 mmHg (40°C)
Solubilidad en agua	-	2.5 g en 10mL, solución sin turbidez, clara.
Punto de inflamabilidad	71.67°C	138°C
Punto de fusión		82-86°C

Cuadro 18 Propiedades físicas de estándar interno y estándar bromados.

	Estándar interno bromado, 2,3-dibromo-N,N- dimetilpropionamida	Estándar bromado, 2,3-dibromopropionamida Cas: 15102-42-8
Fórmula molecular	C ₅ H ₆ NOBr ₂	C ₃ H ₂ NOBr ₂
Peso molecular	258.93906	230.89
Punto de fusión	-	132-133°C
Estructura	Similar a la estándar interno, pero bromos en cada carbono del doble enlace.	
m/z	180	152, 150, 106, 108

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico. Los reactivos tienen un alto riesgo a la salud, por lo que se recomienda revisar sus Hojas de Seguridad (MSDS) previo a su uso y su manipulación cuidadosa.

- **Equipo analítico:**

- Espectrómetro de masas 5975C VL MSD Agilent Technologies con detector de triple eje. Con Software GC/MS.
- Sistema GC 6850 Agilent Technologies. Para el análisis de cromatografía de gases.
- Columna capilar de Agilent Technologies J&W HP-5MS (30m x 0.25mm i.d., 0.25µm espesor). Cat. No. 19091S-433 E.

- **Preparación estándar interno:** N,N-Dimetilacrilamida en solución de 1µg/mL de agua.

Se midió 104 µL en 100 mL de agua destilada x Densidad 0.962 µg/µL, obteniendo una solución de 1.00048 µg/mL.

- **Preparación estándar para curva de calibración:** Acrilamida en solución, concentraciones distintas.

En el desarrollo del presente trabajo se trabajaron curvas de tres puntos de 25 a 100 µg/L, una de cinco puntos de 25 a 500 µg/L y finalmente una curva de 5 puntos: 10, 20, 30, 40, y 50 µg/L en agua.

Se preparó una solución madre de 0.05 g en 1L de agua destilada, es decir 50,000 µg/L.

Los cálculos para la preparación de los estándares son:

$$\begin{array}{l}
 100 \mu\text{L} * \frac{0.1 \text{ mL Madre}}{0.5 \text{ L Soln.}} * \frac{1 \text{ mL Madre}}{1000 \text{ mL Madre}} * \frac{50,000 \mu\text{g madre}}{1 \text{ L Madre}} = \mathbf{10 \mu\text{g/L}} \\
 \\
 200 \mu\text{L} * \frac{0.2 \text{ mL Madre}}{0.5 \text{ L Soln.}} * \frac{1 \text{ mL Madre}}{1000 \text{ mL Madre}} * \frac{50,000 \mu\text{g madre}}{1 \text{ L Madre}} = \mathbf{20 \mu\text{g/L}} \\
 \\
 300 \mu\text{L} * \frac{0.3 \text{ mL Madre}}{0.5 \text{ L Soln.}} * \frac{1 \text{ mL Madre}}{1000 \text{ mL Madre}} * \frac{50,000 \mu\text{g madre}}{1 \text{ L Madre}} = \mathbf{30 \mu\text{g/L}} \\
 \\
 400 \mu\text{L} * \frac{0.4 \text{ mL Madre}}{0.5 \text{ L Soln.}} * \frac{1 \text{ mL Madre}}{1000 \text{ mL Madre}} * \frac{50,000 \mu\text{g madre}}{1 \text{ L Madre}} = \mathbf{40 \mu\text{g/L}}
 \end{array}$$

$$500 \mu\text{L} * \frac{0.5 \text{ mL Madre}}{0.5 \text{ L Soln.}} * \frac{1 \text{ mL Madre}}{1000 \text{ mL Madre}} * \frac{50,000 \mu\text{g madre}}{1 \text{ L Madre}} = 50 \mu\text{g/L}$$

• **Preparación de muestras de boquitas (frituras).**

- Homogenizar 10g de muestra, 100mL de agua
- Centrifugar la solución 5500 RPM X 5 min.
- Separar líquidos de sólidos promedio de un filtro. Se recomienda utilizar filtros de vidrio o lana de vidrio, ya que al usar papel filtro se reduce el porcentaje de recuperación de las acrilamidas debido a su solubilidad en agua.
- Purificar el filtrado con carbón grafitado. Misma recomendación a etapa anterior.
- Agregar 1 mL del Estándar Interno a cada una de las muestras y a los estándares de la curva.

Figura 13. Muestra PY211-1:40 min fritura, yuca



Figura 14. Muestra PY211-2:00 min. fritura, yuca con mayor intensidad de color café

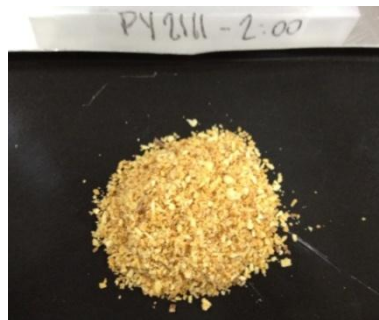


Figura 15. Muestras fritas. **Muestra 1:** 10g snack de maíz frito 00:30 min; **Muestra 2:** 10g snack de trigo frito 00:10 min; **Muestra 3:** 10g yuca frita 2:00 min; **Muestra 4:** 10g yuca frita 2:00 min (duplicado); **Muestra 5:** 10g yuca frita 1:40 min; **Muestra 6:** 10g yuca frita 1:40 min (duplicado).



Figura 16. Purificación.



- **Derivatización de muestras y estándares.**

- Realizar la derivatización dentro de una campana de extracción.
- Agregar bromuro de potasio (7.5 g), acidificar con ácido bromhídrico hasta llegar a un pH 1-3, y agua de bromo saturada (10 mL, o hasta que una coloración naranja suave permanezca estable). El agua de bromo saturada debe estar previamente refrigerada a 4°C por 1 hora en un matraz cubierto o color ámbar.
- Cubrir las muestras con papel aluminio, y refrigerar a 4°C durante la noche.
- Eliminar el exceso de bromo agregando unas gotas de tiosulfato de sodio (1M) hasta eliminar la coloración amarilla.

Figura 17. Etapa de derivatización, muestras bromadas. Coloración amarilla.



Figura 18. Muestras después de refrigeración durante la noche.



Figura 19. Eliminación de exceso de bromo con tiosulfato de sodio.



- **Extracción.**

- Se debe extraer en solución con acetato de etilo (2 x 20 mL) en embudos de decantación.

Figura 20. Sistema de extracción.



Figura 21. Fase acuosa (atrás) y fase orgánica que contiene acrilamida (en frente).



Figura 22. Filtro de lana de vidrio, separación del sulfato de sodio.



- A la fracción orgánica agregar sulfato de sodio anhidro (15g).
- Secar y evaporar acetato de etilo. Se utilizó un baño maría, luego utilizó el equipo recomendado por la metodología de referencia, el rotavapor giratorio. Se obtuvo 200 μL , algunas muestras tuvieron que reconstituirse a ese volumen.

Cuando se trabajaron muestras concentradas se reconstituyo a 1000 μL .

Figura 23. Rotavapor giratorio al vacío.



Figura 24. Sistema de evaporación y control de temperatura.



- **Cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS)**
 - La muestra preparada se inyecta al cromatógrafo

Figura 25. Sistema analítico para cromatografía de gases.



