



---

---

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE  
HIDALGO**

**INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD**

***EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DE LOS PARÁMETROS DE PROCESO DE  
FREÍDO EN LA FORMACIÓN Y BIOACCESIBILIDAD DE ACRILAMIDA EN  
PAPAS FRITAS***

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**DOCTOR EN CIENCIA DE LOS ALIMENTOS Y SALUD HUMANA**

**PRESENTA:**

**M.C. EMMANUEL MARTÍNEZ RAMÍREZ**

**DIRECTORES DE TESIS**

**DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ**

**DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA**

**MINERAL DE LA REFORMA, HIDALGO**

**2019**

ICSa-DCASH-2019

Asunto: Asignación de Jurado de Examen

**M. en A. JULIO CESAR LEINES MEDÉCIGO**  
**COORDINACIÓN DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR**

Por este medio se informa que el comité tutorial asignado al M. en C. Emmanuel Martínez Ramírez con número de cuenta: 132190, estudiante del Doctorado en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana dio terminación al trabajo de tesis titulado "Evaluación de la influencia de los parámetros de proceso de freído en la formación y bioaccesibilidad de acrilamida en papas fritas", y por lo tanto se autoriza la impresión del documento de tesis en extenso propuesto por el estudiante.

Lo anterior, en función de que, el estudiante realizó todas las correcciones, adiciones y/o modificaciones sugeridas por el comité en la revisión previa con fecha 11 de abril del 2019. Por tal motivo, solicito a usted tenga a bien permitir al doctorando dar continuidad al proceso necesario que conlleve a la obtención del grado de Doctor en Ciencias de los Alimentos y Salud Humana.

DRA. EVA MARÍA SANTOS LÓPEZ  
Director de tesis

DR. JOSÉ ANTONIO RODRÍGUEZ ÁVILA  
Director de tesis

DRA. MIRANDELI BAUTISTA ÁVILA

DRA. AURORA QUINTERO LIRA

ATENTAMENTE

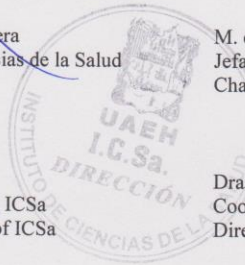
Pachuca, Hidalgo, 11 De Abril del 2019  
"Amor, Orden y Progreso"

M.C.Esp. Adrián Moya Escalera  
Director del Instituto de Ciencias de la Salud  
Dean

M. en N.C Arianna Omaña Covarrubias  
Jefa del Área Académica de Nutrición  
Chair of Academic Area of Nutrition

Dra. Lydia López Pontigo  
Coordinadora de Posgrado del ICSa  
Director of Graduate Studies of ICSa

Dra. Esther Ramírez Moreno  
Coordinadora del Programa Educativo  
Director of Graduate Studies





Este proyecto fue desarrollado con apoyo de la empresa Fritos Totis S.A. de C.V con los siguientes convenios:

1. Reducción de acrilamidas en proceso de botanas fritas y desarrollo de técnicas de bajo impacto ambiental para monitoreo de acrilamida y degradación de aceite. Proyecto 232271 PEI-Fritos Totis S.A. de C.V. convocatoria 2016.
2. Determinación de niveles de acrilamida en botanas y propuesta de estrategias para su reducción. Convenio específico UAEH-Fritos Totis S. A. de C.V., 15 de septiembre de 2017

El presente trabajo fue presentado en los siguientes congresos de investigación científica:

1. XXIX Congreso Nacional de Química Analítica y XIX Simposio estudiantil de la Asociación Mexicana de Química Analítica efectuado del 28 de junio al 1 de Julio del año 2016 en la Ciudad de Villa Hermosa, Tabasco, México. Con el título: Evaluación del 2-naftalentiol como derivatizante en el análisis de acrilamida mediante cromatografía de líquidos.
2. XVIII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C. Efectuado del 25-30 de Junio del año 2017 en la ciudad de Puerto Vallarta, Jalisco, México. Con el título: Determinación de acrilamida en papas fritas mediante HPLC-MS/MS usando 2-naftalentiol como derivatizante químico.

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero quiero agradecer a Dios por permitirme la vida para concluir una etapa más de aprendizaje.

A mis padres Martín y Paola por su apoyo incondicional y amor que siempre me han brindado. A mis hermanos que también desde su trinchera me han demostrado su apoyo y cariño.

También quiero agradecer a mis directores de Tesis. Dra. Eva, muchas gracias por el apoyo y paciencia que me brindó durante la duración del proyecto. Dr. José Antonio, pepe, muchas gracias por todo tu apoyo para este segundo trabajo que realizo contigo, como tú me lo has dicho muchas veces que me gusta la mala vida para trabajar nuevamente a tu lado; pero creo que vale la pena, porque siempre aprendo mucho de ti y sobre todo, valoro la amistad de los años que llevo de conocerte.

Al resto de mi comité, Dra. Mirandeli y Dra. Aurora, muchas gracias por sus aportaciones y consejos.

Gracias a mis compañeros y amigos del laboratorio 1 y 2, especialmente a Gaby, Israel, Giann, Miriam, Lorena, Lupita Rangel, Lupita Joselin, Juan Francisco, Tanese, Yucundo, Irma, Ale, Jessica y Raybel. Muchas gracias a todos por su apoyo, conocimiento y amistad. A mis compañeros del laboratorio de Microbiología: Magda, Iván, Keni, Belem y Alba.

A mis amigos y compañeros de generación, especialmente a Orquídea, Quinatzin, Alicia, Jorge y Enrique, gracias colegas.

A mis amigos y personas especiales que me han apoyado a lo largo de la mayoría de mi formación académica y que sin duda son parte especial en mi vida, gracias a: Eduardo, Germán, Javier, Zaira, Nacho, Heidi, Adabella, René, Raúl, Alma y Rubí.

## ÍNDICE GENERAL

	<b>Página</b>
Índice general	i
Índice de figuras	iv
Índice de tablas	v
<b>I. INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	<b>1</b>
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b>	<b>5</b>
<b>III OBJETIVOS</b>	<b>6</b>
<b>CAPÍTULO 1: Cuantificación de acrilamida en papas fritas</b>	<b>7</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b>	<b>8</b>
1.1 Acrilamida	8
1.1.1 Acrilamida en alimentos	10
1.1.2 Formación de acrilamida en alimentos	12
1.1.3 Métodos de análisis de acrilamida en alimentos	15
1.1.3.1 Muestreo y homogenización	16
1.1.3.2 Extracción	16
1.1.3.3 Limpieza de la muestra	17
1.1.3.4 Detección y cuantificación de acrilamida	18
1.1.3.4.1 Cromatografía de gases	19
1.1.3.4.2 Cromatografía de líquidos	21
<b>1.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>24</b>
1.2.1 Reactivos	24
1.2.2 Reacción de derivatización entre el 2-naftalentiol y la acrilamida	24
1.2.3 Análisis por FT-IR y <sup>1</sup> H-RMN	24
1.2.4 Optimización de la derivatización	24
1.2.5 Tratamiento de las muestras para el análisis	25
1.2.6 Condiciones de separación por HPLC	26
1.2.7 Validación de la técnica analítica	26
1.2.8 Análisis de muestras	27
<b>1.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>28</b>
1.3.1 Síntesis de la acrilamida derivatizada con el tiol	28
1.3.2 Optimización de la reacción de derivatización	30
1.3.3 Validación del método analítico	35
1.3.4 Análisis de muestras	37
<b>1.4 CONCLUSIONES</b>	<b>38</b>
<b>CAPÍTULO 2: Estrategias para la disminución de acrilamida en papas fritas.</b>	<b>39</b>
<b>2. MARCO TEÓRICO</b>	<b>40</b>
2.1 Definición de botana y su consumo	40
2.1.1 Papas fritas	42
2.1.1.1 Producción de la papa	43
2.1.1.2 Variedades de papas y su clasificación	44

2.1.1.3 Nutrientes y vitaminas de la papa	45
2.1.1.4 Consumo	47
2.1.2 Proceso de elaboración de papas fritas	48
2.1.3 Calidad de las papas fritas	50
2.1.4 Estrategias para la disminución de acrilamida en papas fritas	51
2.1.5 Evaluación de textura de las papas fritas	57
<b>2.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>60</b>
2.2.1 Reactivos	60
2.2.2 Material	60
2.2.3 Experimentación	60
2.2.4 Análisis fisicoquímicos	61
2.2.4.1 Medición de azúcares reductores	61
2.2.4.2 Medición de acrilamida	62
2.2.4.3 Determinación de humedad	62
2.2.4.4 Determinación de grasa	62
2.2.4.5 Determinación de color	62
2.2.4.6 Determinación de textura	63
2.2.5 Análisis estadístico	63
<b>2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>65</b>
2.3.1 Análisis de correlaciones	65
2.3.2 Efecto de la conservación de las papas sobre el contenido de acrilamida.	66
2.3.3 Efecto del procesado sobre las características sensoriales de la papa frita	72
2.3.3.1 Papa delgada	72
2.3.3.2 Papa gruesa	75
<b>2.4 CONCLUSIONES</b>	<b>79</b>
<b>CAPÍTULO 3: Efecto de los factores del procesado en la bioaccesibilidad de la acrilamida en papa frita</b>	<b>80</b>
<b>3.MARCO TEÓRICO</b>	<b>81</b>
3.1 Toxicidad de la acrilamida	81
3.1.1 Carcinogenicidad de la acrilamida	82
3.1.2 Metabolismo de la acrilamida	82
3.1.3 Biodisponibilidad y absorción	83
3.1.4 Biotransformación	84
3.1.5 Estudios de simulación gastrointestinal in vitro	87
3.1.5.1 Fase oral	88
3.1.5.2 Fase gástrica	90
3.1.5.3 Fase intestinal	91
3.1.5.4 Solubilidad y diálisis	92
3.1.6 Bioaccesibilidad de la acrilamida	93
<b>3.2 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>95</b>
3.2.1 Reactivos	95

3.2.2 Experimentación	95
3.2.2.1 Ensayo de bioaccesibilidad	96
3.2.2.2 Análisis de acrilamida	97
3.2.3 Análisis estadístico	97
<b>3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	99
3.3.1 Análisis de correlaciones	99
3.3.2 Efecto de la conservación de las papas sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida	100
3.3.3 Efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida	103
<b>3.4 CONCLUSIONES</b>	105
<b>IV BIBLIOGRAFÍA</b>	106

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1: Estructura química de la acrilamida	8
Figura 2: Mecanismo de formación de acrilamida por vía general y específica de aminoácidos	14
Figura 3: Principales pasos en el tratamiento de la muestra para el análisis de acrilamida	16
Figura 4. Mecanismo de reacción entre la acrilamida y un tiol (2-naftalentiol)	23
Figura 5: Espectros infrarrojos	30
Figura 6: Espectro de resonancia <sup>1</sup> H-RMN	31
Figura 7: Gráficas de superficie de respuesta para cada factor	34
Figura 8: Cromatogramas obtenidos durante el proceso de optimización	35
Figura 9: Esquema general del proceso industrial para la obtención de papas fritas	50
Figura 10: Fuerza generalizada de la curva de desplazamiento para la primer mordida en un material crujiente o frágil cuando se rompe en la boca	59
Figura 11: Curva de desplazamiento de análisis textura para la identificación de variables a medir	64
Figura 12: Diagrama de pareto de efectos estandarizados para el contenido de acrilamida	68
Figura 13: Gráfico de la interacción de los efectos principales estandarizados del proceso de fritura de las papas	71
Figura 14: Gráfica de comparación del contenido de acrilamida en función del tiempo de conservación	72
Figura 15: Imágenes de papas de corte delgado	74
Figura 16: Curva de fuerza-desplazamiento de uno de los experimentos con codificación 150-5-NE.	75
Figura 17: Imágenes tomadas a las papas de corte grueso	77
Figura 18: Curvas de fuerza-desplazamiento para muestras de papas fritas corte grueso	79
Figura 19: Diagrama esquemático de la absorción, distribución, biotransformación y excreción de la acrilamida	85
Figura 20: Biotransformación de la acrilamida en humanos	86
Figura 21: Comparación del porcentaje de bioaccesibilidad en función del tiempo de conservación	103
Figura 22: Diagrama de efectos estandarizados sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de la acrilamida	104



## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
Tabla 1: Características físico-químicas de la acrilamida	9
Tabla 2. Concentración reportada de acrilamida en distintos alimentos	11
Tabla 3: Análisis de acrilamida por cromatografía de gases	20
Tabla 4: Análisis de acrilamida por cromatografía de líquidos	22
Tabla 5. Matriz del diseño experimental central compuesto:	26
Tabla 6: Matriz experimental del diseño central compuesto y las respuestas obtenidas	32
Tabla 7. Parámetros analíticos obtenidos del análisis de acrilamida en papas fritas	36
Tabla 8. Recuperación de acrilamida en papas fritas	37
Tabla 9: Resultados del análisis de acrilamida en papas fritas	38
Tabla 10: Composición química proximal de papa blanca	46
Tabla 11: Matriz de diseño de experimentos para el contenido de acrilamida en papas	62
Tabla 12: Correlaciones momento producto de Pearson obtenidas, entra cada par de variables	66
Tabla 13. Matriz experimental con los resultados obtenidos de calidad de la papa para evaluar el proceso de fritura en la mitigación del contenido de acrilamida con respecto al tiempo de conservación.	68
Tabla 14: Resultados de las características físico-químicas y sensoriales de las papas fritas considerando el tiempo de conservación y grosores delgados	73
Tabla 15: Resultados de las características físico-químicas y sensoriales de las papas fritas considerando el tiempo de conservación y grosores gruesos.	76
Tabla 16: Matriz de diseño de experimentos para evaluación de bioaccesibilidad de la acrilamida en papas fritas	96
Tabla 17: Composición de las soluciones electrolíticas utilizadas en el proceso de simulación gastrointestinal <i>in vitro</i>	97
Tabla 18: Correlaciones momento producto de Pearson obtenidas, entra cada par de variables para evaluar el grado de correlación con la bioaccesibilidad	100
Tabla 19: Matriz experimental con los resultados obtenidos de la bioaccesibilidad de la acrilamida con respecto el proceso de fritura y el tiempo de almacenamiento	101
Tabla 20: Resultados del contenido inicial de acrilamida y del porcentaje de bioaccesibilidad en función del proceso de escaldado para la papa sin almacenamiento.	104
Tabla 21: Resultados del contenido inicial de acrilamida y del porcentaje de bioaccesibilidad en función del tiempo de freído para la papa almacenada por 4 meses.	105

## I. INTRODUCCIÓN GENERAL

La seguridad alimentaria es un tema que preocupa cada vez más a los consumidores, a los gobiernos, productores y evidentemente a la industria de los alimentos debido a su impacto comercial en el mundo. Además los consumidores en la actualidad son más conscientes y exigentes con la adquisición de alimentos, que aparte de cubrir sus necesidades nutricionales sean también saludables y de buena calidad (Krska *et al.* 2012)

Uno de los temas que más interés despierta es la presencia de productos químicos en los alimentos. Estas sustancias pueden ser agregadas intencionalmente de manera legal (como los aditivos) o ilegal (con el fin de adulterarlos), pero también pueden ser residuos cuya presencia se consideran como contaminantes. La presencia de estos compuestos en bajas concentraciones puede ser debido a causas naturales, por ejemplo: las micotoxinas (Reddy *et al.* 2010), y ficotoxinas (Aráoz, Molgó & Tandeu de Marsac, 2010). También pueden presentarse por causas medioambientales, entre los que destacan los bifenilos policlorados (Rawn *et al.*, 2009) compuestos parecidos a las dioxinas (Parzefall, 2002), residuos de pesticidas (Baker, Benbrook, Groth, & Benbrook, 2002) y percloratos (Wang *et al.* 2009). Igualmente, la presencia de residuos químicos se puede deber a la migración de compuestos químicos del empaque hacia el alimento, como es el caso de ftalato y el bisfenilo-A (Muncke, 2009); residuos de fármacos de uso veterinario (Stolker & Brinkman, 2005); o compuestos que son añadidos deliberadamente, como la melamina en fórmulas lácteas infantiles (Tittlemier, y otros, 2009). Por último y no menos importante están aquellos productos resultantes del procesamiento de alimentos, como el hidroximetilfurfural y acrilamida, entre otros (Becalski, Lau, Lewis, & Seaman, 2003).

La acrilamida es uno de los productos del procesamiento térmico de alimentos que últimamente ha llamado la atención (Granda, Moreira, & Tichy, 2004). En el año 2002 se investigó y confirmó la presencia de acrilamida en diversos alimentos, y la industria de los alimentos, los departamentos de regulación sanitaria alimentaria y sobre todo la comunidad científica se enfocaron en explicar la presencia de este compuesto y después de varios estudios llegaron a la conclusión de que la reacción de Maillard era la principal vía de formación (Romani, Bacchiocca, Rocculi, & Dalla Rosa, 2009).

La reacción de Maillard es la responsable de propiedades organolépticas de los alimentos tratados térmicamente. De manera general, la primer etapa de esta reacción empieza con la condensación entre un grupo amino libre de un aminoácido, péptido o proteína y el grupo carbonilo de azúcares reductores o de lípidos oxidados. Posteriormente, y mediante una serie de reacciones complejas, da lugar a los denominados de manera genérica, productos de la reacción de Maillard. Por lo tanto, esta reacción es especialmente importante para la industria alimentaria, ya que se desarrolla durante los procesos de tostado, horneado o cocinado, otorgando a los alimentos nuevos aromas, sabores y colores agradables para el consumidor.

Pero dentro de los productos de la reacción de Maillard también está la acrilamida, que se ha demostrado que es un compuesto neurotóxico y con potencial carcinogénico, que junto con la glicidamida, compuesto resultante del metabolismo de la acrilamida, presenta un carácter genotóxico (Blank, 2005). Se requieren temperaturas mayores a 120 °C para generar acrilamida, esto generalmente ocurre en alimentos ricos en carbohidratos sujetos a procesos de fritura, rostizado y horneado (Sansano, Heredia, Peinado, & Andrés , 2017). La mayor preocupación acerca de la ingesta de acrilamida viene de los productos a base de granos de cereal (bizcochos, galletas o pan), cereales para el desayuno, café y especialmente en productos de la papa (papas a la francesa y papas crujientes “crisps”).

A partir del descubrimiento de este compuesto en diversos alimentos fritos, instituciones relacionadas al ámbito de la salud e industrias alimentarias han sumado esfuerzos para disminuir la exposición de acrilamida a los consumidores. Para tal propósito la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, publicó un manual con estrategias tecnológicas que pueden ser aplicadas a nivel industrial y que es constantemente actualizada (Romani, Bacchiocca, Rocculi, & Dalla , 2009). Dentro de las recomendaciones que se pueden aplicar durante el proceso de producción se encuentra: la selección la materia prima (papa, aceite, aditivos) diseño del recipiente (empaques) y diseño del proceso (temperaturas y tiempos de freído, escaldado y lavados) (Sansano, Heredia, Peinado, & Andrés , 2017; EC, 2017)

Un aspecto que se tiene que resaltar para comprobar la efectividad de una estrategia de disminución de la acrilamida es contar con un método de análisis cuantitativo. Dentro de los protocolos de análisis se pueden clasificar en cromatográficos y no cromatográficos. Dentro de los primeros mencionados se puede citar a la electroforesis capilar (Bermudo, Moyano, Puignou, & Galceran, 2004), métodos basados en sensores infrarrojos (Ayvaz & Rodríguez-Saona, 2015) y por fluorescencia usando puntos cuánticos (Hu *et al.* 2014), dentro de los métodos cromatográficos se destacan las metodologías basadas en la cromatografía de gases (Jessuzek & Schieberle, 2003) y la cromatografía de líquidos de alta resolución (Kepekci Tekkli, Önal, & Önal, 2012), siendo ésta última la más empleada para el análisis de acrilamida en alimentos.

Aunque si bien, la mayoría de los métodos oficiales de análisis se basan en el uso de equipos cromatográficos acoplados a detectores de masas, no todos los laboratorios convencionales tienen fácil disposición a equipos de este tipo, por lo que la comunidad científica se ha visto en la necesidad de desarrollar metodologías que permitan la cuantificación de acrilamida por medio de equipos cromatográficos con detectores convencionales y accesibles. Así pues, se han desarrollado técnicas de derivatización química que permiten el análisis de acrilamida utilizando detectores sencillos. Dentro de las técnicas de derivatización se encuentran la bromación (Soares, Cunha, & Fernandes, 2006), el uso de ácido trifluoroacético (Notardonato, Avino, Centola, Cinelli, & Ruso, 2013) y de tioles (Jessuzek & Schieberle, 2003).

Por otra parte un aspecto importante a considerar es la cantidad total de acrilamida que se puede encontrar en el organismo después de su ingesta. Los alimentos entran directo al tracto digestivo, en el que suceden una serie de cambios drásticos en su estructura y composición química por variación del pH y la acción de las enzimas que se encuentran en la boca, estómago e intestino. Por ello, se ha desarrollado el término de bioaccesibilidad, que se refiere para describir la proporción del contaminante ingerido que se desprende de la matriz alimentaria que lo contiene para pasar al jugo digestivo en el tracto intestinal (Hamzalıoğlu & Gökmen, 2014).

El efecto de las diferentes etapas del proceso digestivo en los compuestos presentes en alimentos varía considerablemente entre individuos, los estudios *in vivo* podrían ser los más adecuados para su aplicación. Sin embargo, los estudios *in vivo* son intrusivos, e implican restricciones éticas y monetarias (Hamzalioglu & Gökmen, 2014; Sansano, Heredia, Peinado, & Andrés, 2017).

Basadas en estas limitaciones, los modelos *in vitro* representan una alternativa científicamente validada para evaluar la influencia de la ingestión de compuestos tóxicos presentes en alimentos. Algunas de las ventajas que se tiene con la aplicación de los modelos *in vitro* es que dan resultados rápidos, bajos costos, escasas restricciones éticas, selección de las condiciones a controlar y la facilidad de muestreo durante todo el proceso de digestión (Minekus *et al.*, 2014).

## II. JUSTIFICACIÓN

Desde el descubrimiento de la presencia de acrilamida en distintos alimentos sometidos a tratamientos térmicos, tales como las papas fritas, diversas instituciones como la FAO, OMS en conjunto con la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria en su reporte del año 2017, establecieron un límite de concentración de  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$  de este compuesto en papas fritas. Esto debido a las propiedades neurotóxicas y posible poder carcinogénico que presenta la acrilamida sobre la salud del consumidor.

Debido a la relevancia que tiene el consumo de papas fritas en nuestro país y a nivel mundial, se han desarrollado estrategias para la mitigación de acrilamida en este producto. Por tal motivo la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria, publicó un manual “tool-box” que plasma estrategias tecnológicas que pueden ser aplicadas a nivel industrial, dentro de las que destacan y que han sido favorablemente calificadas por diversos estudios, se encuentran: modificaciones al proceso de producción (temperaturas y tiempo de freído y aplicación de escaldado) y la selección de materia prima (variedad de la papa y conservación de la misma). Dado el interés de una industria local por reducir los contenidos de acrilamida en sus productos, en el presente trabajo se decidió evaluar los factores que afectan durante el proceso de freído en la formación de acrilamida sin comprometer la calidad organoléptica y sensorial característica de las papas fritas.

Para evaluar el control de la presencia de acrilamida y la evaluación de las estrategias de mitigación se necesita de un método analítico que permita la medición de acrilamida en papas. Para este trabajo se utilizó el 2-naftalentiol como una interesante alternativa en la cuantificación de acrilamida, considerando que éste es un tiol con propiedades nucleofílicas que genera un derivado estable y fácilmente detectado por fluorescencia. Evitando así el uso de un sistema cromatográfico de alto costo como lo es uno acoplado a un detector de espectroscopía de masas.

Por último, existe poca información relacionado al comportamiento que tiene la acrilamida durante el proceso gastrointestinal y la evaluación del posible efecto que tienen los

parámetros de fritura sobre la bioaccesibilidad de este compuesto. Por ello, a través de simulación gástricointestinal *in vitro* se evaluó la bioaccesibilidad de la acrilamida.

### **III OBJETIVOS**

#### *OBJETIVO GENERAL*

Evaluar estrategias tecnológicas disponibles que permitan la disminución de la acrilamida en papas fritas, compuesto tóxico para la salud humana y su riesgo potencial al ser ingerido mediante ensayos de bioaccesibilidad *in vitro*.

#### *OBJETIVOS ESPECÍFICOS*

1. Desarrollar una técnica analítica basada en HPLC acoplado a un detector de fluorescencia que permita la determinación de acrilamida en concentraciones usuales en papas fritas, mediante el uso del 2-naftalentiol como derivatizante químico.
2. Evaluar el efecto de los parámetros de proceso de fritura en el contenido de acrilamida para proponer los mejores procesos que aseguren además propiedades sensoriales adecuadas.
3. Evaluar la bioaccesibilidad de acrilamida en papas fritas mediante ensayos de un proceso digestivo simulado *in vitro* en función de los parámetros de proceso evaluados.



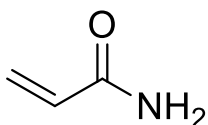
# Capítulo 1

## Cuantificación de acrilamida en papas fritas

## 1. MARCO TEÓRICO

### 1.1 Acrilamida

La acrilamida (también conocida como: amida acrílica, amida del ácido acrílico, etilencarboxiamida, propenamida, amida del ácido propenoico y vinil amida) es una pequeña molécula orgánica con moderada reactividad con otras moléculas orgánicas a través de los enlaces que puede formar con el átomo de oxígeno o nitrógeno que posee (Bethke & Bussan, 2013). Físicamente, es un sólido cristalino, blanco y sin olor, de alta solubilidad en compuestos orgánicos polares y de polaridad media como: agua, alcoholes y acetona. La estructura química se muestra en la Figura 1. Una de las principales características de este compuesto es que puede polimerizarse rápidamente a temperaturas mayores de 85 °C. La acrilamida se produce industrialmente mediante la hidrólisis catalítica del acrilonitrilo; y ha sido usada desde hace 60 años en la síntesis de poliacrilamidas en diversas aplicaciones industriales como en la elaboración de plásticos, pigmentos, pegamentos y cosméticos, entre otros (Wenzl, de la Calle, & Anklam, 2003). Algunas de sus aplicaciones tecnológicas en la que se ha empleado la acrilamida ha sido para el tratamiento y clarificación de aguas residuales y también para aguas potables, y como gel en la separación de proteínas u otros compuestos de naturaleza semejante mediante el uso de electroforesis (Bethke & Bussan, 2013).



**Figura 1:** Estructura química de la acrilamida

Las características físico-químicas más relevantes que presenta la acrilamida se muestran en la Tabla 1.

Los riesgos asociados a la salud humana con la manipulación e inhalación con los monómeros de la acrilamida fueron identificados en los años de 1960's. Se descubrió que la exposición crónica en altas concentraciones del monómero de acrilamida provocaba

problemas neurotóxicos como: debilidad muscular, pérdida sensorial y ausencia de reflejos (Garland & Patterson, 1967).

**Tabla 1:** Características físico-químicas de la acrilamida (Owen, Castle , Kelly, Wilson, & Lloyd, 2005)

<b>Propiedad físico-química</b>	<b>Descripción</b>
Punto de fusión	84.5°C
Punto de ebullición	192.6°C
Solubilidad en agua	2.155 g mL <sup>-1</sup> a 30°C
pH	5.0-6.5 (solución acuosa al 50 %)

Los primeros estudios de la posibilidad de que la acrilamida pudiera ser cancerígena se llevaron a cabo entre los años de 1970-1980 cuando algunos resultados mostraron indicios de una aberración cromosómica en la médula ósea y células germinales en ratones (Shiraishi, 1978), también se descubrió la formación de tumores en ratas cuando estas fueron expuestas a la acrilamida por contacto directo o ingiriéndola (Bethke & Bussan, 2013).

Fue en los años de 1990 que se manejó la posibilidad de que los humanos estaban expuestos a la acrilamida. Fue en esta temporada que se estudiaba al N-(2-carbamoiletil) valina, un aducto que se forma entre la hemoglobina y la acrilamida, que un principio se solía ocupar como un biomarcador, que precisamente monitoreaba la exposición que se tenía a este compuesto. Sorpresivamente, el aducto anteriormente mencionado, fue hallado en individuos que no trabajaban directamente con la acrilamida (Bergmark, Calleman, & Costa, 1993). Con los resultados obtenidos se llegó a la conclusión que existían fuentes medioambientales adicionales de acrilamida.

A inicios de la década pasada Tareke et al (2000) sugirió que la acrilamida podría encontrarse en alimentos. Efectivamente dos años después descubrieron que diversos alimentos contenían altas concentraciones de este compuesto, especialmente en aquellos

que contenían altas cantidades de carbohidratos y que además fueran cocinados a altas temperaturas (Tareke, Rydeberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002).

### *1.1.1 Acrilamida en alimentos*

El procesado de los alimentos es una técnica común para mejorar la seguridad microbiológica, incrementar la calidad nutricional y reducir de manera eficaz los niveles de compuestos potencialmente tóxicos que se encuentren presentes de manera intrínseca en el alimento. El procesado térmico de alimentos es una de las técnicas que mayor aplicación ha tenido a lo largo de la historia de la humanidad, se aplica desde un nivel doméstico hasta una escala industrial.

El calentamiento de los alimentos induce cambios químicos y una gran cantidad de nuevas moléculas, varios de estos cambios son benéficos para mejorar las propiedades sensoriales, en particular el color, la textura y el sabor. Además, varios de los nuevos compuestos que se generan tienen un efecto positivo sobre la salud del consumidor, por ejemplo, actúan como antioxidantes y antimutágenos (Studer, Blank, & Stadler, 2004). Por otra parte, algunos de los compuestos formados son los denominados compuestos tóxicos inducidos por el calor, también llamados: contaminantes del procesado térmico, que exhiben en la mayoría de los casos, propiedades carcinogénicas y mutagénicas, tales como las aminas heterocíclicas, furanos, furfuralos, cloropropanoles y la acrilamida (Skog, Johansson, & Jagerstad, 1998; Crews, Brereton, & Davies, 2001).

Los alimentos procesados térmicamente como los productos de panadería, café tostado, botanas, papillas para bebé pueden contener una alta cantidad de los contaminantes del procesado térmico. Por tanto la concentración final de estos compuestos depende de la concentración inicial de los precursores químicos correspondientes, así como también, de las condiciones del proceso térmico.

Como se mencionó anteriormente, la acrilamida es un compuesto resultante del procesado térmico de los alimentos, y debido a su potencial tóxico, se estudiaron diversos alimentos para evaluar su presencia. Las papas fritas (rebanadas) fue el alimento que presentó un

mayor contenido de acrilamida dentro de todos los estudiados por Friedman (2003) (Tabla 2), seguido de papas a la francesa, galletas, hojuelas, algunos productos de panadería y café. Un aspecto muy importante que hay que resaltar es que únicamente se descubrió una alta concentración de acrilamida en productos fritos, mientras que los productos cocidos se hallaron concentraciones muy bajas de este compuesto (Keramat, LeBail, Prost, & Soltanizadeh, 2011).

Un aspecto preocupante en cuanto a los alimentos con mayor contenido de acrilamida, es que muchos de ellos tienen una alta disponibilidad en el mercado, siendo las botanas las que fácilmente pueden adquirir tanto niños como adultos. Es por ello que diversas instituciones de salud, en conjunto con la industria de botanas, han tratado de disminuir la cantidad de acrilamida en sus productos.

**Tabla 2.** Concentración reportada de acrilamida en distintos alimentos. Tomada de (Friedman, 2003)

Alimento	Concentración acrilamida ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )
Almendra asada	260
Esparrago asado	120
Productos horneados: rosquilla, pan de molde, pasteles y galletas	70-430
Cerveza, maltas y bebidas de trigo	30-70
Galletas, bizcochos	30-3200
Cereales para desayuno	30-1346
Chocolate en polvo	15-90
Café en polvo	170-351
Hojuelas de maíz	34-416
Pan de centeno	800-1200
Productos de pescado	30-39
Pan de jengibre	90-1660
Carne de res y de pollo	30-64
Sopa de cebolla y aderezos	1184
Nueces y mantequilla de nuez	64-457
Cacahuete y cacahuete cubierto	140
Semillas de girasol asadas	66
Papas horneadas	29
Papas fritas	170-3700
Papas a la francesa	200-12000
Botanas diferentes a papa	30-1915
Tacos fritos	559

Desde que aparecieron los primeros reportes de la presencia de acrilamida en alimentos térmicamente procesados, la Unión Europea (UE) en conjunto con otras instituciones como la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO) y la Organización Mundial de la Salud (OMS) y del sector industrial privado, realizaron un reporte en el año 2011 sobre la presencia de acrilamida en diversos alimentos en 31 países alrededor del mundo, el periodo de investigación comprendió del 2004-2009. El número total de los resultados analíticos fueron 12,582, de estos el 61% provenían de Europa, un 28% de Asia, un 9% era proveniente de norte América, mientras que Latinoamérica y el Pacífico contribuyeron con un 1% respectivamente; de África no se recibieron muestras (OMS, 2011).

Las concentraciones promedio halladas a nivel nacional para los Estados Unidos de Norte América (USA) se encontraron en un intervalo de 399-1202  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de papas fritas; de 159-963  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en papas a la francesa; de 169-518  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en bizcochos; de 89-459  $\mu\text{g kg}^{-1}$  para pan de centeno y galletas y de 3-68  $\mu\text{g L}^{-1}$  para el café instantáneo (OMS, 2011).

### *1.1.2 Formación de acrilamida en alimentos*

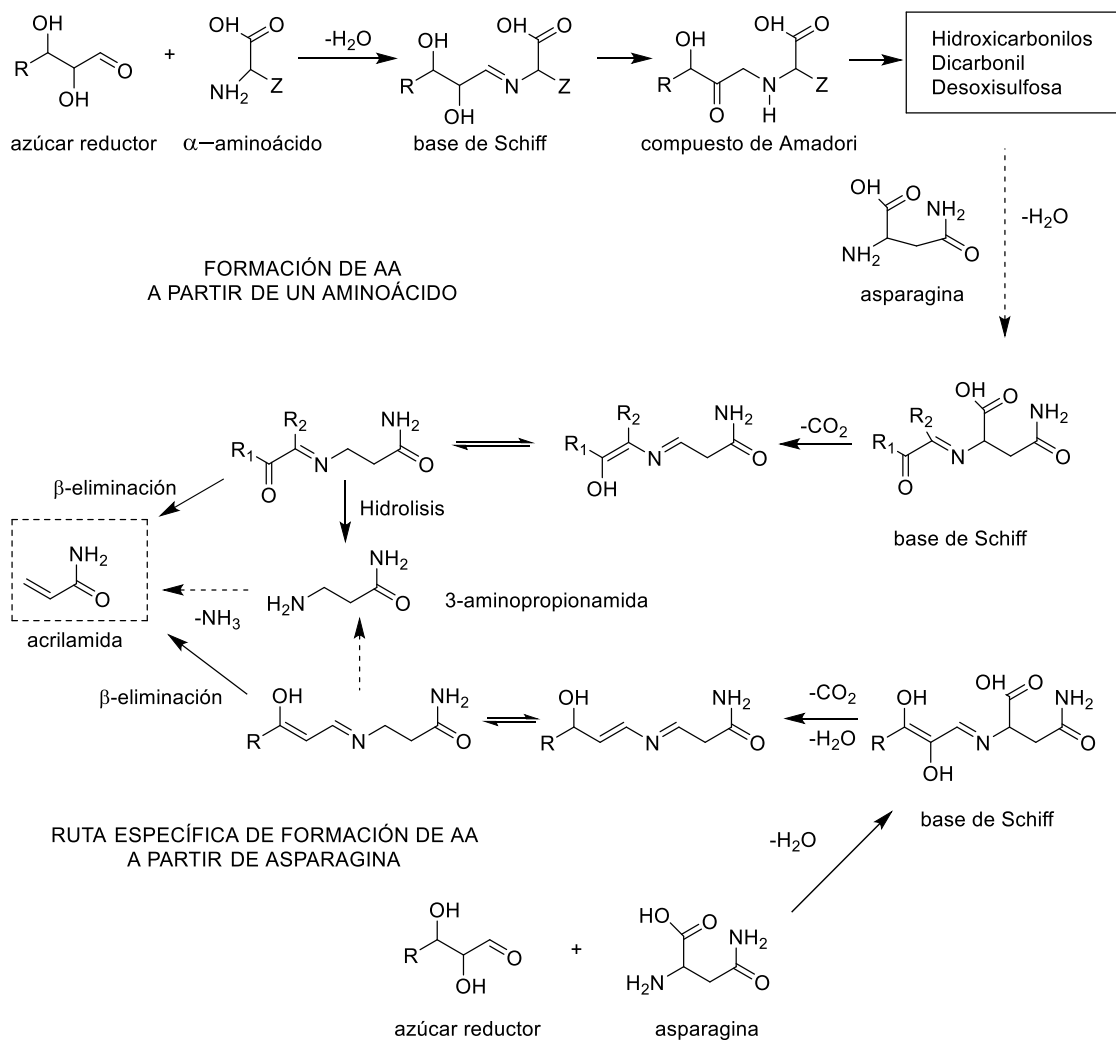
Los primeros estudios sobre la formación de acrilamida identificaron a la reacción de Maillard como la principal ruta de formación. La reacción de Maillard consiste en la interacción entre los aminoácidos naturalmente presentes en el alimento junto con los azúcares reductores (glucosa o fructosa) cuando los alimentos son calentados (Becalski, Y. Lau, Lewis, & Seaman, 2003).

La acrilamida se forma principalmente entre la interacción del aminoácido asparagina y un azúcar reductor, ambos compuestos se encuentran naturalmente en algunos materiales de origen vegetal, por ejemplo, cereales, vegetales (papas), cocoa, café, espárragos, etc. Stadler *et al.* (2002) demostraron que la asparagina estaba fuertemente involucrada en la formación de la acrilamida, para ello utilizaron un isotopo estable  $^{15}\text{N}$ -asparagina, y observaron que mas del 98% de el compuesto marcado formaba parte de la acrilamida.

Por otra parte el grupo de investigación de Mottram *et al.* (2002) propusieron la participación de las reacciones de Strecker para la formación de acrilamida, usando 2,3-butanodieno como una fuente de dicarbonilos el cual reacciona con la asparagina. Los aldehídos de Strecker se forman por una desaminación oxidativa y una descarboxilación de  $\alpha$ -aminoácidos, conducido por dioxinas.

Un aporte importante para entender la formación de acrilamida lo dieron el grupo de trabajo de Zyzak *et al.* (2003), en donde demostraron que la 3-aminopropionamida (3-APA), una amina biogéna que se forma durante la reacción de Maillard, actuaba como uno de los principales precursores de acrilamida.

En la Figura 2 se muestra de manera general la formación de acrilamida a partir de la asparagina y un azúcar y también entre un aminoácido, especialmente la asparagina y un azúcar reductor. En ambas reacciones se pueden observar la formación de una imina (base de Schiff).



**Figura 2:** Mecanismo de formación de acrilamida por vía general y específica de aminoácidos.

Una vez obtenida, la imina lleva a cabo un rearrreglo estructural que da lugar a la formación de un compuesto de Amadori; compuesto que al deshidratarse y/o fragmentarse libera un aminoácido, produciendo un conjunto de compuestos intermediarios altamente reactivos, como: dicarbonilos e hidroxycarbonilos, que reaccionan consecutivamente para llevar a cabo una segunda reacción de Maillard. También es importante resaltar que después de la descarboxilación e hidrólisis se forma el 3-APA y posteriormente de una desaminación se forma la acrilamida (Becalski, Y. Lau, Lewis, & Seaman, 2003).



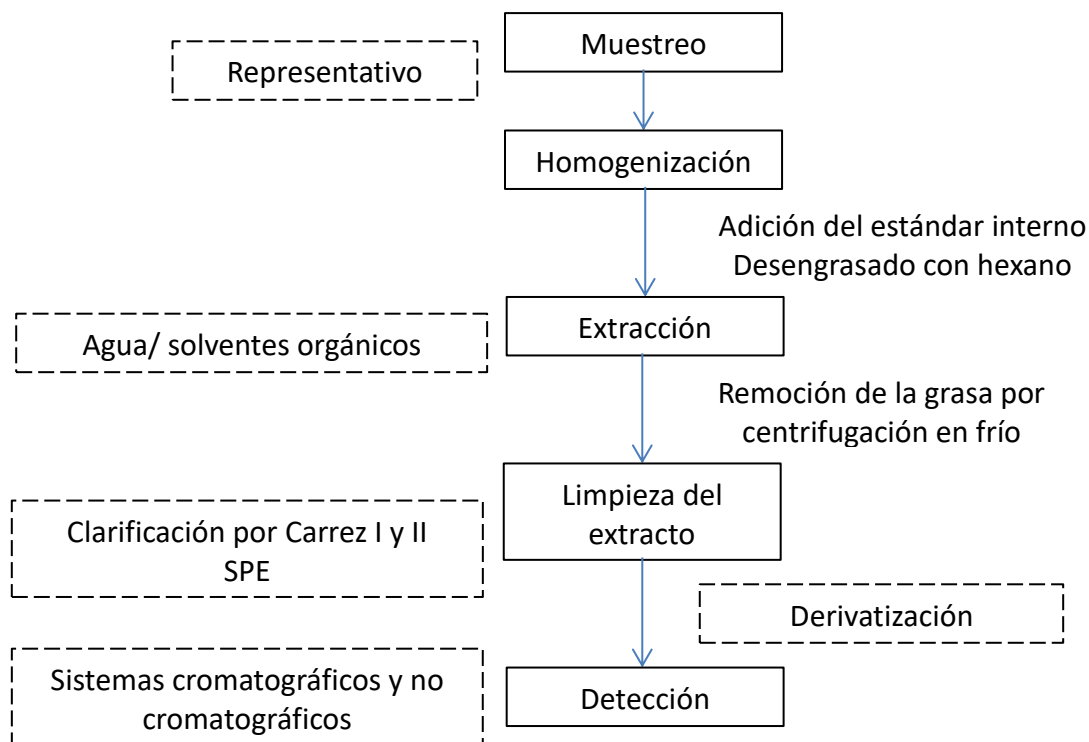
Adicionalmente existen diversos estudios que han demostrado que la formación de acrilamida se puede llevar a cabo de otros precursores diferentes a un aminoácido, como: ácido pirúvico, la acroleína o 1-propenal, ácido aspártico o por la deshidratación de  $\alpha$ -dicarbonilos, aunque estos ocurren en menor medida (Keramat, LeBail, Prost, & Soltanizadeh, 2011).

### *1.1.3 Método de análisis de acrilamida en alimentos*

Desde los primeros reportes de la formación de acrilamida en alimentos procesados a altas temperaturas, diversas autoridades internacionales, enfocaron su atención en tratar de controlar la presencia de este compuesto, pero primero fue necesario desarrollar técnicas de análisis que permitieran cuantificar de forma confiable y precisa la acrilamida. La detección y cuantificación de acrilamida en alimentos es un área de investigación intensiva, debido al reto que representa su análisis. Al observar la estructura química de la acrilamida ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ ) es evidente la limitada conjugación de sus electrones de tipo  $\pi$ , lo cual significa que este compuesto carece de un grupo cromóforo fuerte para poder detectarlo por UV (ultravioleta) y que además no presenta propiedades fluorescentes (Gökmen, 2016).

Numerosos métodos han sido desarrollados para determinar acrilamida en alimentos. La mayoría de estos métodos se basan principalmente en el uso de un detector de masas acoplado a un sistema cromatográfico, ya sea por cromatografía de líquidos (CL) o por cromatografía de gases (CG) (Kepekci Tekkli, Önal, & Önal, 2012). Esta última modalidad seguida de una derivatización del analito (Ono *et al.* 2003; Pittet, Périsset, & Oberson, 2004) y en pocas ocasiones el análisis se hace de manera directa (Tateo & Bononi, 2003). Más adelante se detallaran los alcances obtenidos por las técnicas antes mencionadas.

Debido a la diversidad de las matrices alimentarias en las que se puede encontrar la acrilamida, existen diversas metodologías para la preparación de la muestra. En la Figura 3 se puede observar de manera general los pasos que involucra el análisis de acrilamida en alimentos. De acuerdo con la naturaleza del alimento a analizar, las propiedades físicas y químicas de la acrilamida deben de ser consideradas para poder llevar a cabo el análisis de manera satisfactoria (Bethke & Bussan, 2013).



**Figura 3:** Principales pasos en el tratamiento de la muestra para el análisis de acrilamida.

#### 1.1.3.1 Muestreo y homogenización

Es bien sabido que el tratamiento de la muestra juega un papel muy importante en el análisis de acrilamida en muestras de alimentos. Por tanto, se tiene que asegurar el obtener una muestra representativa y homogénea. Se sabe que la acrilamida se genera principalmente en alimentos sólidos y específicamente en la superficie de los mismos (Friedman, 2003), por tanto no se encuentra homogéneamente distribuido en el alimento. Por ejemplo, en el caso de las papas fritas puede existir una variación en el contenido de acrilamida en papas que se encuentren más oscuras que otras después de haber sido freídas, o incluso, entre los puntos centrales de la papa y las orillas; por ello la necesidad de llevar a cabo una adecuada homogenización (Pettersson, Rosen, Turner, Danielsson, & Hellenas, 2006).

#### 1.1.3.2 Extracción

Se pueden emplear diferentes procedimientos para la extracción de acrilamida en los alimentos. Debido a su alta polaridad, este compuesto es bastante soluble en agua, en

alcoholes menores como el metanol y el etanol y en otros solventes orgánicos como el acetonitrilo, el acetato de etilo y la acetona. Este comportamiento respecto a la solubilidad, dicta la estrategia de extracción para el análisis en alimentos y en conjunto la baja volatilidad y bajo peso molecular de la acrilamida, tendrán una consecuencia directa en la medición (Pettersson, Rosen, Turner, Danielsson, & Hellenas, 2006).

El agua suele ser uno de los solventes que más se utiliza en la extracción de acrilamida. La proporción de la muestra suele ser mayor para el líquido extractante que la del alimento, ya que generalmente se utilizan de 0.5-2.0 g de muestra. En cuanto a la temperatura del extractante se puede utilizar el agua a temperatura ambiente. Owen *et al.* (2005) demostraron que no había diferencias estadísticamente significativas al utilizar agua caliente contra agua a temperatura ambiente. El utilizar agua como extractante minimiza la disolución de compuestos hidrofóbicos y además evita también la co-extracción de compuestos no deseados presentes en la matriz, y que además afectarán adversamente a la separación cromatográfica generando interferentes en la detección (Pettersson, Rosen, Turner, Danielsson, & Hellenas, 2006).

#### 1.1.3.3 Limpieza de la muestra

El proceso de limpieza de muestra generalmente involucra el uso de la solución de Carrez I (ferrocianuro de potasio) y II (sulfato de zinc), ya que se ha demostrado su efectividad en la precipitación de proteínas en extractos acuosos. Las proteínas también pueden precipitar con solventes orgánicos, como el metanol y acetonitrilo (Geng, Jiang, & Chen, 2008; Gökmen, Senyuva, Acar, & Sarioglu, 2005; Delator, Périsset, Goldmann, Riedeker, & Stadler, 2004).

Para una limpieza satisfactoria del extracto, es necesario saber la composición proximal de la muestra a analizar, para saber que interfrentes pueden estar presentes. Generalmente después de la clarificación por Carrez se recomienda hacer un proceso extra de limpieza, para remover y concentrar materiales orgánicos, que involucra el uso de la extracción en fase sólida (SPE por sus siglas en inglés), donde la fase extractante es un sólido adsorbente, (Dias Soares, Alves, Casal, Oliveira, & Oliveira Fernandes, 2010).

También las técnicas de limpieza ayudan a disminuir el denominado efecto matriz, y alcanzar límites de detección bajos en la cuantificación de acrilamida. Becalski *et al.* (2003) utilizaron una combinación de diversos cartuchos de separación: Oasis MAX (modo de intercambio aniónico), Oasis MCX (modo de intercambio catiónico), y el ENV-Carb (grafito). Aunque el cartucho más utilizado es el Oasis HLB antes del análisis cromatográfico (Zhang, Ren, & Zhang, 2009). Una variante más de la extracción en fase sólida es la micro extracción en fase sólida (Dias Soares, Alves, Casal, Oliveira, & Oliveira Fernandes, 2010).

Una vez terminado el proceso de limpieza de las muestras, algunos investigadores han reportado el procedimiento de derivatización para mejorar la señal analítica. Esta técnica, ayuda a mejorar la sensibilidad en la cuantificación de acrilamida, al hacer que la técnica sea más selectiva. Algunas técnicas de derivatización se realizan de una forma pre y post columna cuando se emplean procedimientos cromatográficos.

Aunque si bien, el pre-tratamiento de la muestra ayuda a disminuir los límites de detección, la desventaja que se tiene es que el proceso de análisis se vuelve más tardado y tedioso, además de lo relativamente costoso que puede ser. Por lo que muchas empresas de la industria de botanas no pueden aplicar estas metodologías como una técnica de análisis de rutina en el control de acrilamida en sus productos.

#### *1.1.3.4 Detección y cuantificación de acrilamida*

Para la detección de acrilamida se han desarrollado diversas técnicas, dentro de estas se pueden clasificar en métodos no cromatográficos y cromatográficos.

Los primeros, como su nombre lo indica, la detección no se hace bajo un fundamento cromatográfico. Dentro de estos podemos encontrar la técnica de electroforesis capilar (Bermudo, Moyano, Puignou, & Galceran, 2004), biosensores basados en infrarojo cercano (Ayvaz & Rodríguez-Saona, 2015) y recientemente el uso de fluorescencia basado en puntos cuánticos (Hu *et al.* 2014). Aunque si bien son métodos que podrían simplificar la detección de acrilamida aún no se encuentran reconocidos como métodos oficiales para

la detección de acrilamida, además de que en algunos casos se necesita de personal calificado para poder realizar la técnica.

Por otra parte, los métodos cromatográficos para el análisis de acrilamida se pueden dividir en dos: cromatografía de gases (Notardonato, Avino, Centola, Cinelli, & Ruso, 2013) y cromatografía de líquidos (Jessuzek & Schieberle, 2003). Ambas metodologías cuentan con grandes resultados en la detección de acrilamida a concentraciones de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y dependiendo del detector que se empleó la sensibilidad puede disminuir aún mas (Bethke & Bussan, 2013). Dentro de las dos técnicas, la cromatografía de líquidos es la más ampliamente usada, debido a la relativa facilidad con la que se puede llevar a cabo.

#### *1.1.3.4.1 Cromatografía de gases*

En la cromatografía de gases se hace pasar el analito en forma gaseosa a través de una columna (fase estacionara), arrastrado por un gas (fase móvil); también llamado gas portador, para finalmente ser analizado mediante diferentes detectores propios de este sistema, tales como: detector de conductividad térmica, detector de ionización de llama, detector de captura electrónica o espectrometro de masas (MS) ( (Harris, 2010). Para el análisis de acrilamida mediante cromatografía de gases se han reportado técnicas que implican una derivatización química y otras donde no se aplica.

Una de las primeras técnicas de derivatización aplicada a cromatografía de gases fue la bromación, esto con la finalidad de obtener un compuesto altamente volátil para el análisis e incrementar la selectividad del método. La técnica se basa en el uso del bromuro y bromato de potasio y para su detección se empleó la espectrofotometría de masas (Tareke , Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Tornqvist, 2000). Otro método reportado consistió en derivatizar a la acrilamida mediante el proceso de sililación, se utiliza como agente derivatizante soluciones de N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) en presencia de acetonitrilo, que al reaccionar con la acrilamida da lugar al compuesto volátil N,O-bis(trimetilsilil)acrilamida (BTMSA), utilizando un detector de masas (Lagalante & Felter , 2004).

Las técnicas basadas en cromatografía de gases que no involucran una derivatización se basan en extracciones con agua y solventes orgánicos como el n-propanol o 2-butanona, para después limpiar la muestra mediante micro-extracción en fase sólida y extracción en fase sólida (Wenzl, de la Calle, & Anklam, 2003). Sin embargo, la preparación de la muestra es laboriosa, y conforme a la complejidad de la matriz analítica se puede volver más complicado. Los alcances de esta técnica se presentan en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Análisis de acrilamida por cromatografía de gases

Estándar interno	Columna	Condición de separación	Derivatización	Detector	LOD/LOQ	[Ref]
[D <sub>3</sub> ]-acrilamida	Columna capilar INNOW 30mx0.25mm	70°C (1 min) aumentado 20 °C min <sup>-1</sup> hasta 240 °C (10.5 min). Gas portador He, 1.0 mL min <sup>-1</sup> . Inyección 1 µL sin división.	Sin derivatización	CG-MS	5 y 13.3 µg kg <sup>-1</sup> / 15y 40 µg kg <sup>-1</sup>	Dunovska et al. 2006
N,N-Dimetilacrilamida	Columna HP PAS 1701 25 m x 0.25mm	65 °C (i min) aumentado 25 °C min <sup>-1</sup> hasta 250 °C (10 min). Inyección 2 µL sin división	Bromación	CG-MS	5 µg kg <sup>-1</sup> / 15 µg kg <sup>-1</sup>	Tereke et al. 2000
[ <sup>13</sup> C3]-acrilamida	Columna HP INNOWAX 30 m x 250 µm	80-280 °C (10°C min <sup>-1</sup> ), isotérmico por 13 min. Inyección 1 µL sin división	Sin derivatización	CG-MS	15 µg kg <sup>-1</sup> / 50 µg kg <sup>-1</sup>	Serpen & Gökmen, 2007

<b>Matriz</b>	<b>Extracción y limpieza</b>
Papas fritas y cereales	Muestra: 3 g, 3.5 mL de agua. Tratamiento: Ultrasonido (30 min).n-propanol, centrifuga, evaporar, reconstituir. Extracción: sorbente PSA:
Alimentos ricos en proteínas y carbohidratos	Muestra: 10 g, 100 mL de agua. Tratamiento: homogenizar y centrifugar. Extracción: extracción en fase sólida.
Papas fritas	Muestra: 2g, 20 mL MeOH. Tratamiento: Clarificación Carrez I y II, centrifugación y desgrasado con hexano. Filtrar

#### 1.1.3.4.2 Cromatografía de líquidos

La metodología más popular para la detección de acrilamida con fines de análisis de rutina y estudios de investigación ha sido la cromatografía líquida acoplada con espectrometría de masas, y en particular acoplado con espectrometría de masas en tándem (LC-MS/MS). En éste método, la acrilamida se extrae del alimento con agua después de usar acrilamida deuterada como estándar interno, para después llevar a cabo el proceso de limpieza mediante la extracción en fase sólida. El alcance de cuantificación de esta metodología en el análisis de papas fritas y algunos cereales se encuentra entre 30-100,000  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Rosén & Hellenäs, 2002).

Existen una diversidad de metodologías basadas en esta técnica, pero el método de limpieza de la muestra dictamina los resultados que se pueden obtener, y generalmente en las técnicas de limpieza de la muestra se suele utilizar la extracción en fase sólida e incluso en algunos casos el uso de doble cartucho de extracción (Wenzl *et al.* 2006). De la misma forma que en cromatografía de gases en la cromatografía de líquidos al acoplarla a detectores de masas, los límites de detección (LOD) y los límites de cuantificación (LOQ) suelen ser bajos (Tabla 4). No obstante una de las principales desventajas de este método es su poca disponibilidad en un gran número de laboratorios enfocados a análisis de rutina de contaminantes en alimentos (Martinez, Rodríguez, Bautista, Rangel-Vargas, & Santos, 2018).

Debido a lo anterior se han buscado estrategias que permitan la detección de acrilamida con detectores convencionales en la cromatografía de líquidos. Por ejemplo, para el análisis de acrilamida y metacrilamida se propuso HPLC con detección UV (Paleologos &

Kontominas, 2005). La cantidad que llegaron a detectar luego de añadir acrilamida a muestras de papas fritas fue de  $853.8 \pm 0.9 \mu\text{g kg}^{-1}$  que si se compara con las concentraciones halladas en alimentos pues no es especialmente bueno. Otro estudio que se realizó por HPLC usando un detector de arreglo de diodos permitió cuantificar concentraciones de  $20 \mu\text{g kg}^{-1}$  (Gökmen, Senyuva, Acar, & Sarioglu, 2005).

Wang *et al.* (2008) emplearon una extracción con agua y pretratamiento con cartuchos de extracción en fase sólida y un detector de arreglo de diodos, con ello lograron alcanzar un

**Tabla 4:** Análisis de acrilamida por cromatografía de líquidos

Estándar interno	Columna	Condición de separación	Detector	LOD/LOQ	[Ref]
[D <sub>3</sub> ]-acrilamida o [1 <sup>3</sup> C <sub>3</sub> ]-acrilamida	Columna Hypercarb 50 x 2.1 mm	Fase móvil: 15% MeOH en formato de amonio 1mM. Flujo: 0.175 mL min <sup>-1</sup> inyección: 5-10 µL a 28 °C	CL-MS/MS	6 µg kg <sup>-1</sup> 18 µg kg <sup>-1</sup>	15y Becalski <i>et al</i> 2003
[1 <sup>3</sup> C <sub>3</sub> ]-acrilamida	Columna Atlantis T3. 150 mmx 4.6 mm	Fase móvil: ácido fumárico 10 mM. 0.3 mL min <sup>-1</sup> , 25°C	CL-MS	5 µg kg <sup>-1</sup> µg kg <sup>-1</sup>	Gókmén <i>et al.</i> 2009
D <sub>3</sub> ]-acrilamida	Columna Atlantis C <sub>18</sub> 150 mmx 4.6 mm	Fase móvil : H <sub>2</sub> O 92% (0.1% HAc) y 8% H <sub>2</sub> O/MeOH. .015 mL min <sup>-1</sup>	CL-MS/MS	15 µg kg <sup>-1</sup>	Mestagh <i>et al.</i> 2004
[1 <sup>3</sup> C <sub>3</sub> ]-acrilamida	Fase móvil: 0.5% MeOH, 0.1%	Fase móvil : 0.5% MeOH, 0.1% HAc en agua. Flujo:0.2 mL min <sup>-1</sup> . Inyección : 20 µL . 10 min	CL-ESI-MS/MS	10 µg kg <sup>-1</sup> µg kg <sup>-1</sup>	Roach <i>et al.</i> 2003

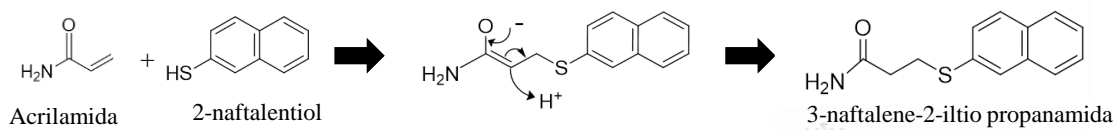


Matriz	Extracción y limpieza
Papas fritas, cereales, pan y café	Muestra: 16 de muestra, 80 mL H <sub>2</sub> O, 10 mL CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . Tratamiento: Mezclar, centrifugar. Extracción: Cartuchos Oasis (SPE) Max y Mcx
Papas fritas, pan tostado, galletas	Muestra: 1g, 9 mL ácido fumárico, (10mM) o MeOH. Tratamiento: Carrez I y II. Centrifuga. Extracción : Cartuchos SPE Oasis MCX
Papas a la francesa	Muestra: 1 g, hexano 10 mL. Tratamiento: Agitar, centrifugar. Extracción: SPE cartuchos Oasis HLB
Papas fritas, migas de pan y café	Muestra: 1g, 9 mL H <sub>2</sub> O. tratamiento: mezclar y centrifugar. Extracción: cartuchos SPE Oasis HLB

LOD de 20 µg kg<sup>-1</sup>, aunque no especifica concretamente para que matriz alimentaria debido a que analizó distintos alimentos que se comercializan en China, entre ellos papas fritas.

Un estudio realizado por Jezussek & Schieberle (2003) realizaron un análisis mediante la derivatización de la acrilamida usando un tiol (-SH) como agente derivatizante, el compuesto que utilizaron fue el ácido 2-mercaptobenzoico en presencia de hidróxido de sodio (NaOH), que al reaccionar forma un tioéter que fue detectado por un detector de masas, pero también tenía la ventaja de poder ser analizado por un detector convencional, debido a que el compuesto resultante de la derivatización presenta un grupo cromóforo.

El uso de tioles ha sido una técnica que ha sido reportada como una adición nucleofílica del tipo Michael, donde los tioles pueden reaccionar fácilmente con el enlace vinílico de la acrilamida. La reacción consiste en un ataque nucleofílico sobre la región donde los electrones son escasos, con ello se genera una fuerte base enolato, que es responsable de la desprotonización del tiol, produciendo un anión tiolato. Una vez que se forma el tiolato, el proceso de cadena anionica, genera un producto estable tioleno (Hu *et al.* 2014). El mecanismo de reacción se muestra en la Figura 4.



**Figura 4.** Mecanismo de reacción entre la acrilamida y un tiol (2-naftalentiol).

Es por ello que el presente trabajo está basado en la búsqueda de una alternativa viable en el proceso de derivatización aplicando como agente derivatizante al 2-naftalentiol, ya que además de ser un reactivo de bajo costo y soluble en agua a pH básico presenta propiedades fluorescentes. De acuerdo a Hara *et al.* (2000) reportaron que el 2-naftalentiol mostró excelentes resultados como agente derivatizante en la cuantificación de busulfan en suero humano. Así en el presente trabajo se buscó optimizar la reacción de derivatización entre la acrilamida y el 2-naftalentiol para la aplicación de análisis de rutina en papas fritas.

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1 Reactivos

Se utilizó la acrilamida, ácido acrílico y 2-naftalentiol obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Misuri, USA). Los disolventes como el ácido acético y acetonitrilo (grado HPLC) fueron adquiridos de la casa comercial J.T. Baker (Filisburgo, Nueva Jersey, E.U.A) mientras que el hexano fue obtenido de REASOL (Ciudad de México, CDMX, México). Para el análisis de papas se analizaron nueve marcas que son comercializadas regularmente en la ciudad de Pachuca (Hidalgo, México) y cada análisis se realizó por triplicado.

### 1.2.2 Reacción de derivatización entre el 2-naftalentiol y la acrilamida.

La derivatización de la acrilamida y el 2-naftalentiol se basó en la metodología reportada por Hara *et al.* (2000) con algunas modificaciones. La metodología fue la siguiente: En un tubo Schlenk, se colocaron 100 mg del 2-naftalentiol (0.62 mmoles) junto con 22 mg de acrilamida (0.31 mmoles), después se colocaron 30 mL de etanol junto con 3 mL de NaOH (1.0 M). Esta mezcla se calentó a 70 °C por una hora y después el solvente se evaporó a sequedad aplicando una corriente de aire. El sólido obtenido se lavó con cloroformo (5x2 mL). La fase líquida se evaporó nuevamente a sequedad con la aplicación de calor y el precipitado resultante se analizó por infrarrojo y resonancia magnética de protón (CDCl<sub>3</sub>).

### 1.2.3 Análisis por FT-IR y <sup>1</sup>H-RMN

El espectro infrarrojo se obtuvo utilizando un espectrofotómetro marca Perkin-Elmer Frontier (Waltham , Masachussets, E.U.A), mientras que para el espectro de resonancia se utilizó un espectrómetro Varian Mercury-300 de 300 MHz (Santa Clara, California, E.U.A) utilizando CDCl<sub>3</sub> como disolvente.

### 1.2.4 Optimización de la derivatización

Para la optimización de la reacción de la acrilamida y el 2-naftalentiol se aplicó un diseño central composite, utilizando un diseño de superficie de respuesta. Se evaluaron 3 factores: la temperatura (X<sub>1</sub>): 63.2-96.8 °C, el tiempo de reacción (X<sub>2</sub>): 4.8-55.2 min y la

concentración del derivatizante 2-naftalentiol ( $X_3$ ): 0.6-7.3 mM. Estos valores fueron seleccionados de acuerdo a experimentaciones previas. Los resultados obtenidos fueron analizados por medio del software MINITAB V15.1. La matriz del diseño se muestra en la Tabla 5.

**Tabla 5.** Matriz del diseño experimental central compuesto:  $X_1$ : temperatura ( $^{\circ}\text{C}$ ),  $X_2$ : tiempo (min) y  $X_3$ : derivatizante (mM).

Experimento	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	80.0	30.0	0.5
2	80.0	30.0	0.5
3	70.0	15.0	0.3
4	63.18	30.0	0.5
5	80.0	55.2	0.5
6	80.0	30.0	0.5
7	80.0	30.0	0.1
8	80.0	30.0	0.5
9	70.0	15.0	0.70
10	90.0	15.0	0.3
11	90.0	15.0	0.7
12	90.0	45.0	0.3
13	96.8	30.0	0.5
14	80.0	30.0	0.5
15	80.0	30.0	0.8
16	70.0	45.0	0.3
17	80.0	4.7	0.5
18	80.0	30.0	0.5
19	90.0	45.0	0.7
20	70.0	45.0	0.7

La variable de salida de respuesta que se midió fue la relación de áreas entre la acrilamida y el ácido acrílico (estándar interno). Las concentraciones empleadas fueron de  $500 \mu\text{g kg}^{-1}$  y  $600 \mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Todos los compuestos fueron disueltos en agua desionizada.

#### 1.2.5 Tratamiento de las muestras para el análisis

El tratamiento de muestras consistió primeramente en la homogenización de la muestra a un tamaño de partícula menor a 1 mm, después se tomaron 3 g de muestra homogenizada y se mezcló con 30 mL de agua desionizada ( $40^{\circ}\text{C}$ ). La mezcla se agitó mecánicamente

durante 5 min y después se centrifugó a 2500 rpm por un tiempo de 15 min a 20 °C. El sobrenadante (aproximadamente 90 mL) se filtró (papel filtro Whatman 2), para después desengrasarlo con 30 mL de hexano y nuevamente se centrifugó en las mismas condiciones anteriormente mencionadas. La fase acuosa se separó y después se filtró utilizando una membrana de celulosa (tamaño de poro, 0.45 µm). De la solución filtrada se tomaron 7.5 mL y se mezclaron con 1 mL de una solución de 2-naftalentiol (62 mM) previamente disuelto en 9 mL de acetonitrilo y 1 mL de NaOH (1 M). La mezcla se calentó a 90 °C por 45 min (condiciones óptimas). La reacción se detuvo con la adición de 1.5 mL de ácido acético (1% v/v). La solución se centrifugó a 2500 rpm por 15 min.

La concentración de acrilamida en la muestra se determinó mediante curvas de calibrado por adición estándar, por lo que cada muestra fue dopada con las siguientes concentraciones de acrilamida: 300, 500 y 800 µg kg<sup>-1</sup>.

#### *1.2.6 Condiciones de separación por HPLC*

Para la determinación cromatográfica se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos marca Agilent Technologies 1260 Infinity (Agilent Technologies, Alemania) equipado con un detector de fluorescencia, utilizando una longitud de onda de emisión de 250 nm y de excitación de 362 nm. La inyección fue manual utilizando un “loop” de 20 µL. La fase estacionaria consistió en una columna C-8 ZORBAX eclipse XDB (5µm; 150mm x 4.26 de diámetro interno). La fase móvil consistió en una mezcla 50:50 de ácido acético (1% v/v) y acetonitrilo. El flujo de separación fue de 0.8 mL min<sup>-1</sup>.

#### *1.2.7 Validación de la técnica analítica*

Para medir la exactitud del método propuesto se realizaron estudios de recuperación dopando una muestra de papas por triplicado en tres niveles de concentración de acrilamida (200,300, 500 µg kg<sup>-1</sup>) comparada con la cantidad encontrada en la muestra (Albishiri & El-Hady, 2014).

El ensayo de precisión se investigó con respecto a la repetitividad (intra-día) y la repetitividad (inter-día). Al dopar la muestra con acrilamida a las mismas concentraciones

descritas para la exactitud. La precisión fue expresada como el porcentaje de desviación estándar relativa (% DER).

#### *1.2.8 Análisis de muestras*

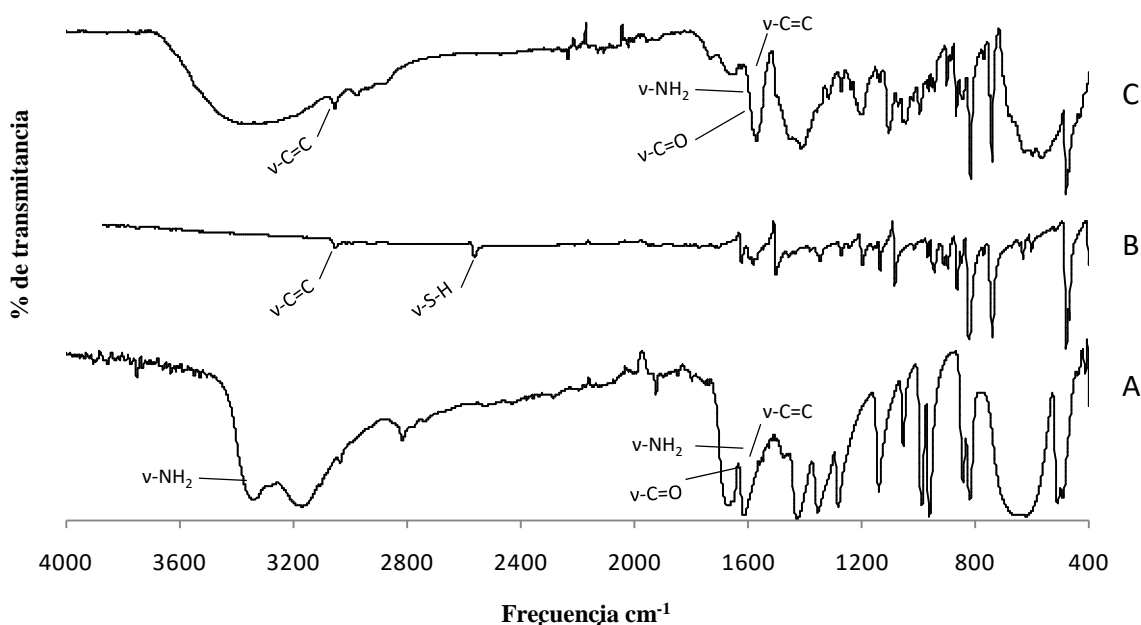
Se analizaron un total de 9 muestras de papas fritas de diferentes marcas que generalmente se comercializan en la ciudad de Pachuca, Hidalgo, México.

### 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 1.3.1 Síntesis de la acrilamida derivatizada con el tiol

El método realizado en esta investigación se basó en una nueva metodología de derivatización utilizando el 2-naftalentiol como agente derivatizante. Con la finalidad de caracterizar el producto resultante de la reacción se realizaron espectros de infrarrojo para cada uno de los reactivos y del producto participantes en la síntesis (Figura 5). El espectro infrarrojo de la acrilamida (Figura 5A) se pueden observar las bandas de absorción correspondientes a los modos simétricos y asimétricos, del  $\nu$ -NH<sub>2</sub> presente en la acrilamida, a una frecuencia de 3338 y 3118 cm<sup>-1</sup>. En una frecuencia de 1606 cm<sup>-1</sup> y 1663 cm<sup>-1</sup> se encuentran las bandas características de las amidas primarias. En 1663 cm<sup>-1</sup> se atribuyen a las vibraciones de los grupos C=C, C=O y NH<sub>2</sub> (Sundaraganesan, Puviarasan, & Mohan, 2001; Davies, 1961)

El espectro infrarrojo del tiol (Figura 4B) presenta la banda de absorción en 2553 cm<sup>-1</sup> que corresponde a la  $\nu$  (S-H), mientras que las bandas que se tienen en las frecuencias de 1583 cm<sup>-1</sup> y 1623 cm<sup>-1</sup> corresponden a las tensiones  $\nu$  (C=C) que conforman el hidrocarburo cíclico. El producto de la reacción de derivatización entre la acrilamida y el tiol fue el 3-(naftalen-2-iltio) propanamida. Al analizar su espectro (Figura 5C) se puede observar que la banda correspondiente al  $\nu$ -(S-H) presente en el tiol desapareció, mientras que la intensidad de banda correspondiente a la  $\nu$ -C=C situada en la frecuencia de 1663 cm<sup>-1</sup> disminuyó, lo cual indica que la reacción de derivatización se llevó a cabo entre el tiol y el doble enlace de la acrilamida.

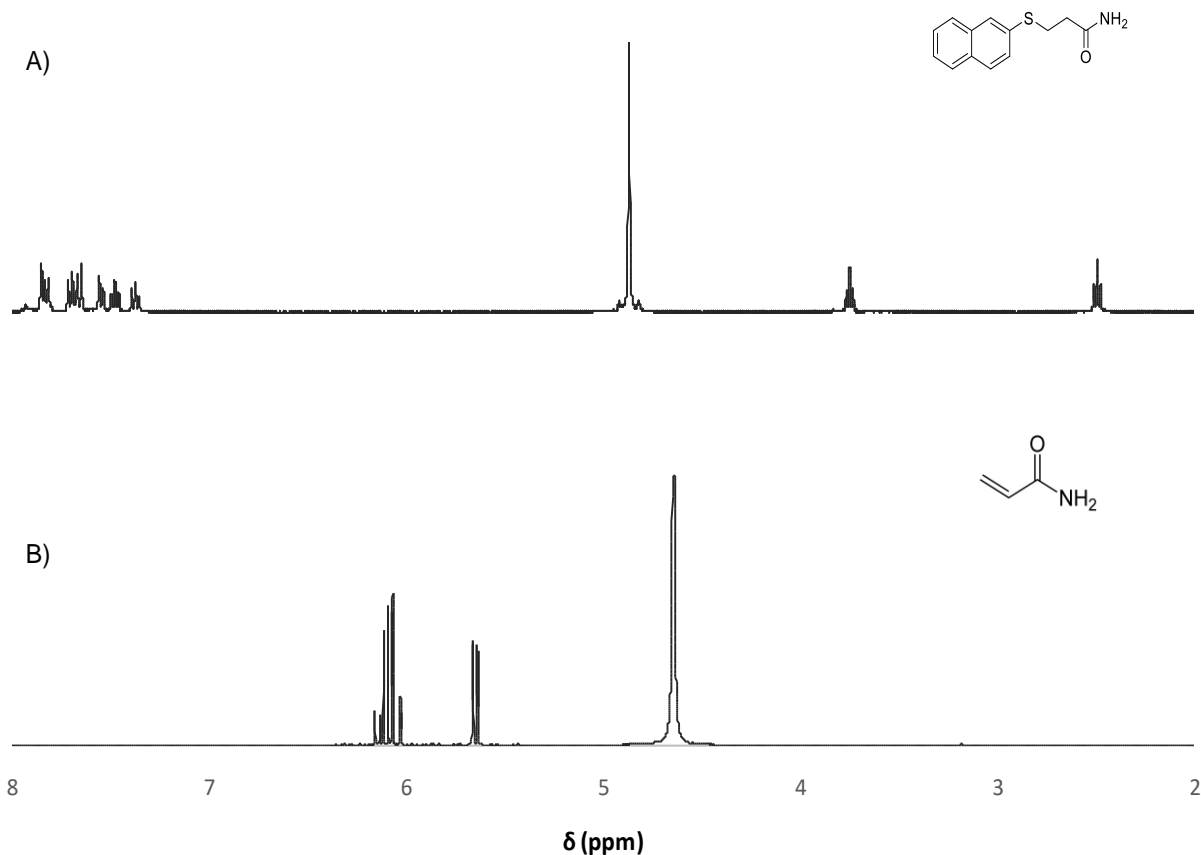


**Figura 5:** Espectros infrarrojos: A) Acrilamida; B) tiol y C) 3-(naftalen-2-iltio) propanamida

El compuesto resultante de la derivatización también se caracterizó mediante  $^1\text{H}$ -RMN (Figura 6A). En el espectro obtenido se puede observar las señales correspondientes a los protones de los carbonos alifáticos de la molécula. Una señal triple que aparece en un desplazamiento de 2.5  $\delta$  (ppm) corresponde al protón del carbono adyacente al grupo amida, mientras que la señal triple que aparece en el desplazamiento de 3.8  $\delta$  (ppm) pertenece al protón del carbono adyacente al átomo de azufre. Las señales que aparecen entre 7-8 (ppm) corresponden a los protones que están presentes en la estructura cíclica. En el espectro de resonancia de la acrilamida (Figura 6B) se pueden observar las señales características al enlace vinílico en los desplazamientos 5.7  $\delta$  (ppm). Si se compara el espectro de la acrilamida y el espectro del 3-(nafatlen-2-iltio) se puede observar que las señales del enlace vinílico de la acrilamida no se encuentran en el espectro del 3-(nafatlen-2-ylthio). El resultado obtenido reveló que el 2-naftalentiol se unió al carbono  $\beta$  del doble enlace de la acrilamida. La multiplicidad de las señales confirman que la reacción de ataque nucleofílico del tipo Michael, donde el doble enlace de la acrilamida reacciona debido a



que es altamente electrofílico. Dicha reacción ha sido descrita por otros autores por la interacción del grupo SH de la D-cisteína, homocisteína, glutatión y el ácido 2-mercaptobenzoico (Friedman, 2003; Zhou, *et al.*, 2015; Stadler & Studer, 2015; Hyung-Hee & Ho-Sang, 2014)



**Figura 6:** Espectro de de resonancia <sup>1</sup>H-RMN: a) acrilamida derivatizada “3-(naftalen-2-iltio) propanamida”; b) acrilamida

### 1.3.2 Optimización de la reacción de derivatización

Como se mencionó anteriormente se aplicó un diseño central compuesto para la optimización de la reacción de derivatización. En la Tabla 6 se muestra la matriz empleada así como los valores obtenidos del contenido de acrilamida. Durante el proceso de optimización se llevaron a cabo 20 experimentos ( $k = 3$ ,  $n = 6$  y  $\alpha = 1.68$ ). La variable de respuesta que se empleó fue la relación de áreas entre la acrilamida y el ácido acrílico

(AA/EI), este último fue empleado como estándar interno, se buscó que la relación de dichas áreas fuera la máxima.

**Tabla 6:** Matriz experimental del diseño central compuesto y las respuestas obtenidas

Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Relación de áreas (AA/EI)
1	1	-1	1	0.95
2	0	0	0	0.92
3	1	1	1	1.33
4	0	0	0	0.71
5	0	0	0	0.99
6	-1	1	-1	0.87
7	1.68	0	0	0.62
8	1	-1	-1	0.32
9	-1	-1	-1	0.00
10	0	0	1.68	1.28
11	-1	1	1	0.46
12	0	0	-1.68	0.00
13	0	-1.68	0	0.00
14	0	0	0	0.91
15	-1	-1	1	0.81
16	0	0	0	0.97
17	1	1	-1	0.79
18	-1.68	0	0	0.00
19	0	0	0	0.82
20	0	1.68	0	0.82

Códigos: X<sub>1</sub>: temperatura (-1.68: 63.2 °C; -1:70.0 °C; 0: 80.0 °C; 1: 90.0 °C; 1.68:96.8°C), X<sub>2</sub>: tiempo (-1.68: 4.8 min; -1: 15 min; 0: 30 min; 1: 45 min; 1.68: 55.2 min), X<sub>3</sub>: concentración del 2-naftalentiol (-1.68: 0.6 mM; -1:2.0 mM; 0: 4.0 mM; 1:6.0 mM; 1.68: 7.4 mM)

De acuerdo con los resultados obtenidos, se consideró un modelo de ajuste cuadrático, con un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.825, este valor obtenido indica que un 82.5% de la variabilidad en la respuesta de salida puede ser explicado con el modelo propuesto. La ecuación 1 corresponde a la superficie de respuesta utilizada, donde “y” es la variable de respuesta (AA/EI).

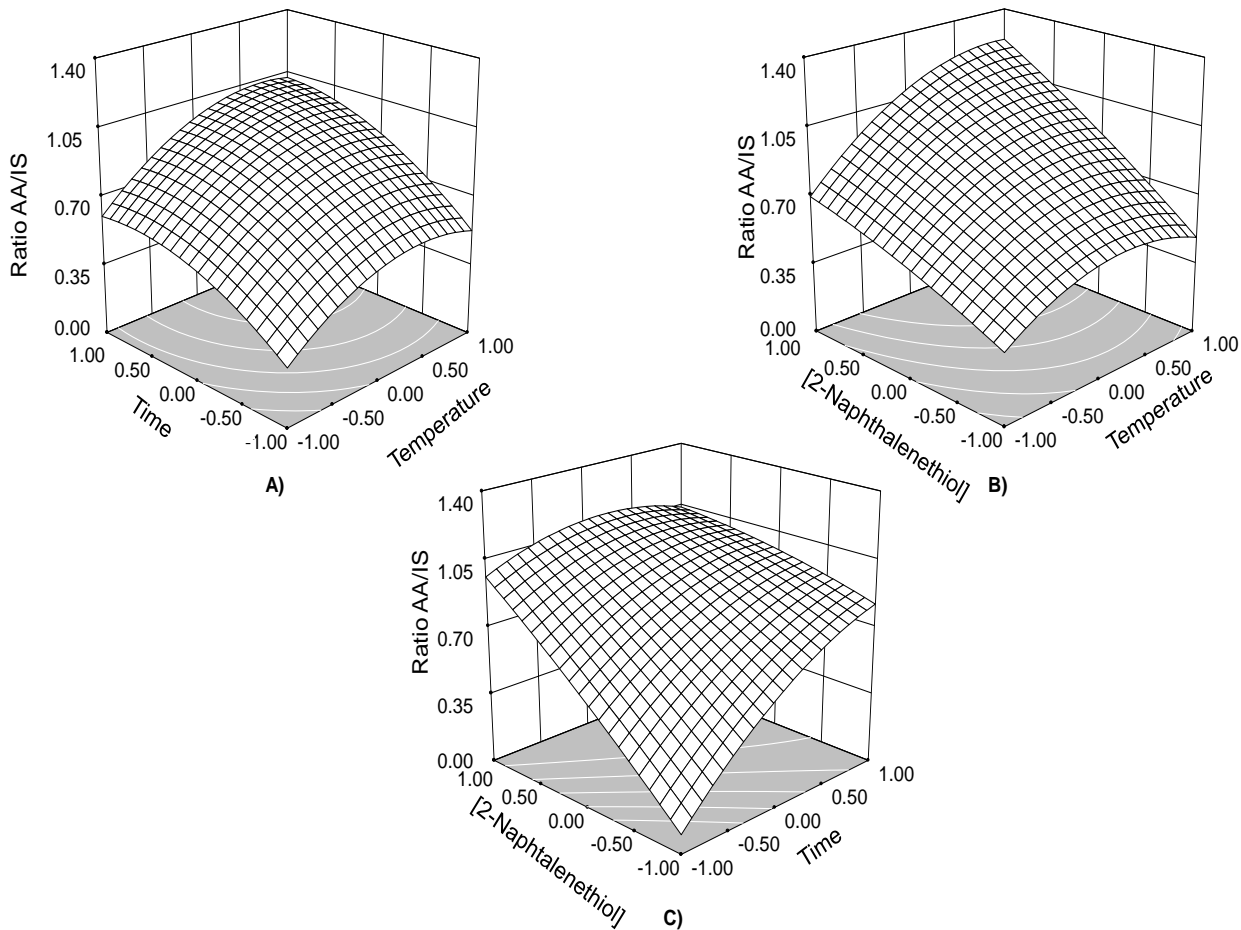
*Ecuación 1:*

$$Y=0.882+0.167X_1+0.204 X_2+0.272 X_3+0.149X_1^2-0.113 X_2^2-0.031 X_3^2+0.042 X_1X_2+0.096 X_1X_3-0.164 X_2X_3$$

De acuerdo a los coeficientes de la ecuación de la superficie de respuesta, el factor que mostró una mayor influencia en la respuesta fue la concentración del 2-naftalentiol ( $X_3$ ), seguido del tiempo ( $X_2$ ). La interacción de ambos factores es relevante en la reacción de derivatización. Este comportamiento ha sido observado en otras investigaciones donde se han empleado procedimientos de derivatización. Notardonato *et al.* (2013) reportaron que al usar altas temperaturas la reacción de derivatización de la acrilamida con el ácido trifluoracético mostró un mayor rendimiento en la reacción, mientras que, Hara *et al* (2000) reportaron que a altas temperaturas y una mayor concentración del 2-naftalentiol como agente derivatizante favorecían la reacción de derivatización además que las propiedades fluorescentes de este compuesto aumentaban. Este comportamiento se puede observar claramente en la Figura 7 B) y C). Donde el efecto de la concentración del agente derivatizante es evidente.

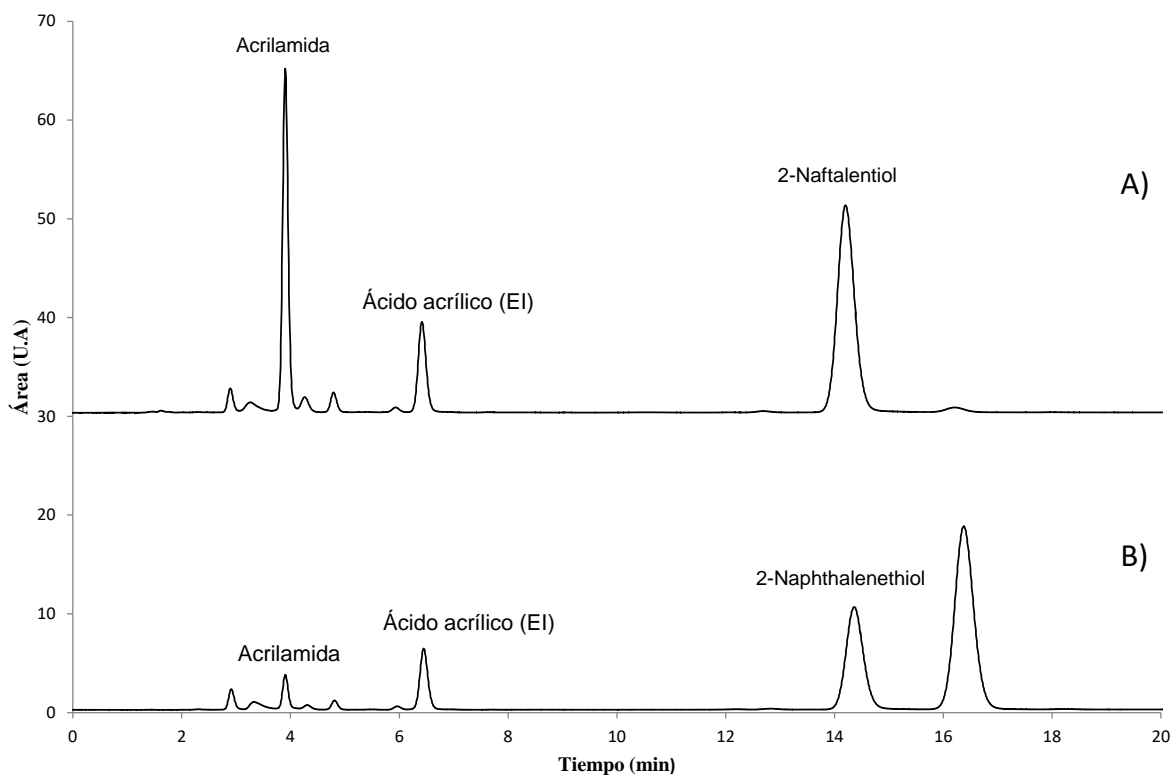
A partir de los resultados obtenidos se llegaron a las condiciones óptimas de la reacción de derivatización, las cuales fueron las siguientes: temperatura de reacción 90 °C, un tiempo de reacción de 40 min y por último la concentración del 2-naftalentiol fue de 7.3 mM. Para comprobar la validez de los parámetros óptimos, se calculó la respuesta teórica usando la ecuación cuadrática (ecuación 1), de ella se obtuvo un valor de 1.42 y fue comparada con la respuesta obtenida de manera experimental bajo las condiciones óptimas, obteniéndose de esta última un valor de 1.40.

Los cromatogramas correspondientes al proceso de optimización se muestran en la Figura 8, donde se compara la señal de las condiciones óptimas de derivatización contra la respuesta más baja detectada (Experimento 8). En la Figura 8 A), se puede observar una adecuada resolución de la acrilamida derivatizada y sin ninguna interferencia de compuestos presentes en la matriz analítica. Una vez que los parámetros de optimización de la reacción de derivatización quedaron establecidos, se procedió a llevar a cabo la validación del proceso de derivatización para después analizar las muestras de papas fritas.



**Figura 7:** Gráficas de superficie de respuesta para cada factor. A). Relación entre la temperatura y el tiempo de reacción. B). Relación entre la temperatura y la concentración del 2-naftalentiol. C). Relación entre el tiempo de reacción y la concentración del 2-naftalentiol.

Debido a que la acrilamida es un compuesto de bajo peso molecular, polar e hidrofílica y que además la concentración en la que se encuentra en las papas fritas se halla en el orden de  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Ferrer-Aguirre, Romero-González, Martínez-Vidal, & Garrido-Frenich, 2016), el proceso de limpieza y extracción se vuelve un paso crucial en el análisis de este compuesto. Por esta razón, se empleó una extracción líquido-líquido con hexano previo al análisis con la finalidad de remover la mayor cantidad de compuestos no polares presentes en la muestra. Al momento, no se ha reportado una técnica de tratamiento de la muestra como la que en este trabajo se describe.



**Figura 8:** Cromatogramas obtenidos durante el proceso de optimización. A) condiciones óptimas. B) Condiciones del experimento 8. EI estándar interno.

En la mayoría de las técnicas de HPLC reportadas para el análisis de acrilamida en papas donde no usan un detector de masas, se basan en el uso de cartuchos de extracción en fase sólida como método de preconcentración y limpieza, esto con la finalidad de poder alcanzar límites de detecciones bajos (Wang, Lee, Shuang, & Choi, 2008) y además remover todos los posibles interferentes presentes en la muestra, aunque uno de los inconvenientes es que se pueden presentar son pérdidas del analito debido a la manipulación adicional de la muestra. Es por ello, que en este método propuesto, no son necesarios tratamientos adicionales en la manejo de la muestra fuera de realizar la remoción de la grasa, con esto se lograba reducir el tiempo de análisis de la muestra.

### 1.3.3 Validación del método analítico.

Con la finalidad de obtener los parámetros analíticos, se evaluó la linealidad de la técnica analítica utilizando la metodología de adición estándar. Las muestras fueron dopadas con distintas concentraciones de acrilamida (300-800  $\mu\text{g kg}^{-1}$ ), y la concentración se calculó por la intersección en el eje de las x de la línea de regresión. Los resultados analíticos obtenidos se muestran en la Tabla 7, los límites de detección (LOD) y cuantificación (LOC) fueron calculados de acuerdo a lo reportado por Miller & Miller (2010). De acuerdo a los resultados mostrados se puede observar que se obtuvo un coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de 0.994.

**Tabla 7.** Parámetros analíticos obtenidos del análisis de acrilamida en papas fritas.

Parámetro	Valor
Intersección, $b_0 \pm t_s$ ( $b_0$ )	6.6 $\pm$ 26.6
Pendiente $b_1 \pm t_s$ ( $b_1$ )	0.22 $\pm$ 0.07
Límite de detección ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ de papa frita)	129
Límite de cuantificación ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ de papa frita)	388
Coefficiente de correlación ( $r^2$ )	0.994

El valor de LOD corresponde a un valor de 0.013  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (concentración en el extracto acuoso de la papa) y es comparable con lo reportado por Liu *et al.* (2014) quien obtuvo un valor de 0.015  $\mu\text{g mL}^{-1}$  en la cuantificación de acrilamida en el agua de extracción de acrilamida de papas a la francesa por un método de fluorescencia basado en el uso de fluorescamina. Por otra parte, en el estudio realizado por Hu *et al.* (2014) obtuvieron un LOD de 0.035  $\mu\text{g mL}^{-1}$  usando un método de fluorescencia basado en puntos cuánticos, esté último valor se encuentra por arriba de lo reportado en el presente trabajo. Sin embargo, cuando se comparan los límites de detección obtenidos con otras metodologías estándar (CG y CL acopladas a detectores de masas) queda en desventaja la metodología propuesta, ya que por medio de esta técnicas se suelen obtener límites de detección más bajos en el orden de 0.04-3.23  $\mu\text{g kg}^{-1}$  (Omar, Elbashir, & Schimitz, 2015; Hyung-Hee & Ho-Sang, 2014; Jessuzek & Schieberle, 2003).

A pesar de lo anteriormente mencionado y considerando que no se realizó un método de pre-concentración de la muestra los límites de detección y cuantificación son aceptables para un análisis de rutina en papas fritas, debido a que la concentración de acrilamida generalmente excede estos valores (Kim, Hwang, & Lee, 2006).

En el caso de otros alimentos con un contenido menor de acrilamida, la técnica podría requerir del uso de técnicas de preconcentración para reducir los límites de detección y cuantificación.

La exactitud expresada en porcentaje de recuperación obtenida, varió entre el 105-108% con una desviación estándar relativa menor al 5%. Estos resultados son comparables con los reportados Albishiri & El-Hady (2014) quienes obtuvieron porcentajes de recuperación entre 100-107% en el análisis de papas fritas usando una extracción ultrasónica asistida en un líquido iónico como extracción y cuantificación de acrilamida por HPLC y una detección por UV/Vis. Por otra parte, los porcentajes de recuperación obtenidos en el presente trabajo son más altos que los reportados por Liu *et al.* (2014) ya que obtuvieron un valor del 66% también en un estudio en papas fritas.

Adicionalmente, en la Tabla 8 muestra los ensayos intra-día e inter-día. Se puede observar que los valores son aceptables ya que se encuentran por debajo de un valor del 5% (Russo, Avino, Centola, Notardonato, & Cinelli, 2014).

**Tabla 8.** Recuperaciones de acrilamida en papas fritas.

Nivel de acrilamida promedio <sup>a</sup> ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Acrilamida adicionada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Acrilamida encontrada ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ )	Recuperación (%)	Desviación estándar relativa (% DER)	Precisión intra-día (% DER) n=3	Precisión Inter-día (% DER) n=3
646	200	906±20.1	107	2.21	1.34	4.58
	300	1024±41.2	108	4.02	3.49	4.67
	500	1205±50.4	105	4.18	4.16	8.52

<sup>a</sup>valores promedio y desviaciones estándar fueron calculados con base en sus tres réplicas

### 1.3.4 Análisis de muestras

Una vez que el método fue validado, se procedió al análisis de acrilamida en 9 muestras de papas fritas cuyo contenido de grasa se encontraba entre el 28.2-32.5 % de acuerdo a la reportado en la información nutrimental de las etiquetas (Tabla 9).

Las concentraciones de acrilamida encontradas en las muestras se encontraron entre 269-1405  $\mu\text{g kg}^{-1}$ , estos valores son similares a los reportados en la literatura. En los estudios realizados por Kim *et al.* (2006) y Hoenicke *et al.* (2004) reportaron una concentración promedio en papas 1365  $\mu\text{g kg}^{-1}$  y de 621  $\mu\text{g kg}^{-1}$  respectivamente. Pacetti *et al.* (2015), encontraron una concentración promedio de 916  $\mu\text{g kg}^{-1}$  aplicando una técnica cromatográfica acoplada a un detector de masas.

**Tabla 9:** Resultados del análisis de acrilamida en papas fritas

Muestra	Concentración ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ de papas fritas) $\pm$ desviación estándar	Desviación estándar relativa (%)
1	569.67 $\pm$ 16	2.8
2	269.21 $\pm$ 7	2.9
3	1405.43 $\pm$ 19	1.4
4	635.47 $\pm$ 16	2.5
5	754.68 $\pm$ 12	1.6
6	1083.43 $\pm$ 10	1.0
7	891.73 $\pm$ 11	1.2
8	895.73 $\pm$ 11	1.3
9	983.87 $\pm$ 10	1.0

En el estudio realizado por Mesias & Morales (2015), monitorearon el contenido de acrilamida en papas fritas que se comercializaban en España durante los años de 2004 al 2014, donde encontraron concentraciones que iban desde los 108-2180  $\mu\text{g kg}^{-1}$  con un contenido promedio de 630  $\mu\text{g kg}^{-1}$ . De la misma forma, en distintos estudios se han reportado valores similares (430-1100  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por Wong *et al.* (2014) ó 244-1688  $\mu\text{g kg}^{-1}$  por Boroushaki *et al.* (2010).

Aunque si bien es cierto que en la última década se ha observado una tendencia en la reducción de los niveles de acrilamida en diversos productos alimenticios, motivados



principalmente por las recomendaciones hechas por la FDA y la EU (Mesias & Morales 2015). En la actualidad, aún se encuentran alimentos con un alto contenido de acrilamida, especialmente en las papas fritas.

En la última directiva emitida por la Comisión de Regulación de Europa en 2017 se hizo un llamado especial a las industrias a disminuir el contenido de acrilamida de papas fritas a una concentración por debajo de  $750 \mu\text{g kg}^{-1}$ . Esto obliga a la comunidad científica a proporcionar métodos de análisis accesibles y relativamente fáciles a la industria de las papas fritas, para poder tener un control del contenido de acrilamida en sus productos.

#### **1.4 CONCLUSIONES**

El método de análisis desarrollado confirmó la aplicabilidad del 2-naftalentiol como un agente derivatizante para la determinación de acrilamida en papas fritas por HPLC acoplado a un detector de fluorescencia, como un método de análisis rutinario de este compuesto. El presente método mostró la ventaja de no necesitar pasos adicionales en el análisis mas que la remoción de grasa de la papa previo al proceso de derivatización. De cualquier forma, el uso de técnicas de preconcentración como la extracción en fase sólida podría disminuir aún más los límites de detección y cuantificación alcanzados en el presente trabajo. Aunque si bien el uso de la espectrometría de masas alcanza excelentes límites de detección y cuantificación, este equipo no es totalmente asequible en varios laboratorios, por lo que su aplicabilidad como análisis de rutina en la industria de las papas fritas se ve limitada. En este sentido, el método propuesto es una técnica accesible para el control de los niveles de acrilamida en las papas fritas.

# Capítulo 2

## Estrategias para la disminución de acrilamida en papas fritas

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Definición de botana y su consumo

En la actualidad se sabe de la estrecha relación que existe entre la dieta y el estado de salud del ser humano, por lo que elegir un buen alimento es crucial para asegurar una buena alimentación. Sin embargo, el acto de comer es un proceso complejo formado por un comportamiento aprendido, también por expectativas sociales, gustos adquiridos, por las actitudes y sentimientos sobre la alimentación en general y sobre ciertos alimentos en particular; por lo que la toma de decisión de qué alimento ingerir resulta complicado (Satter, 2007).

La forma en que se etiqueta o denomina la ocasión para comer influye en la elección de alimentos que un individuo puede tomar para saciar su hambre. En adición, la delimitación de las diferentes ocasiones en la que se come hace que no haya una definición permanente para definir lo que es una “botana”.

En la literatura existe una variación y una relativa dificultad para distinguir entre comida y botana, las definiciones más comunes que se pueden encontrar están basadas en el momento del día en que son consumidas (Ovaskainen, *et al.* 2006; Hess, Jonnalagadda, & Slavin, 2016), por el tipo de alimento que representan (Lipoeto, Geok Lin, & Angeles-Agdeppa, 2013), por la cantidad de alimento consumido, por el lugar donde es consumido el alimento, o una combinación de varios de estos factores (Garriguet, 2007; Bellisle, *et al.* 2003) y por el valor nutricional que aporta su consumo (Hess M, Jonnalagadda, & Slavin, 2016).

Para fines de este trabajo se definirá “botana” como aquellos alimentos que son consumidos entre comidas regulares que satisfacen las necesidades alimentarias de acuerdo a los nuevos estilos de vida. Este tipo de productos son preparados a partir de ingredientes alimenticios que dan lugar a un producto con propiedades nutricionales y características sensoriales específicas. A la mayoría de las botanas les son añadidas cantidades considerables de sal o edulcorantes, así como aditivos que las hacen agradables al paladar (sabor pizza o enchilados en el caso de productos mexicanos) y conservadores químicos (Tzia, Giannou ,

& Varzakas, 2016). Es importante destacar que como cualquier alimento las botanas deben ser seguras, libres de compuestos químicos peligrosos o tóxicos y de microorganismos patógenos que comprometan la salud del consumidor (Lusas & Rooney, 2001).

El consumo de botanas se ha convertido en uno de los hábitos alimenticios más comunes en la mayoría de la población mundial. En los últimos años se ha visto un incremento en la demanda de este tipo de productos, ya que al menos en Estados Unidos hasta el año 2006 la frecuencia de consumo era de 1-2 veces por día, aportando una ingesta calórica de aproximadamente 680 kcal/día en una población muestra cuyo intervalo de edad era de 19-39 años (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

En el caso de México para el año 2009 en el mismo tipo de población la ingesta calórica fue de 316 kcal/día (Duffey, Rivera, & Popkin, 2014). Sin embargo, la frecuencia de consumo en ciertas épocas del año se eleva, debido a reuniones familiares, actividades sociales masivas, deportivas, educativas, etc. De acuerdo con lo reportado por Industria Alimenticia (2016) el consumo per-cápita de botanas en México se encuentra entre 3.5 a 3.8 kg por año.

La presentación en que son consumidas las botanas en México varía también con los gustos del consumidor; ya que en el mercado se pueden encontrar botanas saladas, dulces, frutas, postres a base de cereales (barritas de cereal) y bebidas. Según el estudio realizado por Duffey *et al.* (2014) se observó que en la población muestra adulta mexicana de entre 19-39 años se prefería el consumo de botanas saladas.

De acuerdo con la Asociación de la Industria Alimenticia para los Procesadores de Alimentos de América Latina en su último reporte del año 2016, registró que el valor del mercado de las botanas fue de \$45,955 millones de pesos mexicanos y se espera que para el año 2020 su valor sea de unos \$ 52,717 millones de pesos mexicanos. De acuerdo a esta organización las empresas líderes en el ramo son en primer lugar PepsiCo, seguida por la empresa Barcel de Bimbo. Mientras que empresas más pequeñas como: Nacional de Alimentos y Helados (con sus productos Bokados), con Agra Foods (con su marca de palomitas de microondas Act II) y Botanas y Derivados son las que reúnen el resto de la participación de este mercado, formando parte de los primeros cinco lugares.

A pesar del impuesto sobre los alimentos de alto valor calórico establecido por el gobierno mexicano a partir del año 2014, en el año 2015 se mostró una recuperación en ventas en el sector y se estima que la industria suba hasta un 29% para el año 2020. De acuerdo con Euromonitor, el aumento del volumen para el total de 2015 fue de 369,600 toneladas, un crecimiento de 7.4% respecto de las 344, 000 que se registraron para el año 2010 (Industrias Alimenticias, 2016).

### *2.1.1 Papas fritas*

Las papas fritas son uno de los productos alimenticios altamente consumidos a nivel mundial, especialmente en niños y adultos de mediana edad (Ouhit, Al-Sharbaty, Gupta, & Al-Farsi, 2014). La razón por la que su consumo es elevado es la sensación de saciedad que aporta debido al contenido en carbohidratos y grasas que poseen, además de que los productos fritos confieren un sabor agradable al consumidor.

Uno de los problemas de salud que se tienen con el alto consumo de este tipo de productos es el sobrepeso y obesidad, especialmente en niños y gente de mediana edad, ya que contribuye a desarrollar enfermedades crónicas no transmisibles como la diabetes y enfermedades cardiovasculares. Todo esto debido a que la papa posee un alto índice glicémico, además que el contenido calórico aumenta una vez que estas son sometidas a un proceso de fritura (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

A inicios de la década pasada surgió un nuevo problema de salud debido a que se descubrió la presencia de acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos y fritos, este compuesto se le considera como posible carcinogénico. Del estudio realizado por Tareke *et al.* (2000) respecto a la presencia de acrilamida en diferentes productos parece ser que las papas a la francesa y las papas fritas son de los productos que mayor contenido de acrilamida presentan. A partir de entonces han surgido numerosos estudios para cuantificar este compuesto así como también poder reducir su presencia (Tareke, Rydeberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002).

Al respecto la Unión Europea en conjunto con la FAO y la OMS sugirieron niveles “indicativos” para la presencia de acrilamida en alimentos. Para el año 2013 la UE emitió como un valor indicativo de acrilamida en papas fritas de  $1000 \mu\text{k kg}^{-1}$  y  $600 \mu\text{k kg}^{-1}$  para papas a la francesa. Actualizando los logros obtenidos la UE en el año 2017 emitió una regulación de niveles de acrilamida en papas fritas tipo “crisps”, estableciendo un valor máximo de  $750 \mu\text{k kg}^{-1}$  (EC, 2017). En el caso de USA la administración de alimentos y drogas (FDA) al momento no ha impuesto restricciones al respecto del contenido de acrilamida pero si ha emitido un plan de acción para disminuir la presencia de acrilamida en alimentos que pueda servir de guía a las industrias (Muttucumaru *et al.*, 2017)

#### 2.1.1.1 Producción de papa

De acuerdo a archivos históricos se sabe que la papa es nativa de Sudamérica, principalmente de países como Perú, Chile, Colombia, Ecuador y Bolivia. No fue hasta el siglo XVI en que se introdujo al continente europeo y comenzó su explotación a nivel mundial Rusia, China y Polonia son los países que mayoritariamente producen este tubérculo, juntos representan el 50% de la producción mundial, mientras que países como Estados Unidos de América representa un 7% (Gould, 2001). La papa es ahora el tercer cultivo más importante, después del arroz y el trigo, para el año 2014 la producción total a nivel mundial fue cercano a 376 MT.

De acuerdo con Mora-Aguilar (2014), México ocupa el 17° lugar a nivel mundial en producción. A nivel nacional los principales estados productores son Sonora, Sinaloa, Veracruz, Puebla, Nuevo León y Estado de México. La papa se cultiva durante todo el año, en dos ciclos agrícolas: primavera-verano (PV) y otoño-invierno (OI). A pesar de que la papa se produce durante casi todo el año, el consumo per cápita es relativamente bajo; en el año 2000 fue de 16.2 kg, para 2007 aumentó a 17 kg por habitante y en el 2013 alcanzó 17.1 kg. Sin embargo; como se ha mencionado anteriormente, el consumo de papa en México ha sido creciente en los últimos años como consecuencia de la expansión de la industria de la comida rápida y de botanas.

Las papas suelen crecer mejor en suelos blandos, con climas fríos y húmedos. Este tipo de tubérculo crece asexualmente y echa raíz por medio de los rizomas que genera durante su crecimiento. Por otra parte, la cosecha se debe de realizar cuando el contenido de sacarosa se encuentra por debajo del 1.5%, y este valor se debe mantener así durante todo el almacenamiento (Gould, 2001).

Durante el proceso de almacenamiento se recomienda utilizar temperaturas frescas (15.6 °C) y con una humedad entre 95-99% en un cuarto ampliamente ventilado para evitar la formación de la suberina (polímero vegetal de naturaleza grasa que se forma en algunos vegetales que ayudan en la protección contra agentes patógenos y control de agua y solutos) (Beisson, Li, Bonaventure, Pollard, & Ohlrogge, 2007; Gould, 2001). Las papas pueden ser almacenadas por hasta 10 meses, si es que las condiciones son debidamente controladas.

#### *2.1.1.2. Variedades de papa y su clasificación*

Las variedades de papa pueden ser clasificadas usando un amplio rango de criterios. Una clasificación bastante utilizada se basa en el número de días hasta la madurez después de la siembra de las semillas del tubérculo. Por ejemplo, las papas pueden ser clasificadas como “muy tempranas” (65-70 días), “tempranas” (70-90 días), “de temporada media” (90-100 días), “tardías” (110-130 días) o muy tardías (>130 días) (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

Las papas también pueden ser clasificadas basadas en la calidad inherente a las mismas para su uso en procesos de preparación específicos (hervir, hornear, freír, deshidratar, etc.). Por ejemplo, los cultivares que se destinan a procesos de fritura son generalmente separadas para papas fritas (rodaja) o en papas a la francesa (alargadas) (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

También pueden ser clasificadas en función de si sufren almacenamiento o no. Algunos cultivos deben ser consumidos o procesados inmediatamente después de su cosecha mientras que en otros las propiedades del almidón se mantienen durante todo el almacenamiento. Este último tipo de cultivo es el que se puede almacenar por largos

periodos de tiempo representa una ventaja para la industria de los alimentos. Por último, la última clasificación se basa en las características del peridermo que cubre a la papa (piel), basado en el color del mismo. Los colores más comunes que se pueden encontrar son: café, rojo, blancas, amarillas, rosa, etc.

### 2.1.1.3. Nutrientes y vitaminas de la papa

La papa suele ser considerada como un alimento con pobre contenido de vitaminas y minerales en comparación con otros alimentos, como lo son las frutas, carne y vegetales verdes. Sin embargo, es notable la prevalencia de magnesio, potasio, hierro y zinc. De entre estos el potasio es el más abundante (320 mg/100 g de papa), con una mayor concentración en la cáscara (Weichselbaum, 2010).

El perfil químico proximal de las papas almacenadas varía de acuerdo a los siguientes parámetros: la temporada de cosecha, la cual incluye la temperatura y la humedad; el tipo de suelo y de los mismos nutrientes que posee; y de las características genéticas del cultivar específico o la variedad. La composición química de la papa tiene un impacto importante sobre el procesamiento de las mismas para crear una botana (Gould, 2001). De manera general la composición química proximal de las papas se muestra en la Tabla 10.

**Tabla 10:** Composición química proximal de una papa blanca (Gould, 2001).

Constituyente	Porcentaje	
	Mínimo	Máximo
Agua	63.0	87.0
Sólidos totales	13.0	37.0
Proteína	0.7	4.6
Grasa	0.02	0.96
Carbohidratos	13.0	30.5
Cenizas (minerales)	0.44	1.99

La papa ha sido identificada como un alimento natural de baja energía (0.7 kcal), debido a su inherente contenido de agua y por su alto contenido de almidón que la convierte en una fuente rica de carbohidratos (Weichselbaum, 2010). Por supuesto que el cocinado de la papa puede alterar el contenido energético significativamente, ya que al adicionar grasas o



aceites el valor energético sube drásticamente (desde 162 hasta 364 kcal/100 g) (Stewart & Taylor, 2017).

El almidón es el carbohidrato predominante ya que funciona como reserva de energía para la planta. La composición del almidón de la papa es un 21% amilosa, 75% amilopectina, 0.1% proteína y un 0.08% de fósforo. El tipo de madurez del tubérculo es indicativo de el contenido de almidón. Así los cultivos de maduración tardía tienden a producir un mayor tubérculo y rendimiento de almidón en comparación con los cultivos de maduración temprana (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

Respecto a los carbohidratos simples, la sacarosa es el principal disacárido que se encuentra en la papa, mientras que la glucosa y la fructosa son los principales monosacáridos. El equilibrio entre azúcares libres y el almidón se modifica durante el almacenamiento de la papa e influye en el procesado de la misma. Así, cuando hay una presencia excesiva de azúcares reductores aumenta el color café de las papas fritas como consecuencia de las reacciones de Maillard (Tarn, Tai, & Liu, 2006).

La papa cruda presenta un contenido de grasa bajo y se encuentra fuertemente modulado por la edad de la papa y evidentemente por los métodos de cocinado tal como lo es el freído y rostizado que suelen elevar el contenido de grasa (Gould, 2001).

Dependiendo de el método de cocinado la papa puede ofrecer un apreciable contenido de fibra dietética. La fibra generalmente se encuentra en la pared celular y por tanto su contenido se eleva en la cáscara de la papa. De acuerdo con el estudio de Weichselbaum (2010) se identificó que el contenido de fibra en la papa fue de 1.5 g/100 g, este resultado fue favorable al compararlo con arroz integral hervido que presentó el mismo contenido de fibra.

El contenido de proteína juega un rol importante en la calidad nutricional de la papa, la cantidad que se puede encontrar depende de la variedad, edad y método de procesamiento, se puede encontrar de 1.4-4.5 g/100g de papa fresca (Stewart & Taylor, 2017). Comparado con otras fuentes vegetales crudas, las papas no se consideran como una buena fuente dietaria de proteínas debido a su bajo contenido. Sin embargo, las proteínas de la papa tienen un excelente valor biológico (VB), con valores de 90-100 comparado con el huevo

(100), soya (84) y frijoles (73) (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009). La patatina es la mayor proteína de almacenamiento que posee la papa y también es alérgeno para algunas personas (Koppelman, *et al.* 2002; Camire, Kubow, & Donnelly, 2009). En segundo lugar se considera a un diverso grupo de proteínas de bajo peso molecular que inhiben las proteasas tipo Kunitz y otras enzimas. (Kubow, & Donnelly, 2009)

La asparagina es el aminoácido libre que se encuentra mayormente presente en la papa y que juega un rol importante en la generación de acrilamida en las papas fritas. La concentración promedio en la que se puede encontrar en la papa es de 93.9 mg/100 g de papa. El contenido de asparagina depende de factores tales como la variedad, origen, fertilización, almacenamiento y procesado (Martin & Ames, 2001).

Respecto a las vitaminas que se pueden encontrar en la papa son la tiamina (B1), folato (también conocidos como ácido fólico y vitamina B9), vitamina B6 y vitamina C. Esta última es por mucho la más abundante, se pueden encontrar concentraciones de 10-30 mg/100 g de papa cruda. El cocinado de la papa invariablemente reduce la cantidad de vitamina C, por ejemplo cuando se rebana una papa y se somete a horneado hay una reducción del 33%. Mientras que cuando se hievern existe una pérdida por arriba del 40% debido al contacto con el agua y fenómenos de lixiviación (Stewart & Taylor, 2017).

Aunque de acuerdo con el estudio realizado por Weichselbaum (2010), una porción de 220 g de papa hervida presentó una concentración de vitamina C de aproximadamente 33 mg, este valor puede ser comparado con el valor de referencia recomendado de vitamina C para adultos (40 mg/día) y esto representa el 82.5% del requerimiento. Cabe destacar que los niveles de vitamina C disminuyen rápidamente durante su almacenamiento en frío, con pérdidas del 20-60% que ocurren durante las semanas 15-17 (Dale, Griffiths, & Todd, 2003).

La papa es un producto saciante en parte por su alto contenido de carbohidratos y también porque contienen proteínas que inhiben la actividad proteolítica de las tripsinas en el intestino delgado, lo que a su vez amplía la actividad de el péptido de la hormona de la saciedad: la colecistoquinina (CCK) (Nakajima, Hira, Tsubata, Takagaki, & Hara, 2011).

#### *2.1.1.4 Consumo*

El consumo de las papas a nivel mundial como alimento ha ido cambiando hacia productos procesados. En este sentido, las papas son procesadas en una gran variedad de productos, incluyendo papas hervidas, horneadas, papas a la francesa, papas fritas, granulos de papa, hojuelas y cubos de papa deshidratada (Pedreschi, Mery, Mendoza, & Aguilera, 2004). Cualquier procesamiento aplicado a la papa ocasiona un aumento favorable a la digestibilidad del almidón, el cual tiene una baja digestibilidad cuando se encuentra cruda (Camire, Kubow, & Donnelly, 2009).

Las papas que se prefieren para el proceso de fritura son aquellas que poseen un alto contenido de sólidos (20-22%), ya que se obtienen papas fritas con una mejor textura, altos rendimientos y una baja absorción de aceite en el producto final (Pedreschi F. , Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007). Adicionalmente, el contenido de azúcares reductores debe ser bajo (<2.5-3 mg/g de papa) esto con la finalidad minimizar la coloración oscura de las papas debido a la reacción de Maillard y así también el contenido de acrilamida que surge de la misma reacción (Kepekci Tekkli, Önal, & Önal, 2012).

Las papas fritas son piezas bastante delgadas que surgen de los cortes delgados de la papa cruda, al finalizar el proceso de fritura el contenido de grasa y humedad son de aproximadamente un 35% y 1.9% respectivamente. Las temperaturas de fritura que se suelen ocupar durante este proceso se encuentran entre los 160-180 °C (Mittal & Zang, 2000).

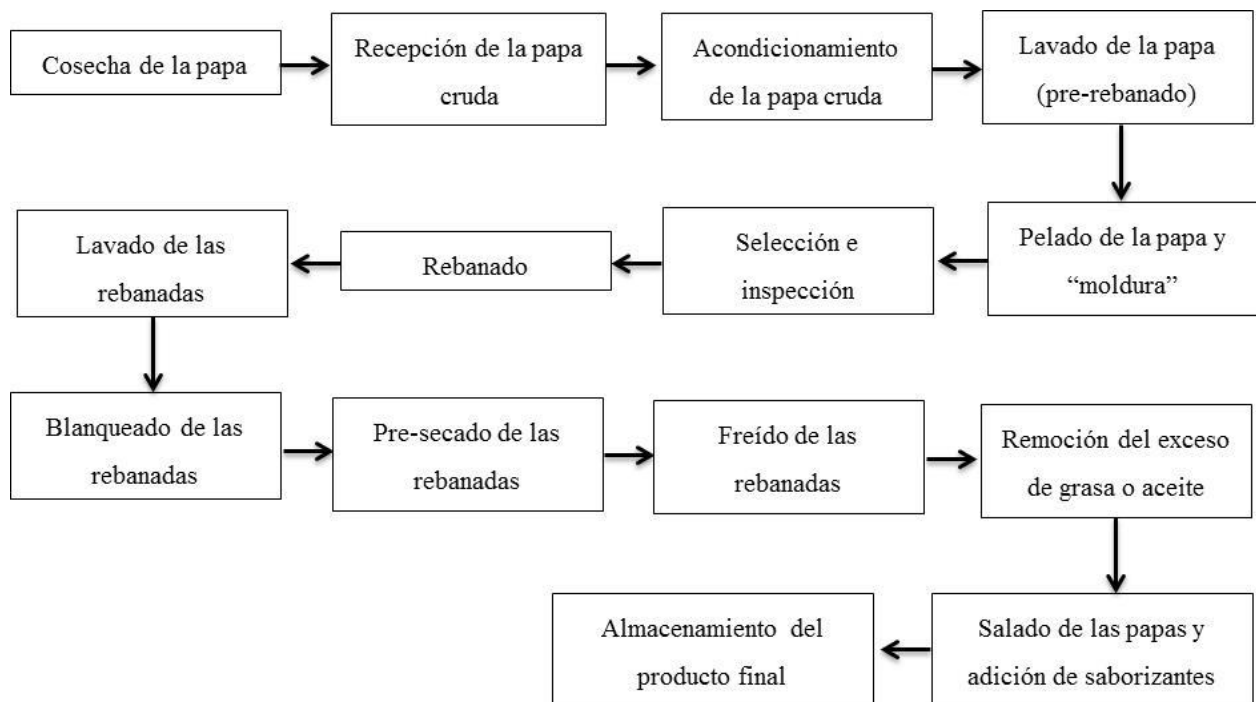
En las industrias que se dedican a la producción de papas fritas, cada lote de papas debe de pasar ciertas pruebas de calidad antes de ser procesadas, a continuación se describirá el proceso de producción industrial de estos productos.

#### *2.1.2 Proceso de elaboración de papas fritas*

El proceso de producción a nivel industrial de papas fritas consiste en una serie de operaciones, que si bien, no parecen complejas influyen directamente en la calidad del producto final. En la Figura 9 se muestra el proceso industrial de la elaboración de papas fritas “crisps”. La primera etapa consiste en la recepción y acondicionamiento de la materia prima, donde la papa es lavada para remover restos de tierra, materiales ajenos a la papa,

microorganismos patógenos, y donde adicionalmente se retiran partes de las papas que presenten un daño físico. Después, la papa se corta y se rebana de acuerdo a las necesidades de la industria productora, el rebanado es un punto clave en la obtención de papas fritas de calidad; el grosor de las papas oscila entre los valores de 0.7-1.8 mm y se recomienda grosores entre 1.0 y 1.2 mm como óptimos para asegurar un buen producto (Tzia, Giannou , & Varzakas, 2016).

Una vez que se obtienen las rebanadas de papas, éstas se someten a un proceso de lavado para remover el almidón, y azúcares simples, y protegerlo contra las reacciones que dan origen al oscurecimiento. El blanqueado de las papas consiste en la inmersión de las rebanadas en agua caliente o en soluciones salinas (bisulfito de sodio) a 65-95 °C por aproximadamente un minuto, aunque también se pueden aplicar tiempos de hasta 5 min (Pedreschi, Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007; Tzia, Giannou , & Varzakas, 2016).



**Figura 9:** Esquema general del proceso industrial para la obtención de papas fritas.

Después del proceso de blanqueado, se recomienda realizar un secado parcial a las rebanadas de papa para evitar que posteriormente absorban un exceso de aceite y se genere un mal producto final. En las plantas modernas y de gran capacidad, las papas son freídas

en procesos en continuo. Durante el freído de las papas se evapora el agua, en consecuencia, el peso de las rebanadas de papa desciende y permite que floten en el aceite (Tzia, Giannou , & Varzakas, 2016). Las temperaturas de freído que generalmente se utilizan se encuentran entre 175-190 °C. El tiempo de freído también varía, pero generalmente se encuentran entre 1.5-3.0 min, que depende directamente del grosor de las papas y del contenido de materia seca que posea. Por último, se remueve el exceso de aceite que haya quedado en la superficie después del freído y después son adicionadas las sales y saborizantes que pueda tener el producto (Tzia, Giannou , & Varzakas, 2016).

### *2.1.3 Calidad de las papas fritas*

La calidad del producto final se ve afectada por las condiciones originales de las materias primas, que son las papas y aceite. Los cuidados que se tienen que tener en la papa cruda incluyen parámetros microbiológicos (mohos, levaduras y bacterias), químicos (residuos de pesticidas y fertilizantes) y físicos (materiales extraños provenientes directamente del suelo donde se cosecha la papa). Por otra parte, en los aceites se debe de considerar que no existan compuestos químicos (agentes antiespumantes y metales pesados) y sobre todo controlar el grado de deterioro de los mismos, monitoreando el índice de peróxidos (valor recomendado menor a 3 meq kg<sup>-1</sup>) y el valor de la *p*-anisidina (la medición recomendada debe ser menor a los 5 meq kg<sup>-1</sup>) (Brinkmann, 2000; Tzia, Giannou, & Varzakas, 2016).

El proceso de freído es el punto más importante en el proceso para la obtención de un producto final seguro. Cuando no se controla la temperatura de freído y esta es excesiva (arriba de 190°C) se propicia la oxidación de los lípidos. La oxidación ocurre cuando el oxígeno presente en el aire comienza a interactuar con los lípidos presentes en el aceite, principalmente los ácidos grasos poliinsaturados y los productos resultantes de esta reacción son los causantes de la aceleración de la oxidación. Por lo que una vez más se hace hincapié en el control de temperatura de freído, así como de la rotación del aceite que debe tomar lugar cada 5-10 h en caso de que no sea un proceso en continuo. El criterio del número de veces de la renovación del aceite de freído depende de la legislación de cada país (Lin, Akoh, & Reynolds, 2001; Tzia, Giannou, & Varzakas, 2016).

Una excesiva oxidación de los lípidos presentes en el aceite ocasiona la polimerización y formación de diversos productos de descomposición. Los productos como los peróxidos, mono-glicéridos, di-glicéridos, aldehídos, cetonas y ácidos carboxílicos se vuelven volátiles durante el proceso de freído y participan minoritariamente en la creación de polímeros de descomposición. Los productos de descomposición de naturaleza no volátiles (monómeros cíclicos, dímeros, trímeros, y otros compuestos de alto peso molecular) y compuestos polares, pueden ocasionar la formación de ciertos compuestos gomosos y espumosos. Todos estos compuestos son indeseables en el proceso de freído (Tzia, Giannou, & Varzakas, 2016).

Antes de la oxidación se da en primer lugar la hidrólisis de los ácidos grasos. El agua ligada al alimento interacciona a alta temperatura con los lípidos del aceite de freído, lo que ocasiona la formación de ácidos grasos libres. Una vez que están libres los ácidos grasos son más fáciles de oxidar. La velocidad de la hidrólisis depende de la cantidad depositada dentro de los lípidos de freído, la temperatura de freído y de las veces de la reutilización del aceite. Debido a que la papa contiene una diversidad de componentes (azúcares, almidón, proteínas, fosfatos, compuestos sulfurados y traza de metales), éstos son extraídos y transportados por los lípidos durante el proceso de fritura, y a su vez ocasionan un oscurecimiento en la papa frita.

#### *2.1.4 Estrategias para la disminución de acrilamida en papas fritas*

Como ya se mencionó anteriormente la mayor concentración de acrilamida se ha encontrado en papas fritas y horneadas, productos de panadería y café en polvo. Las concentraciones de acrilamida resultantes del monitoreo por parte de la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA por sus siglas en inglés) entre los años 2007-2009 fueron de 257-265  $\mu\text{g kg}^{-1}$  en papas cocinadas hechas en casa (Palermo, *et al.* 2016).

Estos datos en conjunto con otras fuentes minoritarias permitieron calcular un aproximado de la exposición de acrilamida con un valor de 1 $\mu\text{g}$  por kilogramo de peso corporal. Esto en consecuencia generó una seria preocupación para la salud de los consumidores de este tipo de productos, particularmente para los niños (Bellisle *et al.*, 2003).

Dado que la reacción de Maillard es la principal vía de formación de acrilamida en alimentos, existen diversos factores que contribuyen directamente en este proceso: la presencia de precursores en la materia prima (la asparagina libre y azúcares reductores tales como la glucosa y la fructosa) y la magnitud de la temperatura empleada durante el proceso de producción (combinación de tiempo-temperatura) (Palermo, *et al.* 2016). Con respecto a los precursores formadores de acrilamida, éstos se ven afectados por la variedad de la materia prima seleccionada, así como también de las condiciones medioambientales en las que se desarrolló (Powers, Mottram, Curtis, & Halford, 2013).

En las últimas décadas se han desarrollado diversas estrategias para reducir la concentración de acrilamida en alimentos procesados. Aunque estas técnicas se han enfrentado a una gran problemática debido a que la acrilamida se forma a través de la reacción de Maillard que a su vez es responsable de contribuir a la formación de atributos de color, sabor y textura del producto final. Varias de las estrategias propuestas, originaban cambios en las propiedades organolépticas del alimento que afectaban dramáticamente la calidad del producto y en consecuencia un rechazo por parte de los consumidores (Pedreschi F. , Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007).

En el año 2004 la Unión Europea en colaboración con la FDA, grupos científicos y representantes de la comunidad industrial, crearon una guía que plasmaba una serie de estrategias para la disminución de acrilamida en alimentos térmicamente procesados llamado “ acrilamida *Toolbox*” (Amrein, Limacher, Conde-Petit, Amado, & Escher, 2006). De acuerdo a lo publicado por Palermo *et al* (2016) en el año 2013 se realizó una revisión del documento en el que se destacaban los procedimientos que resultaron más eficaces para la disminución de acrilamida en distintos alimentos tratados térmicamente (bizcochos, pan, cereal para el desayuno, papas fritas y papas a la francesa).

Derivado de la última revisión a la guía “ acrilamida *Toolbox*”, los expertos en ciencia de los alimentos reconocieron que no todas las estrategias propuestas tienen el mismo valor en términos de eficacia, efectos secundarios (efectos negativos en la calidad sensorial del

producto final) o aplicabilidad (Palermo, *et al.* 2016). Y de acuerdo a ellos consideran tres puntos importantes para poder llevar a cabo una estrategia de disminución de acrilamida:

1. Velocidad de reducción: Se refiere al porcentaje de reducción de la concentración del contaminante que se puede alcanzar con una estrategia específica de mitigación en comparación con el control.
2. Efectos secundarios: Tiene que ver con la modificación del sabor, gusto, color, textura, en general todos relacionados con la aceptación del consumidor, formación de otros compuestos peligrosos derivado de la estrategia de disminución de acrilamida.
3. Aplicabilidad e impacto económico: Implementación en el proceso industrial y el costo resultante de la aplicación de la estrategia empleada.

Tomando en consideración lo anterior, se describirán las estrategias mejor calificadas para la disminución de acrilamida en papas fritas.

#### *1. Selección de papas con bajo contenido en precursores formadores de acrilamida*

La comunidad científica e industrial calificó a la selección de papas con bajo contenido de azúcares, como una de las mejores estrategias para la disminución de acrilamida, alcanzado una reducción de hasta 22 veces del contenido original. Esto se debe a que la concentración de asparagina libre en las papas en conjunto con la presencia de azúcares reductores actúan como reactivos limitantes en la formación de acrilamida en las papas térmicamente procesadas (Muttucumaru, *et al.* 2017). Al aplicar esta tecnología no se presentaron grandes cambios sensoriales (únicamente se reportó en algunos casos un impacto moderadamente negativo en el color del producto final) y es relativamente sencillo de llevar a cabo a nivel industrial, caso contrario a las papas que son elaboradas en el hogar (Palermo, *et al.* 2016).

#### *2. Condiciones previas al procesado*

Dentro de las acciones que se pueden realizar antes del procesado térmico de las papas para poder disminuir el contenido de acrilamida, se tiene: la revisión de las condiciones de almacenamiento y el escaldado.



El almacenamiento de las papas por arriba de una temperatura de 8°C es una práctica común que se lleva a cabo en la industria, es de fácil implementación y generalmente no representa costos adicionales. Las condiciones apropiadas para el almacenamiento de las papas permite tener una baja concentración de azúcares reductores.

De acuerdo a lo publicado por De Wilde *et al.*(2005) reportaron una disminución de 10 veces el contenido de acrilamida en papas a la francesa que estaban almacenadas a una temperatura de 8 °C en comparación con papas que estaban almacenadas a 4 °C. Sin embargo, algunas empresas prefieren almacenar a las papas a temperaturas de 4 °C, ya que a esta temperatura se inhibe el brote de la raíz y no es necesario utilizar productos químicos, además de que se evita el crecimiento de algunos microorganismos tales como los hongos entre otras bacterias aumentando el periodo de almacenamiento (De Wilde, *et al.* 2005).

Por otra parte, el escaldado de alimentos es un proceso mediante el cual la pieza vegetal o animal se somete a cocción en agua caliente a una temperatura entre los 70-80 °C durante un periodo de tiempo corto (entre 2-5 min) para después retirarlo y enfriar rápidamente. Esto con la finalidad de inactivar enzimas que puedan deteriorar al alimento y de aportar mejoras de textura (Elmore, *et al.* 2015).

Aunque el escaldado implica un aumento en el tiempo de producción, los costos adicionales fueron considerados como aceptables y accesibles para su aplicación a nivel industrial. El escaldado es una forma efectiva que permite no únicamente reducir la cantidad de azúcares reductores si no también la cantidad de asparagina. Se tienen reportes que con esta técnica se puede llegar a reducir hasta un 60% del contenido de acrilamida en papas a la francesa (Palermo, *et al.* 2016). Una de las desventajas de emplear esta estrategia, es que, las propiedades organolépticas del producto final se pueden verse alteradas de alguna forma. Los posibles efectos secundarios que se pueden observar son: reducción en la integridad de la papa, debido a los cambios estructurales que ocurren en el tejido del tubérculo (Rommens, Yan, Swords, Richael, & Ye , 2008), además de que se puede llegar a percibir un sabor amargo (Zhang & Zhang, 2007). La duración y severidad de estos efectos

secundarios dependen de muchos factores, tales como, la temperatura y tiempo de inmersión por lo que el tratamiento de escaldado debe ser específico al proceso de producción para que realmente sea efectivo.

### *3. Condiciones de freído*

En cuanto a las estrategias de mitigación relacionadas con el control de la temperatura del aceite durante la fritura y el tamaño de las piezas de papa, Palermo *et al.* (2016) consideraron la posibilidad de freír a una temperatura máxima de 175 °C y cortar las papas más gruesas como una estrategia de mitigación. La formación de acrilamida en papas va en un aumento de forma paralela cuando sube la temperatura, así que freír a temperatura moderada es en principio una estrategia bastante efectiva para la reducción de acrilamida (Palermo, *et al.* 2016).

Sin embargo, las propiedades organolépticas del producto final podrían cambiarse drásticamente por este enfoque. En particular, esta estrategia de mitigación puede llevar a una mayor absorción de aceite en papas fritas, con efecto sobre la nitidez, humedad, sabor y color (Gökmen , 2016).

### *4. Grosor de la rebanada*

Otro tema a considerar es el grosor de la rebanada, ya que es un factor que influye en la formación de acrilamida. En los estudios realizados por Pedreschi *et al.* (2007) confirmaron que cuando se tienen grosores delgados de papa se puede obtener un menor contenido de acrilamida. Sin embargo se tiene que tomar en cuenta que el grosor de la papa depende mucho de las especificaciones del producto final que se desea obtener de acuerdo a las necesidades de la empresa.

### *5. Utilización de Asparaginasa*

Como se mencionó anteriormente una de las principales estrategias para disminuir la formación de acrilamida es la reducción de precursores presentes en el alimento. En consecuencia, la descomposición de la asparagina libre antes del proceso de calentamiento

originaría una disminución del contenido de acrilamida. Para este propósito, se suele adicionar la enzima asparaginasa durante el lavado o escaldado de las papas crudas, esta enzima cataliza la hidrólisis de la asparagina en ácido aspártico y un grupo amonio (Gökmen, 2016). Sin embargo parece ser que la efectividad de asparaginasa solo funciona cuando se utiliza un proceso de escaldado en las papas, con reducciones de hasta un 70% del contenido total de acrilamida (Pedreschi, Mariotti, Granby, & Risum, 2011).

El uso de la asparaginasa en la industria de las papas fritas se ve limitado, debido a que distintas empresas no incluyen el proceso de escaldado en su línea de producción por el alto costo que representa su implementación. Generalmente la industria que suele usar más la asparaginasa es la de panadería y galletería debido a que se puede adicionar fácilmente en la fermentación de la masa (Palermo *et al.*, 2016).

#### *6. Otras estrategias de mitigación*

Dentro de las estrategias de mitigación de acrilamida para papas, la supresión de la brotación de raíz y la adición de sal de difosfato de disodio son consideradas como estrategias de mitigación medianamente servibles para este propósito. Los supresores de brotes como el clorprofam y el isopropil-N- (3-clorofenilcarbamato) (CIPC) también pueden prevenir la degradación del almidón y el posterior aumento de la glucosa libre durante almacenamiento. Por esta razón, esta es una medida potencialmente efectiva: cuanto menor sea el contenido de azúcar reductor, mayor será la inhibición de la formación de acrilamida (Muttucumar, *et al.* 2017).

Sin embargo, el efecto observado en la reducción de acrilamida (1.7 veces la tasa de reducción) en las papas fritas agregadas con CIPC fue moderado. Además, esta estrategia de mitigación también fue desfavorable debido a que es una medida que no es fácil de aplicar porque es necesario un equipo especializado y el uso de agroquímicos no es bien recibido por los consumidores (Pedreschi, Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007; Palermo, *et al.* 2016; Lu, Donner, Yada, & Liu, 2012).

Respecto al uso de la sal de difosfato de disodio, éste se emplea de manera común en la industria para evitar la decoloración de la papa, por lo que su aplicación para reducir la formación de acrilamida, es muy fácil de aplicar desde un punto de vista técnico. La razón detrás de esta estrategia es que la adición de sal de difosfato de disodio disminuye el pH en la superficie de las papas y, por lo tanto, inhibe la formación de acrilamida. Sin embargo, de acuerdo a Troung, *et al.* (2014) los efectos finales en la formación de acrilamida observados no fueron tan claros. Además esta estrategia de mitigación podría generar diferentes efectos secundarios (mal sabor del producto) si las condiciones en las que se agrega el difosfato de disodio no están perfectamente controladas y que podría llevar al rechazo de los consumidores (Palermo, *et al.* 2016).

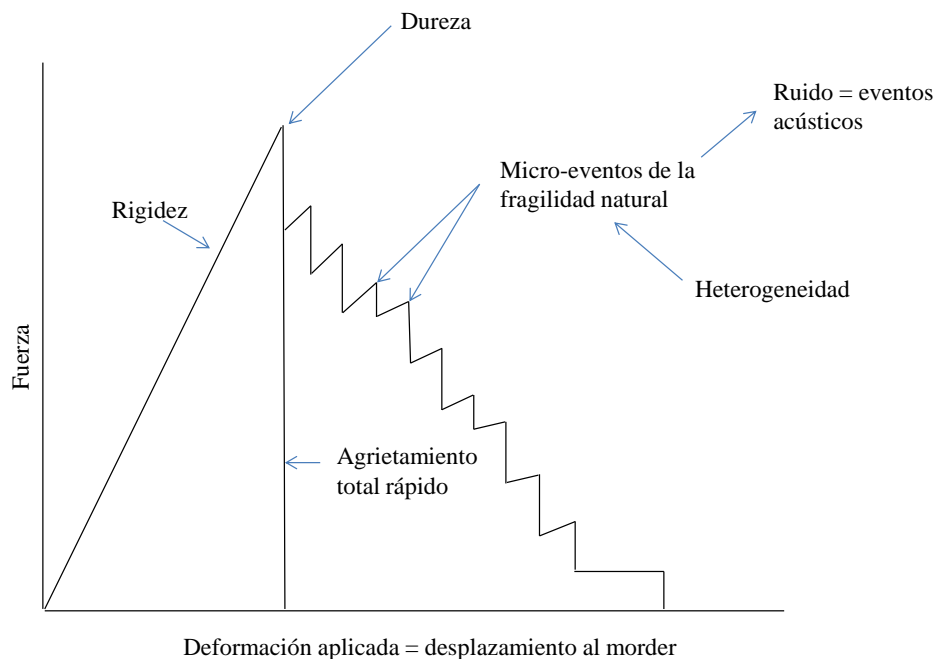
La adición de antioxidantes es otra estrategia que se ha tratado de implementar como estrategia de mitigación, pero la evidencia científica resulta contradictoria. Se observó un aumento en los valores de acrilamida cuando las papas fueron sumergidas en un 1% p/v de extracto de arándano y de orégano antes de freirlas (Vattem y Shetty, 2003). En otros estudios, se observaron ligeras reducciones cuando se adicionó ácido ascórbico a sistemas modelo de papas (Biedermann, *et al.* 2002) o romero al aceite de fritura de papas (Becalski, *et al.* 2003),

Se ha demostrado que los antioxidantes pueden ejercer sus efectos beneficiosos debido a que capturan los electrones libres de los radicales intermedios formados en la reacción de Maillard (Friedman & Levin, 2008). En realidad, la eficacia de los antioxidantes parece ser dependiente de la concentración. Rydberg *et al.* (2003) añadieron ascorbato sódico en muestras de papas y observaron que a bajas concentraciones este compuesto produce un ligero aumento en las cantidades de acrilamida, mientras que a concentraciones más altas el contenido disminuye. De forma similar, otros autores mostraron que la adición de antioxidantes (compuestos fenólicos) a partir de hojas de bambú y té verde, en un sistema modelo equimolar de glucosa-asparagina, reduce la formación de acrilamida dependiendo de la concentración (Zhang y Zhang, 2008).

#### *2.1.5 Evaluación de textura de las papas fritas*

El atributo de textura es un importante indicador de la calidad del producto final. La textura de las papas se describe generalmente en términos de crujencia, dureza y del “crunch” (Salvador, Varela, Sanz , & Fiszman, 2009).

La definición, causa y cuantificación de “crujencia” y sensaciones asociadas como el “crunch” y desmoronamiento son complejas y en cierto punto inconclusas. De acuerdo a lo descrito por Vincent (1998), la manera más fácil de entender el término de crujencia esta relacionado con la tasa de velocidad a la cual la fuerza aplicada por los aductores de la mandíbula cae cuando el material se fractura, junto con la sensación de la reducción de la presión en cada diente. La crujencia debe entonces estar asociada con una rápida caída en la fuerza que es aplicada para lograr fracturar al alimento, la cual esta asociada con una rápida propagación de la fractura, cuando el material es frágil (Figura 10).



**Figura 10:** Fuerza generalizada de la curva de desplazamiento para la primer mordida en un material crujiente o frágil cuando se rompe en la boca

Se deben de tomar en cuenta dos criterios cuando un objeto se rompe: 1) debe de existir una fuerza suficiente y disponible para poder romper el objeto y 2) debe existir suficiente

energía para para crear nuevas superficies. El primer criterio recae en la forma que posee la sonda o punta de prueba, en la que se concentra toda la fuerza disponible en una pequeña zona, produciendo una concentración del estrés sobre el objeto de estudio. Cuando el objeto crujiente de estudio posee espacios vacíos (bolsas de aire), estos pueden actuar como obstaculizadores del rompimiento y ocasionar un alargamiento del radio de curvatura del objeto que se esta usando para provocar la ruptura (Vincent, 1998). Es por ello que la heterogeneidad es un importante adjunto a la fragilidad para generar la textura crujiente. El segundo criterio se puede manipular experimentalmente con el objeto de corte o con el que se ejerce la fuerza para romper el objeto.

En general, la crujencia es caracterizada por una fractura frágil a una baja fuerza de fractura y eventos de fractura distinglibes, con la concominante emisión de sonidos (Salvador, Varela, Sanz , & Fiszman, 2009).

El propósito para esta parte de la investigación fue evaluar el efecto de los diferentes parámetros de proceso de fritura en la formación de acrilamida sin perder de vista parámetros de calidad como color y textura para que deben ser adecuados. Los parámetros que se estudiaron nacen de la necesidad de la empresa FRITOS TOTIS S.A de C.V de reducir los niveles de acrilamida en sus procesos de elaboración de papa clásica y papa casera mediante freído en continuo.

## 2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1 Reactivos

Se utilizó la acrilamida, ácido acrílico y 2-naftalentiol obtenidos de Sigma-Aldrich (San Luis, Missouri, E.U.A). Los disolventes como el ácido acético y acetonitrilo (grado HPLC) fueron adquiridos de la casa comercial J.T. Baker (Filisburgo, Nueva Jersey, E.U.A) mientras que el hexano fue obtenido de REASOL (Ciudad de México, México).

### 2.2.2 Material

La variedad de papa que se utilizó para esta investigación fue la Atlanti, proporcionada por la empresa Fritos Totis (Tizayuca, Hidalgo, México), con dos periodos de almacenamiento (0 y 4 meses).

### 2.2.3 Experimentación

Con el fin de evaluar la influencia de ciertos parámetros del proceso de fritura sobre la formación de acrilamida y su efecto en otros parámetros fisicoquímicos y sensoriales, se utilizó un diseño de experimentos del tipo factorial fraccionado  $2^{k-1}$  por duplicado. Se consideraron los siguientes factores con dos niveles cada uno: Temperatura (150-180 °C), tiempo de freído (5-10 min), grosor (0.16-0.22 mm) y escaldado (0-5 min a 70 °C). Este diseño factorial se realizó con papa recién cosechada (sin almacenamiento) y con papa almacenada por 4 meses (8 °C y una humedad relativa del 95%). Los niveles que se utilizaron se seleccionaron de acuerdo a la realización de experimentos previos e indicaciones de la empresa para simular las condiciones del freído en continuo que se realiza en planta.

Las papas se seleccionaron de acuerdo a su apariencia física y buscando que su tamaño fuera uniforme. Se lavaron previo al proceso de fritura para remover las partículas de tierra que presentaban, posteriormente se cortaron en rebanadas con los siguientes grosores: 2.0 y 1.5 mm y un diámetro aproximado de 35-50 mm.

Los experimentos se realizaron en una freidora eléctrica Blazer FE-3 (CDMX, México, 1600 W y 127V) con una capacidad de 4 L de aceite, dotado de una canasta estática y un termómetro regulador. El aceite que se utilizó fue oleína de palma grado alimenticio proporcionado también por la empresa Fritos Totis S.A. de C.V. El proceso de escaldado al que se sometieron algunas muestras se realizó con agua caliente a una temperatura de 70 °C por un tiempo de 5 min, transcurrido el tiempo se escurrieron sobre toallas de papel para después freírlas.

La matriz experimental que se utilizó se muestra en la Tabla 11, las variables respuesta evaluadas fueron: el contenido de acrilamida, el contenido de grasa, actividad de agua, porcentaje de humedad y textura en las papas fritas. En la papa cruda se evaluó el contenido de azúcares reductores.

**Tabla 11:** Matriz de diseño de experimentos para el contenido de acrilamida en papas.

Experimento	Temperatura de freído (°C)	Tiempo de freído (min)	Grosor (mm)	Escaldado	Código
1	150	5	0.16	0	150-5-D-NE
2	150	10	0.22	0	150-10-G-NE
3	150	10	0.16	1	150-10-D-E
4	150	5	0.22	1	150-5-G-E
5	180	10	0.16	0	180-10-D-NE
6	180	5	0.22	0	180-5-G-NE
7	180	5	0.16	1	180-5-D-E
8	180	10	0.22	1	180-10-G-E

#### 2.2.4 Análisis fisicoquímicos

##### 2.2.4.1 Medición de azúcares reductores

Para la determinación de azúcares reductores se hizo una extracción de acuerdo a la metodología propuesta por Wilson *et al.* (1981). Se pesaron 200 g de papa, se pelaron y se cortó de la parte central del tubérculo, se homogenizó en un procesador de alimentos y por prensado se obtuvo el líquido de la papa. Del líquido obtenido se tomó una alícuota de 10 mL y se mezclaron con otros 10 mL de metanol, se agitaron y sometió a un centrifugado a



12000 rpm por 10 min. El sobrenadante se hizo pasar por un cartucho de separación en fase sólida C-18 para remover posibles interferentes, el primer mililitro se descartó.

Después se realizó la cuantificación mediante la reacción con el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS por sus siglas en inglés) de acuerdo al protocolo propuesto por Lindsay (1973). Se tomó 1 mL (1 M) del extracto y se puso a reaccionar con 1 mL del reactivo DNS por 15 min a una temperatura de 80 °C. Concluida la reacción se enfriaron los tubos en hielo y se adicionaron 8 mL de agua desionizada. Se midió la absorbancia en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 530 nm. Se realizó una curva de calibrado con una solución patrón de glucosa anhidra con un intervalo de concentraciones de 10-100 mg L<sup>-1</sup>.

#### *2.2.4.2 Medición de acrilamida*

Para la medición de acrilamida, se realizó siguiendo la técnica descrita en el capítulo anterior la cual consistía en una reacción de derivatización química con el 2-naftalentiol y el análisis de separación y cuantificación por medio de un equipo de HPLC utilizando un detector de fluorescencia.

#### *2.2.4.3 Determinación de humedad*

La determinación de humedad se realizó gravimétricamente por triplicado siguiendo el protocolo de AOAC-925.10 (AOAC, 1990).

#### *2.2.4.4 Determinación de grasa*

Se realizó mediante el método soxhlet siguiendo el protocolo de la AOAC-950.54 (AOAC, 1986), también por triplicado

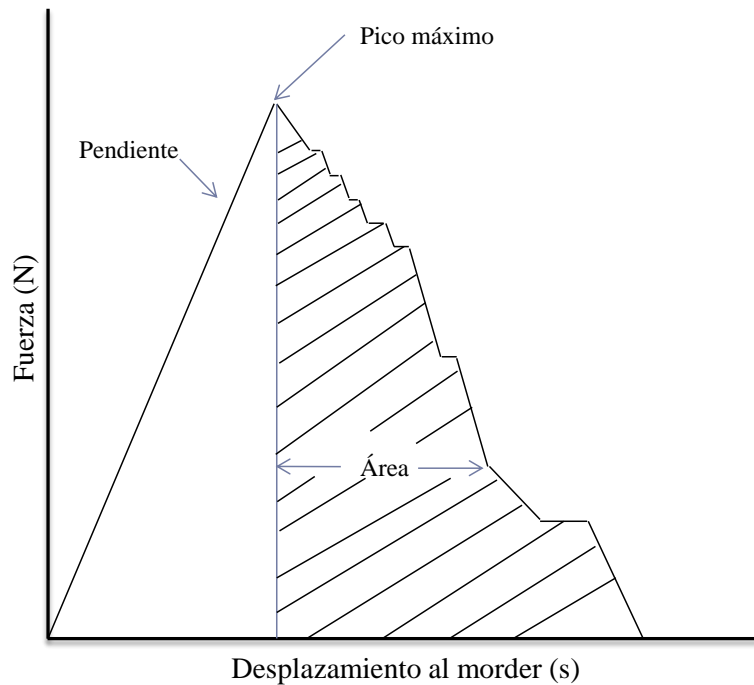
#### *2.2.4.5 Determinación de color*

Se utilizaron 20 papas por cada experimento y se homogenizaron para poder realizar la medición de color. Las muestras fueron colocadas sobre un fondo de papel mate negro. Las mediciones se realizaron utilizando un colorímetro Mini Scan XE Plus (Hunter Lab, USA). Cada medición se hizo de acuerdo al espacio de color CIE midiendo el valor de L (índice

de luminosidad), a (color de verde a rojo) y b (gradiente del azul). Cada medición por cada experimento se realizó por triplicado.

#### 2.2.4.6 Determinación de textura

Se utilizó un Texturómetro (TA Plus, Lloyd Instruments; Estados Unidos) con una sonda de 0.25 pulgadas y un soporte en forma de anillo. Con una velocidad de prueba: 1 mm/s, una fuerza de carga: 0.406 N y una distancia de recorrido de la sonda: 3 mm. Los parámetros que se evaluaron fueron el pico máximo, y la pendiente del origen al punto más alto, el área después del primer pico como se muestran en la Figura 11.



**Figura 11:** Curva de desplazamiento de análisis textura para la identificación de variables a medir

#### 2.2.5 Análisis estadístico

Los resultados del diseño de experimentos se analizaron estadísticamente utilizando el software MINITAB V15.1. El contenido de acrilamida, porcentaje de humedad, porcentaje de grasa, actividad de agua y parámetros de textura (pico más alto, pendiente del origen al pico más alto y el área total fueron analizados estadísticamente por medio de un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Todos los datos fueron analizados usando el paquete estadístico de STATGRAPHICS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

## 2.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1 Análisis de correlaciones

Previo al análisis de la influencia de los factores del proceso de fritura sobre el contenido de acrilamida, se realizó una correlación de las variables de estudio de las papas con almacenamiento y sin almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 12.

**Tabla 12:** Correlaciones momento producto de Pearson obtenidas, entra cada par de variables.

Variable	Correlaciones (r)					
	Acrilamida	Aw	% Humedad	% Grasa	L	a
Acrilamida						
Aw	-0.4260*					
% Humedad	-0.4279*	0.7913*				
% Grasa	0.3077	-0.4249*	-0.5213*			
L	0.5299*	-0.4759*	-0.5817*	-0.0390		
a	0.8009*	-0.6300*	-0.6462*	0.2420	0.8139*	
b	0.5813*	-0.4990*	-0.5933*	0.0009	0.9604*	0.8484*

\* (p<0.001)

Se puede observar que existió una correlación positiva entre el contenido de acrilamida y los valores de medición de color L, a y b. El valor de correlación de acrilamida más alto se obtuvo con el valor de a con una  $r=0.8009$ , mientras que para L y b se obtuvieron valores con una correlación media;  $r=0.5299$  y  $r=0.5813$ . Esto quiere decir que conforme aumenta el valor de “a” el contenido de acrilamida también aumenta, por lo que el valor de “a” se puede llegar a utilizar como un posible predictor del contenido de acrilamida.

En cierta manera es normal debido a que la reacción de Maillard, ocasiona el desarrollo de un color oscuro que tiende al café debido a la generación de melanoidinas. Algunas investigaciones han tratado de predecir el contenido de acrilamida por medio de la medición del color (Segnini, Dejmek, & Öste, 1999; Pedreschi, Mery, Mendoza, & Aguilera, 2004; Mery, Pedreschi, & Soto, 2013). Tradicionalmente, el color de las papas se suele medir instrumentalmente con un colorímetro (Segnini, Dejmek, & Öste, 1999; Pedreschi, Mery, Mendoza, & Aguilera, 2004), en la actualidad existen técnicas más sofisticadas que miden el color por medio de sistemas basados en el procesado de la imagen digitalmente por medio de *softwares* especializados (Mery, Pedreschi, & Soto, 2013).

También se observó una correlación positiva importante entre las variables de  $A_w$  y el porcentaje de humedad de las papas fritas con un valor de  $r=0.7913$ . De antemano se esperaba una correlación positiva entre ambas variables, ya que están relacionadas con el contenido de agua en el producto final. Este resultado conlleva a un mejor entendimiento de la relación que guarda el contenido de agua con las características sensoriales y fisicoquímicas del producto final.

En cuanto al contenido de grasa se encontró una correlación negativa significativa con  $A_w$  y humedad. Así, cuando los valores de  $A_w$  y humedad son altos el valor del contenido de grasa es menor y viceversa. Este comportamiento se relaciona con el proceso de fritura que se basa en el intercambio de agua del producto por el aceite del medio por la acción del calor aplicado al proceso (Pedreschi & Moyano, 2005).

Por otra parte, se observaron correlaciones altas entre las variables relacionadas con la medición de color, encontrándose valores de  $r=0.8131$  para “L-a”;  $r=0.9604$  para “L-b” y  $r=0.8484$  para “a-b” respectivamente. Estos valores están relacionados a las características del producto final en conjunto con el proceso de fritura de las papas fritas. Este aspecto se discutirá en el apartado de calidad sensorial de las papas fritas.

### *2.3.2 Efecto de la conservación de las papas sobre el contenido de acrilamida.*

Con la finalidad de evaluar el efecto que tiene la conservación de las papas sobre el contenido de acrilamida, se realizó la medición del contenido de acrilamida así como de parámetros físico-químicos en papas almacenadas por un periodo de tiempo de 4 meses y sin almacenamiento. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 13.

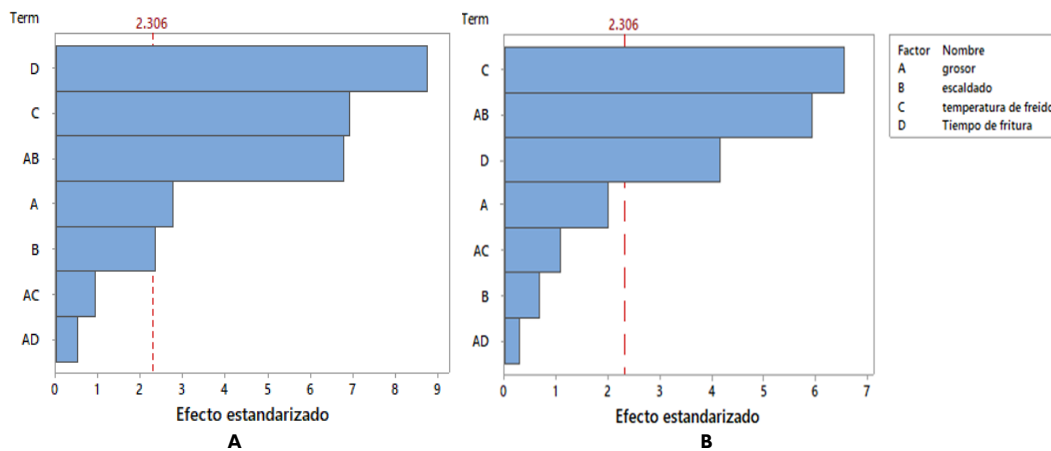
De acuerdo a los resultados obtenidos se observó que el almacenamiento de las papas afectó significativamente el contenido de acrilamida ( $p < 0.05$ ), ya que se halló mayor concentración de acrilamida en las papas almacenadas por 4 meses en comparación con sus pares sin almacenamiento.

**Tabla 13.** Matriz experimental con los resultados obtenidos de calidad de la papa para evaluar el proceso de fritura para mitigar el contenido de acrilamida con respecto al tiempo de conservación.

Conservación (meses)	Código	Contenido de AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) $\pm$ sd
0	150-5-NE-D	973 $\pm$ 71 <sup>bc</sup>
0	150-10-NE-G	795 $\pm$ 63 <sup>ab</sup>
0	150-10-E-D	1483 $\pm$ 118 <sup>d</sup>
0	150-5-E-G	885 $\pm$ 62 <sup>ab</sup>
0	180-10-NE-D	2590 $\pm$ 243 <sup>e</sup>
0	180-5-NE-G	752 $\pm$ 92 <sup>a</sup>
0	180-5-E-D	1138 $\pm$ 320 <sup>c</sup>
0	180-10-E-G	2480 $\pm$ 204 <sup>c</sup>
4	150-5-NE-D	1554 $\pm$ 343 <sup>bc</sup>
4	150-10-NE-G	890 $\pm$ 52 <sup>a</sup>
4	150-10-E-D	825 $\pm$ 67 <sup>a</sup>
4	150-5-E-G	1097 $\pm$ 407 <sup>a</sup>
4	180-10-NE-D	4386 $\pm$ 540 <sup>e</sup>
4	180-5-NE-G	1149 $\pm$ 164 <sup>ab</sup>
4	180-5-E-D	1812 $\pm$ 146 <sup>c</sup>
4	180-10-E-G	3540 $\pm$ 769 <sup>d</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Temperatura (150-180 °C), Tiempo de fritura (5-10 min), escaldado (no escaldado NE y escaldado E) y grosor (Delgado y Grueso). Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

En la Figura 12 se puede observar que independientemente del periodo de almacenamiento de la papa, la temperatura y tiempo de freído fueron los factores significativos que influían en la mayor producción de acrilamida, así como la interacción del grosor y el escaldado.



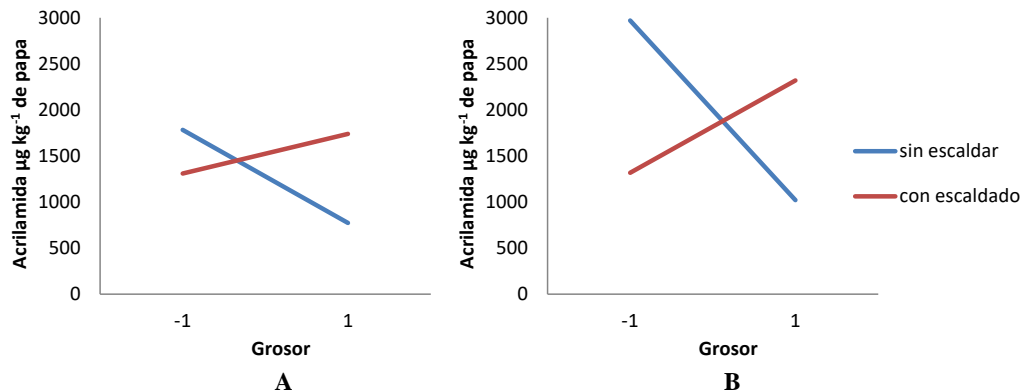
**Figura 12:** Diagrama de Pareto de efectos estandarizados para el contenido de acrilamida: A) papa fresca y B) papa con 4 meses de conservación

De acuerdo a lo reportado por Pedrechi *et al.* (2004) el efecto de la temperatura sobre la formación de acrilamida es crítico ya que a temperaturas elevadas se genera una mayor cantidad de acrilamida, debido a que se favorece la reacción de Maillard. Evidentemente cuanto más tiempo se deje la papa a altas temperaturas también ocasionará que exista una mayor cantidad de este compuesto tóxico. En este caso las papas que se frieron a 180 °C presentaron un intervalo de acrilamida de 752-4386  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de papa, mientras que a 150 °C de 795 a 1554  $\mu\text{g kg}^{-1}$  de papa. Los resultados también se encuentran relacionados con lo publicado por Palermo *et al.* (2016), que indican que se hace necesario el control de la temperatura de fritura y el tamaño de las rebanadas de las papas. De acuerdo a su investigación observaron que la temperatura máxima de freído debe ser de 175 °C y con rebanadas de un grosor lo más delgado que sea posible.

Por otra parte, el tiempo de fritura fue otro factor que influyó significativamente sobre el contenido final de acrilamida. Como se puede observar, cuando el tiempo de fritura es alto a temperaturas altas se generará más acrilamida en comparación con tiempos cortos de fritura con temperaturas bajas. Estos resultados se encuentran en concordancia con lo reportado por Romani *et al.* (2009), quienes reportaron un aumento en el contenido de acrilamida conforme aumentaban el tiempo de freído. Por otra parte, es importante recalcar que en los experimentos donde el tiempo y temperatura de freído fueron altos, la papa resultante no cumplía con las características sensoriales típicas del producto ya que presentaba un color más oscuro y un sabor a quemado.

En la Figura 13 se muestra el gráfico de interacción entre los efectos de escaldado y grosor de la papa que también fueron significativos. Se puede observar que para ambos casos el contenido de acrilamida es menor cuando el grosor de la papa es delgado y le ha sido aplicado el tratamiento de escaldado. En el caso de las papas de corte grueso se puede observar que el tratamiento de escaldado no ayuda en la disminución de acrilamida, por el contrario, el contenido de acrilamida parece incrementarse.

Se tienen reportes que el tratamiento del escaldado sirve para remover la mayor cantidad de glucosa u otro azúcar como la fructosa presentes en las papas, además se ha demostrado que también ayuda en la disminución del contenido de asparagina (Mestdagh, *et al.* 2007).



**Figura 13:** Gráfico de la interacción de los efectos principales estandarizados del proceso de fritura de las papas. A) papa sin almacenamiento y B) papa almacenada por 4 meses.

Tanto Pedrechi *et al* (2004) como Haese, Matthäus, & Vosmann (2003), obtuvieron tasas de un 60% de disminución de acrilamida en papas al emplear un método de escaldado. Las papas que se sometieron al proceso de escaldado tenían un color más claro en comparación de las que no se sometieron a dicho proceso, pero al momento de freír las papas obtuvieron su color dorado, característico de las papas fritas.

En este sentido parece que el agua que se utiliza en el proceso de escaldado puede penetrar más fácilmente en el tejido de la papa con menor grosor, ocasionando una mayor remoción de azúcares tales como la glucosa, fructosa y también de la asparagina. Sin embargo, en el presente estudio, el corte grueso no se ve beneficiado por el escaldado respecto al contenido en acrilamida. Quizás en estos cortes gruesos se debería de aumentar el tiempo de escaldado para que se tenga un resultado similar al de los cortes delgados, pero desgraciadamente, alargar el proceso de fritura aumentando el proceso de escaldado ocasiona dificultades técnicas y económicas a las empresas.

De acuerdo al estudio realizado por Palermo *et al.* (2016), el efecto del grosor es moderado debido a dos hechos opuestos. A medida que aumenta el grosor de la rebanada de papa,



aumenta el cociente entre el volumen y el área superficial. Por lo tanto, para el mismo tiempo de fritura, se espera que el nivel de acrilamida de las piezas más grandes de papa sea más bajo. Sin embargo, debido a que el proceso de fritura debe prolongarse para permitir la cocción del almidón del centro de la papa, el sobrecalentamiento de la superficie puede a su vez resultar en niveles más altos de acrilamida (Mestdagh *et al.* 2007).

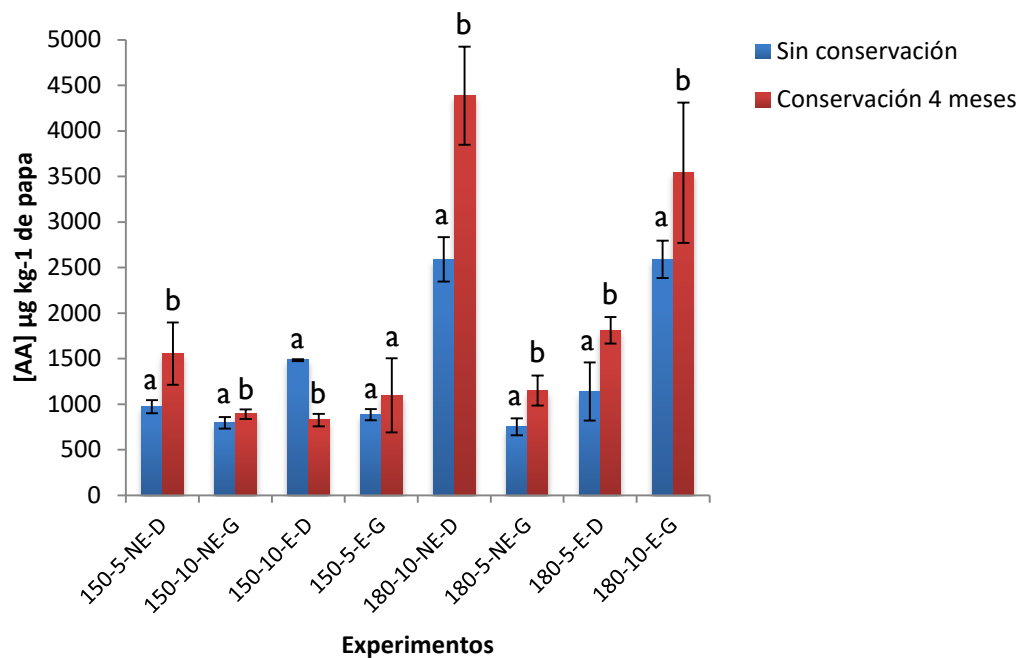
Otra teoría que podría explicar el efecto negativo del escaldado sobre las rebanadas gruesas es que el proceso de escaldado favorezca una mayor absorción de agua, y como la fritura se basa en el intercambio de agua por aceite, al existir una mayor cantidad de agua se necesitará más tiempo para alcanzar la fritura, trayendo como consecuencia una mayor producción de acrilamida.

Respecto al tiempo de conservación o almacenamiento de la papa, en la Figura 14 se puede observar que el contenido de acrilamida es mayor en la mayoría de los experimentos realizados con la papa almacenada en comparación con los experimentos realizados con la papa fresca.

Esta diferencia se debe principalmente al contenido inicial de azúcares reductores en las papas crudas. El análisis de azúcares reductores reveló que la papa fresca contenía  $1.21 \pm 0.05$  mg de glucosa  $g^{-1}$  de papa, significativamente ( $p < 0.05$ ) inferior a los  $2.34 \pm 0.11$  mg de glucosa  $g^{-1}$  hallados en la papa con 4 meses de conservación. Durante el almacenamiento de las papas el almidón sufre un desdoblamiento lo que ocasiona que exista una liberación de azúcares reductores, este fenómeno se le conoce como “enfriamiento dulce” (Sanny, Jinap, Bakker, van Boekel, & Luning, 2012). Aunque cabe resaltar que por sí solos los azúcares reductores no afectan la concentración de acrilamida, si no que depende también de la concentración de asparagina que posea la papa (Palermo *et al.*, 2016).

Para la producción de papas fritas se requiere que las papas a utilizar contengan pocas cantidades de azúcares reductores ( $< 2.5$ -3 mg de azúcar reductor por gramo de papa) (Pedreschi, Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007). Por tanto, las papas utilizadas en la empresa cumplen con esta condición para generar papas con poco contenido de acrilamida,

aunque se debe hacer hincapié en la importancia del almacenamiento de los tubérculos. Un apropiado almacenamiento de las papas permite mantener una concentración baja de azúcares reductores. De Wilde *et al* (2006) obtuvieron una disminución de acrilamida de hasta 10 veces menos almacenando las papas a una temperatura de 8 °C en comparación con temperaturas de almacenamiento de 4 °C; aunque el almacenamiento con 4 °C previene el crecimiento de mohos y otros agentes biológicos y evita el brotamiento de raíces.



**Figura 14:** Gráfica de comparación del contenido de acrilamida en función del tiempo de conservación: papas conservadas por 4 meses y sin conservación. Diferentes letras dentro del mismo experimento indica que las medias difieren significativamente ( $p < 0.05$ ) con ANOVA.

Por lo anteriormente mencionado es que una de las principales estrategias para la mitigación de acrilamida en papas fritas es escoger variedades de papa que posean una menor cantidad de azúcares reductores y asparagina o mejorar el proceso de almacenamiento. De acuerdo al estudio realizado por Muttucumaru *et al.* (2017) las variedades que menor contenido de azúcares reductores presentaron fueron: “lady rosetta”, “verdi” y “saturna”. Del mismo estudio se reveló que la cantidad de azúcares reductores

depende mucho de la zona donde son cultivados estos productos, ya que hubo diferencias entre el contenido de azúcares en distintas localidades del mismo país (Reino Unido). Elegir la mejor papa parece una tarea difícil debido a que existen más de 500 variedades de la misma (Muttucumaru *et al.*, 2017), por ello es que la estrategia de mitigación no debe recaer solamente en la elección de papas con un menor contenido de precursores de acrilamida.

### 2.3.3 Efecto del procesado sobre las características sensoriales de la papa frita

Es evidente que la reducción de formación de acrilamida no debe demeritar las propiedades sensoriales de las papas, objetivo principal de la empresa. Así pues en este apartado de resultados se decidió analizar los resultados obtenidos de las papas en cuanto al contenido de acrilamida, porcentaje de humedad, contenido de grasa, color y textura de las papas fritas obtenidas en función de los factores del diseño de experimentos planteado.

#### 2.3.3.1 Papa delgada

Los datos que se muestran en la Tabla 14 corresponden a los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros físico-químicos y sensoriales de las papas de corte delgado. Para fines prácticos de la explicación de resultados solo se muestra el valor de contenido de humedad de las papas y no el de Aw, esta decisión se tomó basándonos en la alta correlación que mostraron ambas variables.

**Tabla 14:** Resultados de las características físico-químicas y sensoriales de las papas fritas considerando el tiempo de conservación y grosores delgados.

Papa delgada no almacenada							Textura		
Código	[AA]	% H <sub>2</sub> O	% Grasa	L	a	b	Max. Fuerza quiebre (N)	pendiente (N/S)	Área (Ns)
150-5-ne	973±71 <sup>a</sup>	3.76±0.07 <sup>c</sup>	28.68±0.47 <sup>a</sup>	61.29±0.7 <sup>c</sup>	4.10±0.5 <sup>a</sup>	22.80±0.2 <sup>bc</sup>	6.0 <sup>e</sup>	5.1 <sup>abc</sup>	2.6 <sup>b</sup>
150-10-e	1483±118 <sup>b</sup>	2.61±0.10 <sup>b</sup>	37.99±1.65 <sup>cd</sup>	59.44±0.2 <sup>a</sup>	4.29±0.1 <sup>ab</sup>	21.51±0.1 <sup>a</sup>	4.6 <sup>b</sup>	4.6 <sup>abc</sup>	2.6 <sup>ab</sup>
180-10-ne	2590±243 <sup>d</sup>	2.64±0.19 <sup>b</sup>	31.67±2.77 <sup>b</sup>	62.94±0.2 <sup>d</sup>	9.48±0.1 <sup>c</sup>	24.98±0.6 <sup>d</sup>	5.0 <sup>d</sup>	7.1 <sup>bc</sup>	2.6 <sup>ab</sup>
180-5-e	1138±320 <sup>a</sup>	3.44±0.15 <sup>c</sup>	37.38±1.66 <sup>c</sup>	60.50±0.2 <sup>b</sup>	4.43±0.2 <sup>ab</sup>	22.37±0.2 <sup>b</sup>	4.8 <sup>cd</sup>	6.0 <sup>abc</sup>	2.6 <sup>ab</sup>
Papa delgada conservada 4 meses									
150-5-ne	1554±343 <sup>bc</sup>	3.45±0.40 <sup>c</sup>	33.62±3.49 <sup>b</sup>	61.23±0.7 <sup>c</sup>	4.16±0.3 <sup>ab</sup>	22.91±0.7 <sup>c</sup>	4.4 <sup>bcd</sup>	6.5 <sup>abc</sup>	3.0 <sup>ab</sup>
150-10-e	825±67 <sup>a</sup>	2.58±0.93 <sup>b</sup>	40.64±2.82 <sup>d</sup>	59.93±0.1 <sup>a</sup>	4.36±0.1 <sup>ab</sup>	21.38±0.7 <sup>a</sup>	3.9 <sup>b</sup>	5.1 <sup>ab</sup>	3.2 <sup>a</sup>
180-10-ne	4386±540 <sup>e</sup>	1.58±0.44 <sup>a</sup>	32.84±3.44 <sup>b</sup>	63.07±0.1 <sup>d</sup>	9.59±0.3 <sup>c</sup>	25.14±0.5 <sup>d</sup>	4.0 <sup>b</sup>	7.5 <sup>c</sup>	1.8 <sup>a</sup>
180-5-e	1812±146 <sup>c</sup>	2.79±0.31 <sup>b</sup>	39.17±1.88 <sup>cd</sup>	60.69±0.2 <sup>b</sup>	4.46±0.3 <sup>b</sup>	22.34±0.2 <sup>b</sup>	3.0 <sup>a</sup>	4.8 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Temperatura (150-180 °C), Tiempo de fritura (5-10 min) y escaldado (escaldado y no

escaldado). Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

De acuerdo a los resultados obtenidos se puede inferir que en el caso donde las papas que no fueron almacenadas, el experimento que obtuvo las mejores características sensoriales fue el marcado con el código: 150-5-ne. Esto debido a que en los atributos de color se obtuvieron valores similares al ideal (L: 61-63; a: 4.0-5.0 y b: 21-23) (Pedreschi, Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007). En la Figura 15 A se muestra la imagen de las papas seleccionadas como ideales y se comparan con la Figura 15 B que fueron las papas que mostraron un valor más alto en el valor de a; correspondientes al experimento 180-10-ne, donde se nota una coloración más oscura.

En el estudio realizado por Pedreschi, et al (2005) relacionó el parámetro a con el contenido de acrilamida en papas fritas, donde encontró una correlación  $r^2=0.95$  con respecto al contenido de acrilamida, debido a que mayores temperaturas de freído forman papas más rojizas y oscuras.

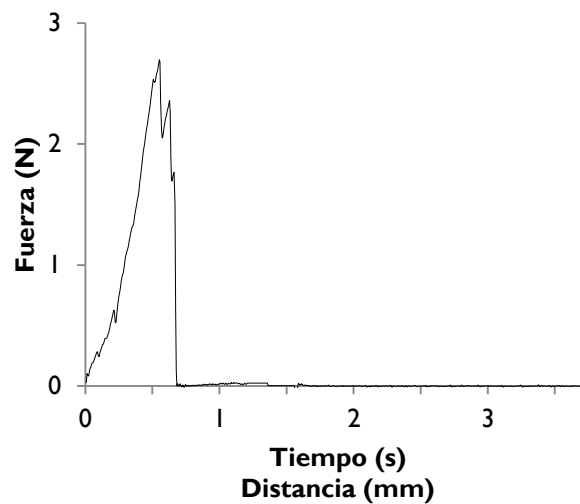


**Figura 15:** Imágenes de papas de corte delgado A) experimento con código 150-5-NE y B) experimento con código 180-10-NE.

Las papas fritas suelen contener de un 32.0%-45.0% de contenido de grasa en base húmeda (Zhang, Ren, & Zhang, 2009; Pedreschi & Moyano, 2005). El valor de grasa obtenido en el experimento “150-5-NE” de la papa sin almacenar se encuentra por debajo del 30 %, lo cual representa un aspecto positivo por cuestiones de salud, ya que hoy en día el consumidor busca productos con un menor contenido de grasas.

También es importante resaltar que el contenido de acrilamida fue significativamente menor en comparación con los demás experimentos ( $p < 0.05$ ), lo cual también es benéfico desde el punto de vista de la salud humana.

Si bien, el atributo de textura de pico máximo se encuentra fuera de lo ideal para las papas delgadas (Pico máximo: 3.0-5.0 de acuerdo a experimentaciones preliminares) las papas fueron aceptablemente crujientes. La Figura 16 muestra la curva de fuerza-desplazamiento de las papas del experimento 150-5-NE. De acuerdo a la curva obtenida se puede observar que presenta picos antes y después del punto máximo de quiebre, estos picos están relacionados con las características de un alimento crujiente (Vincent, 1998).



**Figura 16:** Curva de fuerza-desplazamiento de uno de los experimentos con codificación 150-5-NE.

Por otra parte, en las papas que fueron almacenadas por 4 meses el experimento que resultó con las mejores características sensoriales fue el marcado con el código: 150-10-E. En primera instancia se esperaba que el experimento ideal fuera el mismo que el de la papa sin almacenar, sin embargo esto no fue así, debido a que en este experimento se realizó la operación de escaldado que ayudó a mantener una baja concentración de acrilamida en la papa frita, debido a la remoción de azúcares reductores presentes en la papa (Romani, Bacchiocca, Rocculi, & Dalla, 2009). Cuando la papa ha sido almacenada el escaldado se

hace necesario para reducir el contenido de azúcares simples en la papa, tal y como se había indicado al comentar la interacción de los factores escaldado con grosor.

Además el proceso de escaldado favorece que el contenido de grasa aumente en el producto independientemente de la temperatura y tiempo de freído (Pedreschi, Moyano, Santis, & Pedreschi, 2007). Este comportamiento queda de manifiesto con el alto contenido de grasa encontrado en los experimentos donde el proceso de escaldado fue aplicado.

Un aspecto importante a resaltar es que de acuerdo a la teoría se ha reportado que el proceso de escaldado sirve como un pre-tratamiento que ayuda a la mejora del color y la textura de las papas fritas, debido a que contribuye a una menor absorción de aceite por la gelatinización del almidón en la superficie (Califano & Calvelo, 1987; Pedreschi & Moyano, 2005). Algunos autores han explicado que cuando se aplican temperaturas de escaldado bajas (55-70°C) ocasiona la activación de la enzima pectinesterasa que ocasiona una disminución en la porosidad de la papa y por tanto una menor absorción de aceite (Aguilar, Anzaldúa-Morales, Talamás, & Gastelúm, 1997; Pedreschi & Moyano, 2005).

Sin embargo, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos por Pedreschi & Moyano (2005), quienes también obtuvieron un mayor contenido de grasa en papas que fueron sometidas a un proceso de escaldado, ellos lo atribuyen a un mecanismo fisico-químico de absorción de grasa debido a la humectación que existe en la superficie de la papa.

#### *2.3.3.2 Papa gruesa*

Los datos que se muestran en la Tabla 15 corresponden a los resultados obtenidos de la evaluación de los parámetros físico-químicos y sensoriales de las papas de corte grueso. De acuerdo a los resultados obtenidos el experimento que obtuvo las mejores características organolépticas y con menor contenido de acrilamida fue el experimento con el código 150-10-NE tanto para las papas sin almacenamiento como para las papas almacenadas por 4 meses.

**Tabla 15:** resultados de las características físico-químicas y sensoriales de las papas fritas considerando el tiempo de conservación y grosores gruesos.

**Papa gruesa no almacenada**

Código	[AA]	% H <sub>2</sub> O	% Grasa	L	a	B	Max. Fuerza quiebre (N)	pendiente (N/S)	Área (Ns)
150-10-ne	745±63 <sup>ab</sup>	3.44±0.15 <sup>b</sup>	37.38±1.66 <sup>c</sup>	62.47±0.4 <sup>c</sup>	5.39±0.2 <sup>c</sup>	24.36±0.4 <sup>cd</sup>	10.1 <sup>bc</sup>	11.1 <sup>d</sup>	4.7 <sup>bc</sup>
150-5-e	885±62 <sup>ab</sup>	9.97±0.40 <sup>e</sup>	25.88±1.01 <sup>a</sup>	59.25±0.7 <sup>a</sup>	2.45±0.2 <sup>a</sup>	20.72±0.2 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>
180-5-ne	752±92 <sup>a</sup>	5.13±0.17 <sup>c</sup>	31.15±1.49 <sup>cd</sup>	61.66±0.2 <sup>b</sup>	4.68±0.1 <sup>b</sup>	23.67±0.2 <sup>b</sup>	6.1 <sup>c</sup>	5.8 <sup>b</sup>	5.9 <sup>c</sup>
180-10-e	2480±204 <sup>c</sup>	2.75±0.18 <sup>b</sup>	38.31±0.69 <sup>c</sup>	62.90±0.3 <sup>c</sup>	8.58±0.3 <sup>d</sup>	24.79±0.2 <sup>c</sup>	7.3 <sup>b</sup>	9.1 <sup>cd</sup>	4.1 <sup>b</sup>
<b>Papa gruesa almacenada 4 meses</b>									
150-10-ne	890±52 <sup>ab</sup>	2.84±0.26 <sup>b</sup>	31.26±2.34 <sup>cd</sup>	62.61±0.3 <sup>c</sup>	5.40±0.3 <sup>c</sup>	24.17±0.3 <sup>c</sup>	7.7 <sup>b</sup>	8.9 <sup>bcd</sup>	3.3 <sup>b</sup>
150-5-e	1097±407 <sup>ab</sup>	9.02±0.81 <sup>d</sup>	32.52±1.98 <sup>d</sup>	59.06±0.6 <sup>a</sup>	2.44±0.4 <sup>a</sup>	20.79±0.4 <sup>a</sup>	8.8 <sup>b</sup>	6.0 <sup>bc</sup>	4.0 <sup>b</sup>
180-5-ne	1149±164 <sup>b</sup>	5.03±0.70 <sup>c</sup>	27.89±1.04 <sup>b</sup>	61.70±0.2 <sup>b</sup>	4.84±0.1 <sup>b</sup>	23.54±0.2 <sup>b</sup>	8.6 <sup>c</sup>	7.2 <sup>bc</sup>	5.9 <sup>c</sup>
180-10-e	3540±769 <sup>c</sup>	2.05±0.66 <sup>a</sup>	40.43±1.28 <sup>f</sup>	62.80±0.1 <sup>c</sup>	8.23±0.5 <sup>d</sup>	24.63±0.2 <sup>dc</sup>	7.6 <sup>ab</sup>	7.8 <sup>bc</sup>	2.9 <sup>ab</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Temperatura (150-180 °C), Tiempo de fritura (5-10 min) y escaldado (escaldado y no escaldado). Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente (p <0.05).

El parámetro más importante que se tomó en cuenta para esta decisión fue el valor de humedad obtenido, el cual tuvo un efecto importante sobre las demás variables analizadas.

El valor de humedad obtenido del experimento 150-10-NE se encontró dentro de los valores ideales en las papas fritas, aunque si bien, el experimento 180-10-E también mostró un buen valor en el contenido de humedad, se descartó debido al alto contenido de acrilamida que mostró, así también por los valores de a y b que también fueron altos en comparación con el experimento ideal. Los demás experimentos (150-5-E y 180-5-NE) mostraron un alto valor en el contenido de humedad, por lo que las papas resultantes tenían una textura muy blanda y colores muy pálidos reflejado en una disminución del valor de a y b.



A



B



C

**Figura 17:** Imágenes tomadas a las papas de corte grueso que corresponden a: A) experimento codificado como: 150-10-NE; B) experimento codificado como :150-5-E y C) experimento codificado como: 180-10-E

Aunque si bien, el contenido de acrilamida para estos experimentos no mostraron una diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ), las características sensoriales de textura obtenidas no eran las más adecuadas para este tipo de productos. En la Figura 17 A se muestra la imagen de la papa con características ideales en papas gruesas, en la Figura 17 B las papas con textura blanda y color pálido y en la figura 16 C se muestran las papas que tuvieron altos valores de a y b.

La disminución del contenido de agua ha sido relacionado con la formación de acrilamida más que por la captación de aceite. Al respecto Amrein *et al* (2006) encontró que el contenido de humedad tiene una fuerte influencia en la energía de activación del pardeamiento y en consecuencia de la formación de acrilamida, la cual se forma durante la última fase de la fritura.

Las diferencias en el porcentaje de humedad obtenidas en los experimentos con porcentajes de humedad altos con respecto al ideal, se deben principalmente a que el proceso de freído no se realizó por tiempo suficiente para remover el agua contenida en la papa cruda, ya que la fritura es un proceso de deshidratación en el que las sustancias solubles en agua se extraen del producto que se fríe y se traspasan a la grasa que se utiliza para freír (Harada & Paulus, 1986). Por otra parte Segnini *et al* (1999) hace referencia a que el grosor de las papas influye en el contenido final de humedad de las papas fritas, se lo atribuye a la heterogeneidad de las papas debido al contenido de almidón, ya que la presencia de este compuesto varía dependiendo de las diferentes zonas de la papa (tallo y zona vascular).

También de acuerdo a lo publicado por Segnini *et al* (1999) el contenido de humedad de las papas fritas esta en función del tiempo de freído, las diferentes densidades de las papas (incluye el grosor) y la temperatura del aceite. Aunque no existe una especificación de las condiciones ideales para el proceso de freído de las papas y que se obtenga un contenido de humedad ideal, de acuerdo a la bibliografía se sugiere emplear temperaturas de freído altas

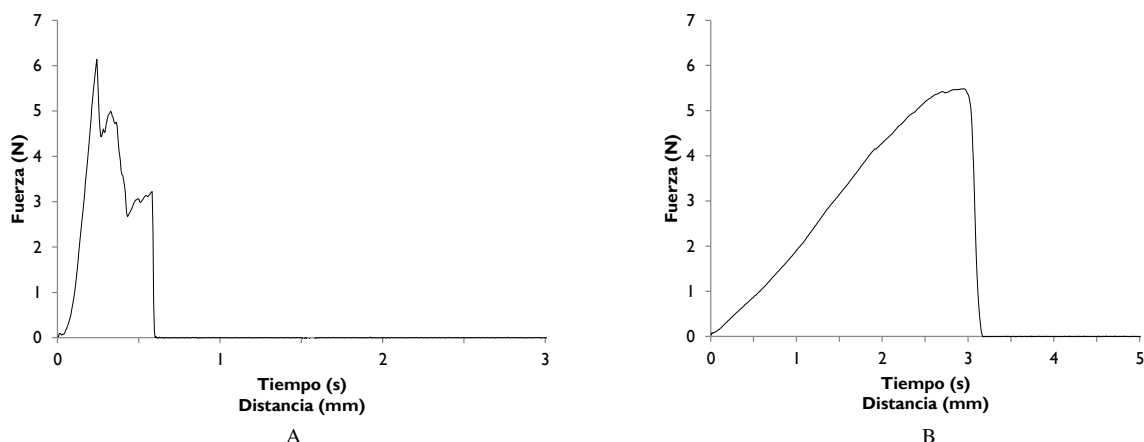


por corto tiempo (185 °C) por 2 min, aunque estas condiciones dependen de la variedad de la papa y del grosor de las mismas (Baumann & Escher, 1995).

La textura crujiente de las papas fritas es una de las principales características de calidad de las mismas, por ello se decidió evaluar este parámetro a través de pruebas de ruptura midiendo el pico más alto de la gráfica (máxima fuerza de quiebre), la pendiente del origen al pico más alto (relacionado con la rigidez de la muestra) y el área que resulta del pico más alto hacia adelante (que esta relacionado con el trabajo total involucrado en la prueba) (Vincent, 1998).

De acuerdo a los resultados obtenidos, se puede observar la máxima fuerza de quiebre fue menor cuando el grosor de las papas era delgado en comparación con las papas que presentaban un grosor grueso, a demás se observó que en los experimentos de papa gruesa conservada almacenada (150-5-E y 180-5-E) la fuerza de quiebre mostró un valor elevado, sin embargo por las características de la papa la muestra jamás presentó una ruptura, eso en consecuencia arrojó un gráfico de desplazamiento de la fuerza sin los picos característicos que denotan a a un alimento crujiente.

La curva de fuerza-desplazamiento de la Figura 18 A corresponde al experimento 150-10-NE, donde se pueden observar un aspecto irregular con varios eventos de fractura antes y después del punto máximo de quiebre, típicos de alimentos crujientes ( Vincent, 1998; Salvador, Varela, Sanz , & Fiszman, 2009). Mientras que la figura 18 B corresponde al experimento 150-5-E muestra un aspecto regular sin ningún evento de fractura, un punto máximo de quiebre alto y un valor de área grande.



**Figura 18:** Curvas de fuerza-desplazamiento para muestras de papas fritas corte grueso: A) papas codificadas como : 150-10-NE y B) papas codificadas como: 150-5-E.

En la figura 18 A se puede diferenciar muy bien dos regiones de la curva. La primer región, que empieza desde el primer contacto entre la sonda que se esta empleando en la prueba con la papa frita hasta la primer gran caída en la fuerza, esta fue asociada con una mayor fractura estructural; en esta primer región la sonda deforma principalmente a la papa frita y la fuerza incrementa casi linearmente con respecto al tiempo (Vincent, 1998; Salvador, Varela, Sanz , & Fiszman, 2009). La segunda región empieza desde el primer pico máximo de fuerza de quiebre hasta el final de la curva; esta zona se caracteriza por el incremento de picos que estan asociados con la crujencia de la papa frita cuando se complementa el estudio de textura con pruebas de sonido (Salvador, Varela, Sanz , & Fiszman, 2009).

## 2.4 CONCLUSIONES

La textura final de las papas fritas esta fuertemente influenciada por los parámetros fisico-químicos relacionados con el contenido de agua y de grasa en la papa, y estos a su vez dependen del proceso de freído. Por tanto, de acuerdo a los resultados obtenidos se puede concluir que el almacenamiento de las papas influye significativamente en el contenido final de acrilamida. También el grosor de la papa influyó significativamente en el contenido de acrilamida observandose que en el caso de las papas con grosor delgado el proceso de

escaldado funciona cuando las papas han sido almacenadas mientras que para las papas de grosor grueso el escaldado no contribuye en la disminución de acrilamida.

Por último, las condiciones que mostraron un efecto positivo entre las características sensoriales para las papas sin almacenamiento y el contenido de acrilamida tomando en cuenta un grosor delgado fueron las siguientes: 150 °C, 5 min de fritura y sin escaldado; mientras que para las papas almacenadas por 4 meses las condiciones fueron: 150 °C, 10 min de fritura y escaldado. Por otra parte, cuando el grosor es grueso las condiciones de freído fueron las siguientes: 150 °C, 10 min y sin escaldado.

# Capítulo 3

Efecto de los factores del  
procesado en la  
bioaccesibilidad de la  
acrilamida en papa frita.

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Toxicidad de la acrilamida

La acrilamida es un compuesto químico industrial que ha sido usado desde los años 1950's en la manufacturación de poliacrilamida. Este compuesto ha sido clasificado por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC por sus siglas en inglés) como un compuesto carcinógeno perteneciente al grupo 2A (Ayvaz & Rodríguez-Saona, 2015).

Una persona puede estar expuesta a este compuesto principalmente por la dieta que ingiere, al fumar cigarrillos o incluso como fumador pasivo. La acrilamida se absorbe mucho mejor cuando es ingerida por vía oral que por vía dérmica, además que por vía oral se distribuye rápidamente hacia los tejidos. La acrilamida puede ser carcinogénica después de su conversión metabólica hacia la glicidamida la cual es reactiva con el ADN (Smith, Perfetti, Rumble, Rodgman, & Doolittle, 2000)

De manera general cuando la acrilamida entra al organismo, después de la digestión y absorción, es excretada por la orina. Su tiempo medio de vida en el organismo es de 3.1-3.5 h. En el hígado la acrilamida se conjuga con el complejo tripéptidico conocido como Glutación y forma ácido mercaptúrico, el cual es excretado a través de la orina. Adicionalmente, la epoxidación de la acrilamida por acción de las enzima citocromo P450 2E1 forma a la glicidamida, la cual interactúa con el ADN ocasionando efectos mutagénicos. La glicidamida puede hidrolizarse y bio-transformarse en gliceramida o reaccionar con el glutatión y formar nuevamente ácido mercaptúrico (Fennell *et al.*, 2005). Por lo anteriormente mencionado la acrilamida exhibe una eliminación difásica con un tiempo de vida media inicial cercano a las 5 h y al final un tiempo de vida media de 8 días en los tejidos (Doerge, Young, McDaniel, Twaddle, & Churchwell, 2005).

Existen varios estudios que han tratado de demostrar la relación de la ingesta de acrilamida proveniente de alimentos y el riesgo de formación de cáncer en humanos, pero muchos de ellos han sido inconsistentes.

### 3.1.1 Carcinogenicidad de la acrilamida

Hasta ahora, los estudios epidemiológicos no son del todo claros y no demuestran de forma clara si la exposición dietética a la acrilamida puede aumentar el riesgo de cáncer en los humanos. Algunos resultados coinciden en señalar que no hay asociación entre la ingesta total de acrilamida en la dieta y el riesgo de contraer algunos tipos de cáncer (Mucci & Adami, 2009), mientras que algunos estudios donde se estudió el cáncer renal, de esófago, de ovario o de mama, resultan contradictorios (Wilson, Mucci, Rosner, & Willet, 2010; Larsson, Akesson, Bergkvist, & Wolk, 2009; Hogervorst, Schouten, Konings, Goldbohm, & van den Brant, 2007). Sin embargo, de forma general, los estudios epidemiológicos suelen tener limitaciones, ya sea en la evaluación de la exposición (generalmente con cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos), las co-exposiciones o la capacidad limitada para detectar pequeños aumentos en la incidencia de tumores (Mucci & Adami, 2009).

Un aspecto que se tiene que considerar es que, en los estudios de toxicidad aplicada a animales, específicamente a los roedores, la dosis empleada es superior a la que generalmente un humano consumiría. En el estudio realizado por Hogervost *et al.* (2010) que algunos tipos de cáncer se presentaban tanto en ratas como en humanos, mientras que otros exclusivamente en humanos, indicando que la genotoxicidad no puede ser el único mecanismo por el que la acrilamida causa cáncer, sino que también podría influir en el sistema hormonal, en el cual los roedores no son buenos modelos.

### 3.1.2 Metabolismo de la acrilamida

La acrilamida es un compuesto vinil conjugado, que tiene la facilidad de ser reactivo con materiales biológicos. El doble enlace presente en la molécula de acrilamida hace que reaccione con grupos tiol (-SH) presentes en la cisteína y también con grupos amino (-NH<sub>2</sub>) presentes en aminoácidos y proteínas. La glicidamida, un compuesto resultante de la oxidación metabólica de la acrilamida, reacciona de la misma manera a través de su anillo epóxido, aunque de una manera masiva con los grupos amino presentes en la bases del ADN. Las reacciones anteriormente mencionadas se rigen bajo la interacción de las proteínas con compuestos electrofílicos (Kocadagli & Gökmen, 2016)

La biodisponibilidad, metabolismo y el manejo de los metabolitos como bio-marcadores son de relevancia para entender el riesgo a la salud que se tiene al ingerir alimentos que contienen acrilamida.

### 3.1.3 Biodisponibilidad y absorción

La biodisponibilidad oral puede ser definida como la fracción de la dosis oral administrada que alcanza a entrar al sistema circulatorio. Debido a que la acrilamida es un compuesto altamente hidrofílico, esta se absorbe casi en su totalidad. Existen diversos estudios que han realizado pruebas en roedores y humanos, donde se observó que se absorbe rápidamente (Zhang, Ren, & Zhang, 2009).

Miller *et al* (1982) demostraron en un estudio en ratones que el 90% de acrilamida fue recuperada de tejidos, fluidos corporales, orina y heces después de administrar por medio de una sonda 10 mg kg<sup>-1</sup> de peso corporal de acrilamida marcada. Por otra parte, Kadry *et al* (1999) observaron que al administrar 50 mg kg<sup>-1</sup> de acrilamida marcada en ratas, la señal analítica apareció a los 5 min después de la exposición oral, mientras que en plasma se observó la señal a los 32 min y en una concentración promedio de 47 µg mL<sup>-1</sup>. Adicionalmente, se indicó que la biodisponibilidad varía fuertemente entre cada especie de ratones (Kocadagli & Gökmen, 2016). Aureli *et al.* (2007) evaluaron la diferencia en la absorción de la acrilamida proveniente de papas fritas y una solución acuosa de la misma cuando fueron administrados en cerdos. La relativa absorción de acrilamida proveniente de las papas y de la solución acuosa fue la misma tanto en bajas y altas dosis. Aunque la dieta que llevaban los cerdos con alimento estándar afectó a la biodisponibilidad en ambos grupos (Kocadagli & Gökmen, 2016).

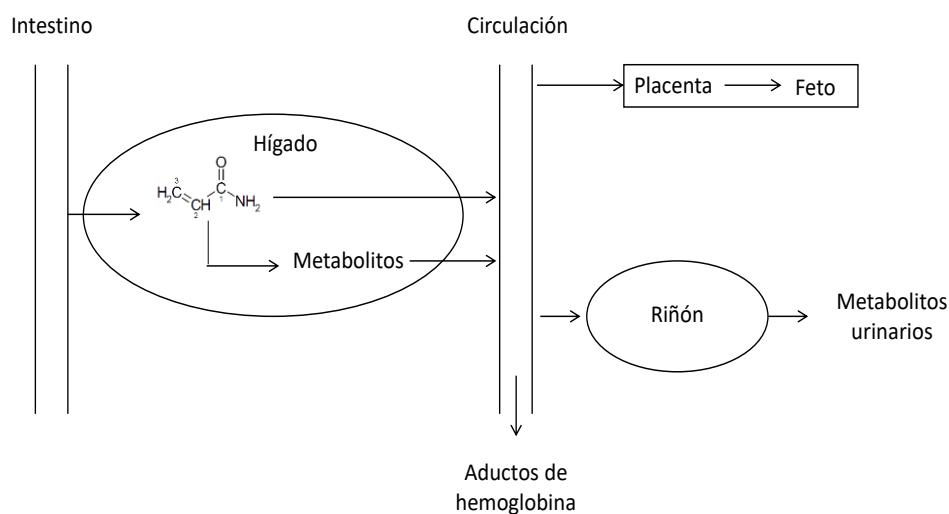
Los primeros estudios realizados en humanos se llevaron a cabo por Sörgel *et al.* (2002), ellos demostraron que al alimentar a voluntarios con pan crujiente y derivados de papa, la acrilamida se absorbía a nivel gastrointestinal y además la cantidad de éste compuesto que se excretaba por la orina variaba altamente, esto debido a la alta variabilidad en la biodisponibilidad oral y/o el metabolismo hepático de cada individuo. Por otra parte, al administrar acrilamida en solución acuosa a voluntarios varones, Boettcher *et al.* (2006),

observaron que en el primer día un 51% de la dosis fue recuperada en la orina y en el segundo día se recuperó un 57% de la dosis administrada, con ello concluyeron que la velocidad metabólica en los humanos era más similar en ratas que en ratones.

Fuhr *et al.* (2006) evaluaron la toxico-cinética de la acrilamida en seis voluntarios jóvenes y sanos después de haber consumido papas fritas que contenían en promedio una concentración de  $0.94 \text{ mg kg}^{-1}$  de papa de este compuesto. Ellos observaron que el promedio acumulativo de la recuperación de acrilamida en orina representó un  $60 \pm 11 \%$  de la dosis administrada después de pasadas 72 h. Con ello se concluyó que la mayoría de la acrilamida ingerida a través de los alimentos es absorbida por los humanos.

### 3.1.4 Biotransformación

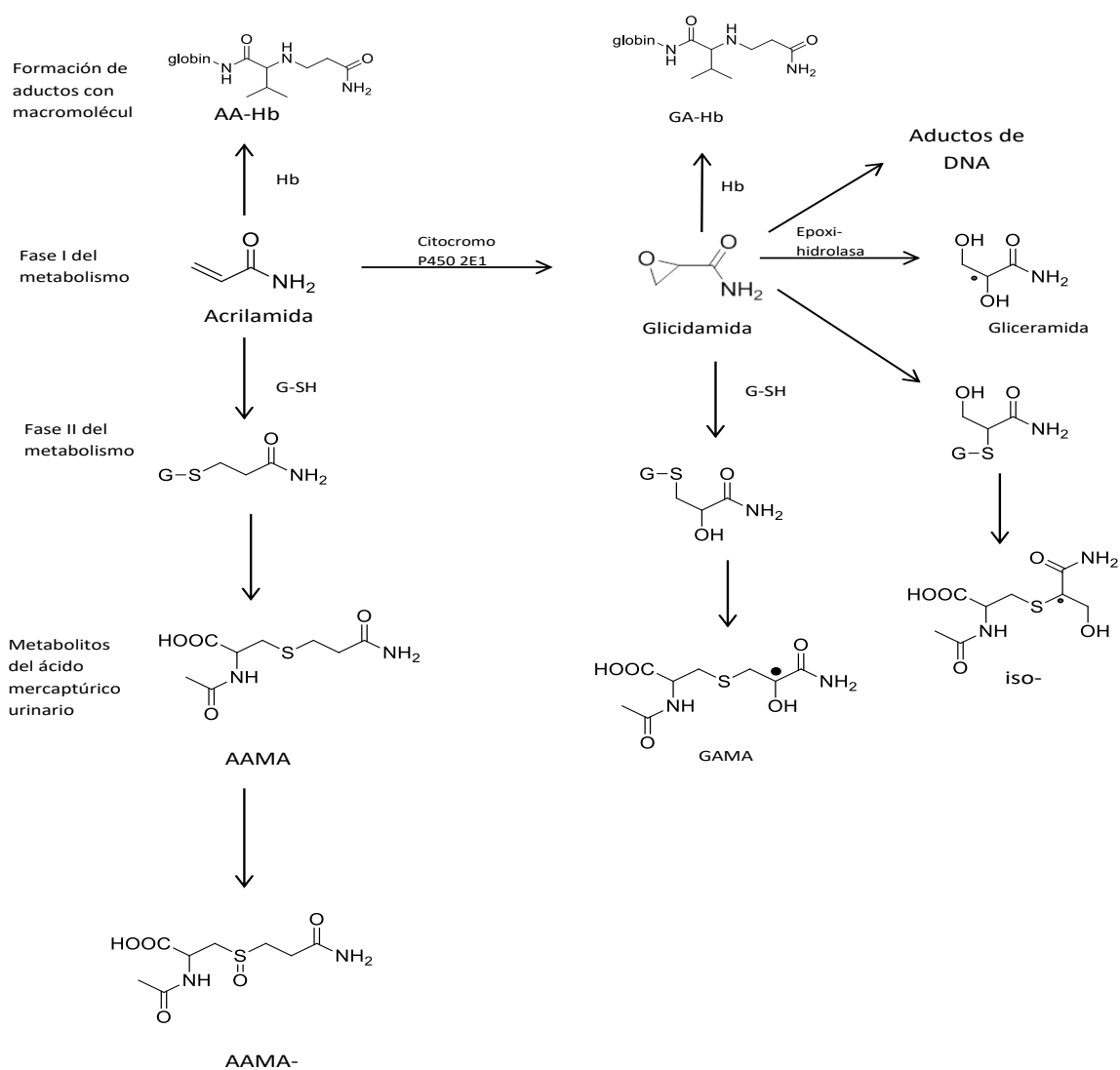
La absorción, distribución, metabolismo y excreción de la acrilamida se muestra en la Figura 19. Una vez que la acrilamida es ingerida, esta es absorbida rápidamente y distribuida a todos los tejidos del cuerpo humano por medio del sistema circulatorio. Por ello, es que se ha encontrado este compuesto en leche materna y en la placenta humana. La acrilamida puede transformarse en diversos metabolitos que son excretados por la orina. Se sabe que esta molécula puede interactuar con proteínas y el ADN formando aductos covalentes (Kocadagli & Gökmen, 2016).





**Figura 19:** Diagrama esquemático de la absorción, distribución, biotransformación y excreción de la acrilamida.

La acrilamida al poseer una  $\alpha,\beta$ -insaturación en su estructura con un grupo amida hace que sea altamente nucleofílica. Los compuestos nucleofílicos presentes en la célula reaccionan con el doble enlace de la acrilamida por medio de una adición química de Michael. Estos compuestos nucleofílicos incluyen a grupos  $-SH$  de la cisteína, homocisteína y el glutatión;  $\alpha-NH_2$  de aminoácidos libres y el N-amino terminal de residuos de aminoácidos de las proteínas, el  $\epsilon-NH_2$  de la lisina, y el grupo  $NH$  presente en el anillo de la histidina (Kocadagli & Gökmen, 2016).



**Figura 20:** Biotransformación de la acrilamida en humanos. Fuente: Kocadagli & Gökmen, 2016

Los grupos por los que más predilección tiene la acrilamida para reaccionar son con los sulfhidrilos (-SH) del glutatión y de las proteínas, para después reaccionar con los grupos amino de una manera menor (Kocadagli & Gökmen, 2016).

La acrilamida es convertida parcialmente a su epóxido llamada glicidamida, que también es un compuesto electrofílico y que se forma *in vivo* a través de una oxidación por el citocromo P450 2E1 en la fase I del metabolismo (Figura 20). Después, de una manera

similar a lo que hace la acrilamida, la glicidamida se une covalentemente a componentes celulares que contienen grupos sulfhidrilos y aminos formando aductos con ellos. Estas reacciones, junto con el agua, ocasionan una apertura del anillo del epóxido. La glicidamida después puede ser hidrolizada por medio de la epóxido-hidrolasa a gliceramida (2,3-dihidroxiopropionamida). Los nitrógenos nucleofílicos presentes en el ADN son susceptibles a formar aductos con la glicidamida, con esta interacción se puede explicar la genotoxicidad del metabolito de la acrilamida (Kocadagli & Gökmen, 2016).

En la fase II del metabolismo de la acrilamida suceden otro tipo de reacciones donde está molécula se conjuga con el glutatión. Después de la degradación y acetilación del conjugado resulta la formación del ácido mercaptúrico N-acetil-S-(2-carbamoiletil)-L-cisteína, el cual es excretado en la orina. La conjugación del glutatión es de vital relevancia para reducir la reactividad de la acrilamida contra componentes celulares, además que se forma una cantidad menor de glicidamida (Kocadagli & Gökmen, 2016).

La glicidamida además puede conjugarse con el glutatión y ser excretada por la orina después de su conversión metabólica a sus correspondientes ácido mercaptúricos: N-acetil-S-(2-carbamoil-2-hidroxietyl)-L-cisteína y N-acetil-S-(1-carbamoil-2-hidroxietyl)-L-cisteína. Aunque si bien la glicidamida ha mostrado una mayor reactividad que la acrilamida y más daño al ADN, la conversión de esta última hacia la glicidamida ha demostrado ser menos importante en humanos que en roedores (Kocadagli & Gökmen, 2016).

En las proteínas existen diversos sitios que poseen compuestos nucleofílicos que pueden formar aductos con la acrilamida y la glicidamida. Tomando en cuenta que en la sangre la albúmina y hemoglobina son las proteínas más predominantes, estas pueden formar aductos covalentes fuertes con las moléculas antes mencionadas. La valina es el residuo de aminoácido N-terminal de la hemoglobina y de todas las cuatro subunidades que la conforman. El N-terminal de la hemoglobina ha sido propuesto como el sitio nucleofílico más reactivo para varios compuestos electrofílicos, particularmente en humanos (Bergmark, Calleman, & Costa, 1993).

Los aductos que se forman entre la hemoglobina con la acrilamida o la glicidamida permanecen más tiempo en el cuerpo humano en comparación con sus formas libres o de sus derivados de ácidos mercaptúricos. Esto llega a afectar directamente en la reducción de la vida media de los eritrocitos que en promedio duran 4 meses en humanos (Kocadagli & Gökmen, 2016).

### *3.1.5 Estudios de simulación gastrointestinal in vitro.*

Como se mencionó anteriormente se han desarrollado varios estudios *in vivo* para conocer el metabolismo y el daño tóxico que ocasiona la acrilamida, pero una constante a la que se enfrentan regularmente es la variabilidad entre sujetos o animales de estudio, un factor que repercute bastante en la interpretación de resultados. Además de ello, la composición de la matriz o composición del alimento puede también intervenir de una manera negativa. Sumado a lo anteriormente mencionado se tienen factores como el costo, y problemas éticos hacen que los estudios *in vivo* sean complicados de analizar.

Los métodos *in vitro* que simulan el proceso de digestión son ampliamente usados en estudios donde se estudia el comportamiento de nutrientes, compuestos farmacéuticos y contaminantes presentes en alimentos durante dicho proceso. Los métodos *in vitro* tienen la ventaja de ser más rápidos, menos costosos, menos laboriosos y no tiene restricciones éticas. Esto permite que se puedan realizar relativamente más mediciones en muestras en paralelo con los objetivos de estudio (Minekus *et al.*, 2014).

La reproducibilidad y la facilidad de poder controlar las condiciones experimentales hace más sencillo el muestreo durante el experimento, por lo que los modelos *in vitro* son muy útiles para los estudios donde se estudian los mecanismos de absorción de nutrientes y así poder construir una hipótesis sobre su comportamiento (Sansano, Heredia, Peinado, & Andrés, 2017)

Al hablar de estudios *in vitro* diversos investigadores emplean los términos *biodisponibilidad* y *bioaccesibilidad*, términos muy importantes y que no deben confundirse. El primero se refiere a la proporción de un nutriente en que es digerido,

absorbido y metabolizado a través de las rutas metabólicas normales. Mientras que la bioaccesibilidad se refiere a la forma de cómo los nutrientes o compuestos tóxicos que son liberados del alimento que los contiene por medio de ensayos *in vitro* (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014)

Los métodos de digestión simulada *in vitro* por lo general incluyen las fases: oral, gástrica y de intestino delgado y en algunas ocasiones fermentaciones intestinales. Estos métodos tratan de mimetizar las condiciones fisiológicas *in vivo*, tomando en cuenta la presencia de enzimas digestivas tratando de asegurar las concentraciones a las que realmente se encuentran, el pH, el tiempo de digestión, la concentración de sales, entre otros aspectos (Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014; Minekus *et al.*, 2014). Algunos estudios han reportado la generación de fracciones bioaccesibles que pueden ayudar a elucidar de manera mas completa los mecanismos de digestión, para ello se suele emplear líneas celulares como la Caco-2 que simulan el tránsito intestinal (Minekus *et al.*, 2014). En los siguientes apartados se describirá lo que ocurre en cada fase de la simulación gastro intestinal.

#### 3.1.5.1 Fase oral

En la cavidad oral la textura de un alimento sólido cambia significativamente por la masticación y la salivación. El alimento es humedecido y lubricado por acción de la secreción salivar resultando un bolo de consistencia cohesiva que esta listo para digerir. La masticación es un proceso complejo que esta influenciado por múltiples factores como la composición del alimento, el volumen del alimento, el número de masticaciones que se realizan, la fuerza de la masticación, la condición dental del individuo y del grado de hábitos a la hora de comer (Fontjin-Tekamp *et al.*, 2000; Minekus *et al.*, 2014).

El tamaño de partícula que resulta de la masticación depende mucho del tipo de alimento y del tiempo de masticación, para lograr una mayor simulación de la masticación de manera *in vitro* se sugiere que el tamaño de partícula sea menor a 2 mm y el tiempo de masticación de 5 min, aunque el tiempo de masticación de manera *in vivo* sea mucho menor al tiempo sugerido (Minekus *et al.*, 2014).

La secreción salivar se ve fuertemente influenciada por el contenido de agua que contiene el alimento, el valor del pH que existe en la boca, la tensión superficial y la viscosidad. La saliva humana es un fluido complejo, la cual es producida por las glándulas que se encuentran en la parótida, en la parte sublingual y submandibular. La cantidad de saliva que produce el humano en promedio es de 1-1.5 L por día (Fontjin-Tekamp *et al.*, 2000).

La composición de la saliva en su mayoría es agua (99.5%) y un 0.3% esta constituido por proteínas así como también varios electrolitos como el sodio, potasio, calcio, magnesio, fosfato y bicarbonato. Otros componentes que la forman son la glucosa y productos nitrogenados como la urea. Las principales proteínas que podemos encontrar en la saliva son inmunoglobulina A,  $\alpha$ -amilasa, lisosima, lactoferrina así como también glicoproteínas mucosoidales (mucina); aunque si bien la mucina es el principal componente lubricante, éste se encuentra en concentraciones tan pequeñas que no es necesario añadirlo a los protocolos de simulación gastrointestinal (Minekus *et al.*, 2014).

La  $\alpha$ -amilasa tiene un pH óptimo de 6.8, aunque su actividad se ve limitada a actuar solo en la cavidad bucal y las primeras etapas de la digestión gástrica. Esta enzima se inactiva cuando el medio se vuelve ácido y por la actividad proteolítica que ocurre en el estómago. Se tiene reportado que durante los primeros 20-30 s de la fase oral, el 50% del almidón presente en un bocado de pan y un 25% del almidón presente en un bocado de espagueti son hidrolizados. El tracto óseo-fágico es un proceso corto con un tránsito de apenas unos segundos y que en realidad no afecta en el proceso de digestión (Hoebler *et al.*, 1998; Minekus *et al.*, 2014).

### 3.1.5.2 Fase gástrica

El estómago puede ser considerado como una especie de bolsa donde el alimento es procesado y almacenado antes de ser transferido al intestino delgado. El estómago está constituido de tres regiones principales con diferentes funciones fisiológica: sección

superior (cardia), sección media (fundus) y la sección baja (antro). La función principal del fundus es la secreción de jugo gástrico el cual contienen ácidos y enzimas, mientras que la principal función del antro es el de generar fuerzas para poder mezclar el bolo alimenticio (McClements & Li, 2010) .

El tiempo necesario para que el estómago se encuentre vacío después de haber ingerido un alimento sólido, es de 3-4 h. Esta duración puede disminuir hasta una hora cuando el alimento es homogenizado a tamaños de partículas menores a 2mm y en alimentos líquidos el tiempo apenas alcanza unos 40 min (Minekus *et al.*, 2014).

El volumen total de la secreción gástrica depende del estado nutricional del individuo y en consecuencia también de la consistencia del alimento ingerido. Un alimento líquido solo requiere de la mitad del volumen de la secreción gástrica total, en contraste un alimento sólido se requiere de dos veces de los líquidos secretados en el estómago. La secreción de líquidos gástricos durante la primera hora representa la mitad del volumen total tanto para líquidos como para sólidos (Minekus *et al.*, 2014).

El pH del estómago humano se encuentra entre 1-3 bajo las condiciones de ingesta debido a la secreción de ácido clorhídrico, éste valor de pH permite la actividad óptima de las enzimas que se encuentran en el estómago. Cuando existe un pH medio ácido (4-6) la actividad enzimática de la lipasa gástrica se ve beneficiada, mientras que a un valor de pH de 2-3 la enzima que se activa es la pepsina (McClements & Li, 2010).

La pepsina es la única enzima proteolítica que se encuentra en el estómago humano, de cualquier forma, existen varias isoformas de ella. El contenido de pepsina que se puede encontrar en el estómago humano varía entre individuos, pero, se sabe que incrementa durante la digestión de 0.26 (30 min) a 0.58 mg mL<sup>-1</sup> (180 min). Debido a que existe una similitud del 84% entre la pepsina humana y la porcina, se ha elegido a ésta última como un buen sustituto durante la simulación gástrica *in vitro* (Fujinaga, Chernaia, Tarasova, Mosimann, & James, 1995; Minekus *et al.*, 2014).

En el estómago humano también se puede encontrar en menor cantidad la presencia de la enzima lipasa gástrica y fosfolípidos que también se encuentran en pequeñas cantidades y que su principal función es llevar a cabo una lipólisis parcial y la generación de micelas por medio de la emulsificación de las grasas, esto como resultado ocasiona que la emulsificación de las grasas en el intestino delgado sea más fácil. Debido a que se encuentran en pequeñas cantidades no es necesario añadirlas al proceso de digestión *in vitro* (Minekus *et al.*, 2014).

#### 3.1.5.3 Fase intestinal

El intestino delgado es la región del tracto gastrointestinal que es considerado como una especie de tubo con un diámetro aproximado de entre 2.5 a 3 cm y que consiste de tres partes principales duodeno (cerca de 26 cm de largo), yeyuno (cerca de 2500 cm de largo) y el íleon (3500 cm de largo). Después de que el quimo entre en la parte del duodeno, se empieza a mezclar con bicarbonato de sodio, sales biliares, fosfolípidos y enzimas secretadas por el hígado, páncreas y la vesícula biliar (McClemments & Li, 2010; Carbonell-Capella, Buniowska, Barba, Esteve, & Frígola, 2014).

El bicarbonato de sodio secretado dentro del intestino delgado causa un incremento en el valor de pH llevándolo de un valor de 1-3 como se encuentra en el estómago, hasta un valor de pH cercanamente neutral de 5.8 a 6.5 en el duodeno, donde las enzimas pancreáticas trabajan más eficientemente. La fuerza iónica es particularmente importante porque esto influye en la magnitud en la que pueden existir interacciones en el sistema (McClemments & Li, 2010).

Los componentes más importantes de la simulación intestinal (intestino delgado) *in vitro* son las enzimas pancreáticas y la bilis. Se recomienda que ambas sustancias sean de origen porcino para poder llevar a cabo de la mejor forma la simulación y también por los costos que generan su adquisición (Minekus *et al.*, 2014).

La pancreatina porcina se encuentra disponible fácilmente y contiene las más importantes enzimas pancreáticas en diferentes cantidades, la medición de su eficiencia se basa en la



capacidad de la tripsina, para ello se realiza un ensayo con la *p*-tolueno-sulfonil-L-arginina metil ester (TAME). La cantidad de pancreatina añadida en el ensayo *in vitro* debe ser lo suficiente para proporcionar 100 TAME unidades por mililitro del contenido de la fase intestinal. En caso que no se tenga disponibilidad de la pancreatina porcina se pueden emplear las enzimas tripsina y quimiotripsina, aunque también se debe de asegurar su actividad enzimática igualando la acción al realizar el ensayo con el TAME (Minekus *et al.*, 2014).

La bilis es importante para el transporte de los productos resultantes de la lipólisis. En un intestino adulto la concentración de bilis que se suele encontrar es de 10 mM en el fluido total. Se sugiere que para las pruebas *in vitro* la fuente de bilis sea de cerdo o extracto de bilis bovino o de bilis porcina congelada, la cual es fácilmente extraída de la vesícula biliar del cerdo. Generalmente la concentración de sales biliares que se añaden al inicio de la simulación es de 20 mM para que al final del proceso se obtenga una concentración de aproximadamente 10 mM (Minekus *et al.*, 2014).

#### 3.1.5.4 Solubilidad y diálisis

Complementando el proceso de simulación gastrointestinal se pueden añadir otras etapas en las que se trata de estudiar el proceso de absorción de los nutrientes o de los compuestos tóxicos presentes en alimentos a través del intestino. Posterior a la culminación de la fase intestinal se puede realizar una estimación de la fracción del componente estudiado soluble (fracción bioaccesible) o dializable a través de una membrana semipermeable de determinado tamaño de poro (Cilla, 2010).

Existen también los métodos que se basan en evaluar la solubilidad, ya que tras la digestión gastrointestinal se mide la cantidad de componentes solubles en el sobrenadante obtenido por centrifugación o filtración y así se estima la fracción máxima de componente ingerido disponible para ser absorbido (Versantvoor *et al.*, 2005; Cilla 2010).

Además de los dos métodos anteriormente mencionados, existe un tercero que resulta de la combinación de los dos, éste métodos es la dializabilidad, aquí se incorpora una membrana

de diálisis durante el proceso gastrointestinal, para simular una difusión pasiva a través del epitelio intestinal. El proceso de diálisis puede llevarse a cabo en equilibrio o en continuo. Esos métodos sólo proporcionan información relativa a la fracción del componente soluble que se encuentra potencialmente disponible para la absorción que tiene un tamaño inferior al del poro de la membrana de diálisis (Cilla 2010).

Existen también experimentos *in vitro* que utilizan cultivos celulares, esto permite evaluar los procesos de captación y transporte en el epitelio intestinal a partir de la fracción bioaccesible obtenida del alimento (Ekmekcioglu *et al.*, 2002). La línea celular más utilizada, son las células Caco-2, modelo validado de epitelio intestinal.

La línea celular Caco-2 se estableció en 1977 por Fogh y colaboradores a partir de un adenocarcinoma de colon humano, moderadamente bien diferenciado de un paciente de 72 años. Estas células crecen en cultivo adheridas a un sustrato formando una monocapa. Cuando alcanzan la confluencia se diferencian espontáneamente para dar lugar a una monocapa polarizada que presenta muchas de las características funcionales y morfológicas de los enterocitos humanos maduros: organización de las células dentro de una monocapa polarizada, formación de domas, uniones intercelulares estrechas, microvellosidades en el lado apical y enzimas de secreción propias de la membrana del borde en cepillo como fosfatasa alcalina, sacarasa-isomaltasa, lactasa, etc. (Cilla 2010).

### *3.1.6 Bioaccesibilidad de la acrilamida*

Con respecto a la bioaccesibilidad de la acrilamida existen pocos reportes sobre este tema. Eriksson & Karlsson (2006) estudiaron el efecto de las enzimas digestivas y el pH en la extracción de la acrilamida, para ello utilizaron una extracción con pepsina en condiciones ácidas a 37°C durante 72 h. Schabacker *et al.* (2004) empleó un modelo donde incluyó la utilización de la línea celular humana Caco-2 para poder explicar la reducción del contenido de acrilamida durante la fase intestinal. Hamzalioglu & Gökmen (2015) estudiaron la influencia de la digestión gastrointestinal de bizcochos y productos de papa fritos. Por último se encontró el estudio realizado por Sansano *et al.* (2017) donde evaluaron el comportamiento de la acrilamida durante el proceso de digestión

gastrointestinal simulada de nueve productos representativos que contienen alto contenido de acrilamida además de probar el método de freído de papas por el método convencional de sumergimiento en aceite y por el método de aplicación de aire caliente y ver si existían diferencias en el porcentaje de bioaccesibilidad de acrilamida entre ambos métodos.

Debido a lo anteriormente mencionado, en el presente capítulo se investigó la influencia que tienen las modificaciones en el proceso de freído y del tiempo de almacenamiento de las papas crudas, sobre el porcentaje final de la bioaccesibilidad de la acrilamida presente en las papas fritas, al implementar un método de simulación gastrointestinal *in vitro* que constó con la simulación de las fases: oral, gástrica e intestinal; seguida del proceso de diálisis por medio de la utilización de una membrana semipermeable.

## 3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.2.1 Reactivos

Se utilizó acrilamida y 2-naftalentiol que fueron obtenidos de la casa comercial Sigma-Aldrich (San Luis, MO, USA), el cloruro de potasio, bicarbonato de sodio, cloruro de sodio hexahidrato se adquirieron en la casa comercial MEYER (Ciudad de México, México). Las enzimas pepsina ( $\geq 250$  U  $\text{mg}^{-1}$  sólido) de la mucosa gástrica porcina, pancreatina ( $4 \times$  USP) del páncreas porcino,  $\alpha$ -amilasa de la saliva humana (500 U) se adquirieron de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania). Las sales biliares porcinas también se compraron a Sigma Aldrich (Deisenhofen, Alemania). El acetonitrilo (grado HPLC) y el ácido acético se obtuvieron de la casa comercial J.T. Baker (Philisburg, NJ, EE. UU.).

### 3.2.2 Experimentación

Con el fin de evaluar la influencia de ciertos parámetros del proceso de fritura sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida y su efecto en otros parámetros fisicoquímicos y sensoriales, se utilizó un diseño de experimentos factorial fraccionado  $2^{k-1}$  por duplicado idéntico al planteado en el capítulo anterior del tipo. Se consideraron los siguientes parámetros: Temperatura (150-180°C), tiempo de freído (5-10 min), grosor (0.16-0.22 mm) y escaldado (0-5 min a 70°C).

La matriz experimental que se utilizó se muestra en la Tabla 16, la variable de respuesta evaluada fue: el porcentaje de bioaccesibilidad

**Tabla 16:** Matriz de diseño de experimentos para evaluación de bioaccesibilidad de la acrilamida en papas fritas

Experimento	Temperatura de freído (°C)	Tiempo de freído (min)	Grosor (mm)	Escaldado	Código
1	150	5	0.16	0	150-5-D-NE
2	150	10	0.22	0	150-10-G-NE
3	150	10	0.16	1	150-10-D-E
4	150	5	0.22	1	150-5-G-E
5	180	10	0.16	0	180-10-D-NE
6	180	5	0.22	0	180-5-G-NE
7	180	5	0.16	1	180-5-D-E

### 3.2.2.1 Ensayo de bioaccesibilidad

Para la evaluación de la bioaccesibilidad se realizó de acuerdo al protocolo propuesto por Minnekkus *et al.* (2014) y Hamzalioguh & Gökmen (2015) con algunas modificaciones. Se prepararon una serie de soluciones electrolíticas a las que se nombraron de la siguiente manera: Solución de fluido salival (SFS), solución de fluido gástrico (SFG) y solución de fluido intestinal (SFI). La composición de cada solución se muestra en la Tabla 17.

**Tabla 17:** Composición de las soluciones electrolíticas utilizadas en el proceso de simulación gastrointestinal *in vitro*.

Constituyente	SFS	SFG	SFI
	pH 7	pH 3	pH 7
	Conc. En fluido	Conc. En fluido	Conc. En fluido
	mmol L <sup>-1</sup>	mmol L <sup>-1</sup>	mmol L <sup>-1</sup>
KCl	15.1	6.9	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.7	0.9	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	13.6	25	85
NaCl	--	47.2	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	0.15	0.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.06	0.5	--
Ajuste de pH			
NaOH	--	--	--
HCl	1.1	15.6	8.4

SFS: solución de fluidos salivales; SFG: solución de fluidos gástricos y SFI: solución de fluidos intestinales.

A partir de las soluciones descritas anteriormente se procedió a realizar el protocolo de bioaccesibilidad como se detalla a continuación: Se pesaron 5 g de papa triturada que se encontraban previamente homogenizadas y se transfirieron a un tubo de centrifuga Falcon con capacidad de 50 mL. Se adicionaron 3.5 mL de la solución de fluidos salivales más 0.5 mL de una solución de  $\alpha$ -amilasa (1500 U mL<sup>-1</sup>), seguido de 25  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (0.3M) y 975  $\mu$ L de agua. Se agitó por 2 min para simular la fase oral. Concluido el tiempo se adicionó una solución de pepsina (5 mL, 12.5 mg mL<sup>-1</sup> en HCl 0.1 M) junto con 10 mL de una solución de la solución de fluidos gástricos (SFG), el pH se ajustó a un valor de 2.0 y se dejó incubar a 37 °C por 2 h con agitación a 60 rpm, esto para simular la fase gástrica de la

digestión. Transcurrido el tiempo de la simulación gástrica se amortiguó el pH a un valor de 7.5 e inmediatamente se adicionaron 20 mL de una solución de sales biliares (10 mg mL<sup>-1</sup> utilizando la SFI para disolver las sales) y 5 mL de una solución de pancreatina (10 mg mL<sup>-1</sup> en agua), se añadieron gotas de HCl 3 M para ajustar nuevamente el pH a 7.5 y se dejó incubar a 37 °C por 2 h con el mismo ciclo de agitación, lo anteriormente mencionado se realizó para simular la fase intestinal de la digestión.

Finalmente se realizó un proceso de diálisis de acuerdo al protocolo reportado por Ramírez-Moreno *et al.* (2017). Para tal fin, se usó una membrana semipermeable (Spectra/por dialysis MWCO: 6-8000) donde fue colocado el contenido final del proceso de simulación intestinal. La membrana se puso en contacto con 250 mL de NaHCO<sub>3</sub> 0.01 M ajustado a un pH=7.0 y se dejó incubar a 37°C por 16 horas. Al término del proceso se procedió a filtrar la muestra a través de un papel filtro Whatman del número 2, la parte retenida en el papel se trasladó a una caja Petri y se secó a 37 °C en el horno de secado. Al polvo obtenido (1 g aproximadamente) se le realizó el análisis de acrilamida.

#### 3.2.2.2 *Análisis de acrilamida*

El análisis de acrilamida para este ensayo se realizó por medio de una extracción acuosa del polvo obtenido del proceso de diálisis. A un gramo de polvo se le adicionaron 10 mL de agua, se agitó por 5 min y después se centrifugó a 5000 rpm por 10 min. El sobrenadante obtenido se desengrasó adicionando hexano (1:1), después se agitó por 5 min e inmediatamente se centrifugó por 10 min a 5000 rpm, la fase orgánica fue retirada una vez que el proceso de remoción de grasa terminó. El líquido desengrasado se centrifugó a 2500 rpm y el líquido remanente se filtró a través de papel filtro. Se tomó una alícuota de 1 mL y se procedió a realizar el proceso de derivatización usando al 2-naftalentiol como derivatizante para la determinación de acrilamida por medio de HPLC-FLD de acuerdo a lo mencionado en el capítulo 1.

#### 3.2.3 *Análisis estadístico*

El diseño de experimentos que se empleó para evaluar el efecto de los parámetros del proceso de fritura de las papas sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de acrilamida fue exactamente el mismo al descrito en el capítulo 2. Donde se empleó un diseño factorial fraccionado  $2^{k-1}$ , donde los factores que se evaluaron fue la temperatura de freído (150-180°C); tiempo de freído (5-10 min); escaldado (con escaldado y sin escaldado) y grosor de las papas (0.16-0.22 mm). El diseño se realizó por duplicado y cada experimento que marcaba el diseño se realizó por triplicado. El paquete estadístico que se empleó fue el programa MINITAB V15.1.

El porcentaje de acrilamida bioaccesible fue analizado estadísticamente por medio de un análisis de varianza ANOVA con un nivel de significancia de  $P < 0.05$ . Todos los datos fueron analizados usando el paquete estadístico de STATGRAPHICS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado.

### 3.3 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las papas fritas han sido marcadas como uno de los principales alimentos que contribuyen a la ingesta de acrilamida en la dieta, por ello la relevancia de estudiar qué es lo que pasa una vez que ingerimos este compuesto a través de este tipo de alimento.

#### 3.3.1 Análisis de correlaciones

Para este apartado también se examinó si existía alguna correlación de importancia de las variables del procesado de fritura sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de la acrilamida. Los resultados se muestran en la Tabla 18.

**Tabla 18:** Correlaciones momento producto de Pearson obtenidas, para evaluar el grado de correlación de las distintas variables con la bioaccesibilidad

Variable	Correlaciones (r)						
	Acrilamida	Aw	% Humedad	% Grasa	L	a	B
% bioaccesibilidad	0.3972*	-0.473*	-0.4107*	0.2169*	0.3594*	0.5252*	0.3868*

\* nivel de significancia (p<0.001)

De acuerdo a los resultados obtenidos, la correlación entre el porcentaje de bioaccesibilidad de la acrilamida con el contenido total inicial de este compuesto no mostró un buen valor de correlación, lo cual indica que la bioaccesibilidad no depende solo de la concentración presente, y que aunque se trata de la misma matriz alimentaria, la forma de procesarla afecta a la bioaccesibilidad. La bioaccesibilidad de cualquier nutriente o compuesto tóxico presente en el alimento depende de la matriz alimentaria que lo contiene (Schabacker , Schwend , & Wink, 2004).

La correlación obtenida entre la bioaccesibilidad de la acrilamida y los parámetros de contenido de agua (Aw y humedad) fue negativa y su valor tampoco parece influir en la bioaccesibilidad de la acrilamida. En cuanto a los parámetros relacionados con la medición del color, el valor de correlación que mayor valor estadístico tuvo fue el de a. Esto posiblemente se relaciona con lo mencionado en el capítulo anterior, donde este parámetro se podía correlacionar con el contenido de acrilamida formado durante el proceso de freído (Pedreschi F. , Moyano, Kaak, & Granby, 2005 ), este a su vez depende de la cantidad que se puede liberar de la papa y ser bioaccesible.



### 3.3.2 Efecto de la conservación de las papas sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida

Al evaluar el efecto de almacenamiento sobre el porcentaje de bioaccesibilidad se obtuvieron los resultados que se muestran en la Tabla 19.

**Tabla 19:** Matriz experimental con los resultados obtenidos de la bioaccesibilidad de la acrilamida con respecto al proceso de fritura y el tiempo de almacenamiento.

Conservación (meses)	Código	Contenido inicial de AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) $\pm$ sd	Contenido final de AA ( $\mu\text{g kg}^{-1}$ ) $\pm$ sd en el residuo	% de bioaccesibilidad de AA
0	150-5-NE-D	973 $\pm$ 71 <sup>bc</sup>	124 $\pm$ 79 <sup>bcd</sup>	87.2 $\pm$ 7.8 <sup>b</sup>
0	150-10-NE-G	795 $\pm$ 63 <sup>ab</sup>	171 $\pm$ 26 <sup>de</sup>	78.5 $\pm$ 2.0 <sup>a</sup>
0	150-10-E-D	1483 $\pm$ 118 <sup>d</sup>	161 $\pm$ 64 <sup>cde</sup>	89.2 $\pm$ 3.4 <sup>b</sup>
0	150-5-E-G	885 $\pm$ 62 <sup>ab</sup>	184 $\pm$ 8 <sup>e</sup>	79.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>
0	180-10-NE-D	2590 $\pm$ 243 <sup>e</sup>	73.4 $\pm$ 27 <sup>ab</sup>	97.1 $\pm$ 1.2 <sup>c</sup>
0	180-5-NE-G	752 $\pm$ 92 <sup>a</sup>	170 $\pm$ 21 <sup>cde</sup>	76.9 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>
0	180-5-E-D	1138 $\pm$ 320 <sup>c</sup>	36 $\pm$ 10 <sup>a</sup>	96.6 $\pm$ 1.3 <sup>c</sup>
0	180-10-E-G	2480 $\pm$ 204 <sup>e</sup>	117 $\pm$ 66 <sup>c</sup>	95.4 $\pm$ 2.6 <sup>c</sup>
4	150-5-NE-D	1554 $\pm$ 343 <sup>bc</sup>	458 $\pm$ 161 <sup>b</sup>	71.0 $\pm$ 5.2 <sup>a</sup>
4	150-10-NE-G	890 $\pm$ 52 <sup>a</sup>	336 $\pm$ 307 <sup>ab</sup>	91.2 $\pm$ 2.6 <sup>bc</sup>
4	150-10-E-D	825 $\pm$ 67 <sup>a</sup>	159 $\pm$ 140 <sup>a</sup>	81.8 $\pm$ 16.0 <sup>ab</sup>
4	150-5-E-G	1097 $\pm$ 407 <sup>a</sup>	282 $\pm$ 59 <sup>ab</sup>	71.2 $\pm$ 16.0 <sup>a</sup>
4	180-10-NE-D	4386 $\pm$ 540 <sup>e</sup>	409 $\pm$ 32 <sup>b</sup>	91.2 $\pm$ 6.1 <sup>bc</sup>
4	180-5-NE-G	1149 $\pm$ 164 <sup>ab</sup>	155 $\pm$ 24 <sup>a</sup>	85.9 $\pm$ 4.1 <sup>bc</sup>
4	180-5-E-D	1812 $\pm$ 146 <sup>c</sup>	467 $\pm$ 164 <sup>b</sup>	73.9 $\pm$ 9.9 <sup>a</sup>
4	180-10-E-G	3540 $\pm$ 769 <sup>d</sup>	132 $\pm$ 13 <sup>a</sup>	96.0 $\pm$ 2.0 <sup>c</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Temperatura (150-180 °C), Tiempo de fritura (5-10 min), escaldado (no escaldado y escaldado) y grosor (Delgado y Grueso).

Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Como consecuencia de los resultados obtenidos se puede observar que al finalizar el proceso de simulación gastrointestinal existe una disminución drástica en el contenido de acrilamida en el residuo de la papa en comparación con el contenido inicial, lo anteriormente mencionado se ve reflejado en altos porcentajes de bioaccesibilidad conseguidos, ya que se obtuvo en promedio un porcentaje cercano al 85% de bioaccesibilidad de la acrilamida. Lo que nos lleva a afirmar que la acrilamida es altamente bioaccesible.

Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con lo obtenido por Sansaso *et al.* (2017) y Gókmen & Hanzagliu (2015). Ambos estudios reportan que durante la fase gástrica el contenido de acrilamida suele incrementarse debido a que el pH que existe en el estómago favorece la conversión de precursores de acrilamida que se generaron durante el proceso de freído. Además, la proteólisis que ocurre durante el proceso gástrico junto con las fuerzas mecánicas que ocurren en el estómago deben de favorecer la liberación de la acrilamida que se encuentra embebida dentro de la matriz alimentaria que la contiene.

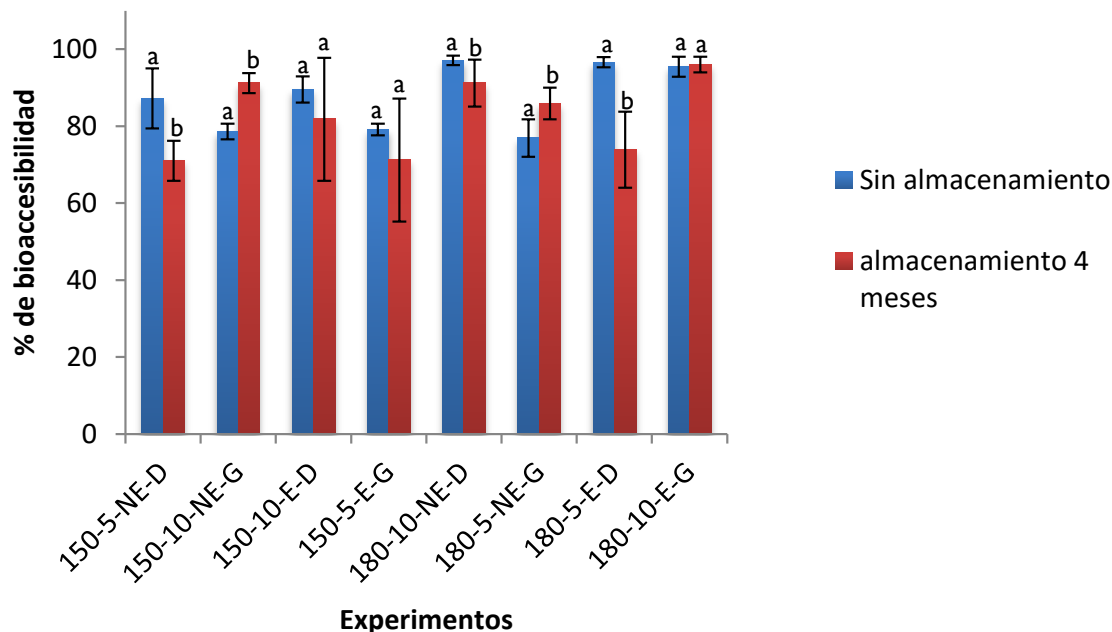
De acuerdo a lo reportado por Sansaso *et al.* (2017) existe un incremento de acrilamida más lento en la fase gástrica en alimentos como las papas fritas, papas a la francesa y “nuggets”, lo cual sugiere que la matriz alimentaria juega un rol importante en la liberación de la acrilamida.

Durante la fase gástrica del proceso de digestión, la pepsina hidroliza a las proteínas presentes en la papa generando pequeñas cadenas de péptidos y algunos residuos de aminoácidos, tales como la cisteína y la lisina que tienen un carácter nucleofílico (-SH y NH<sub>2</sub>). Estos pequeños péptidos son capaces de interactuar con la acrilamida y formar aductos, esto en consecuencia puede causar una aparente reducción de acrilamida una vez que se inicie la fase intestinal (Delgado & Zamora, 2010; Sansano, *et al.* 2017).

Un comportamiento similar fue reportado por Schabacker *et al.* (2004) quienes demostraron que al emplear la línea celular Caco-2 la acrilamida interacciona con la albúmina de huevo por medio de la posible interacción de grupos -SH y -NH<sub>2</sub> que puedan estar presentes en la proteína y en consecuencia exista una atenuación en el contenido de acrilamida durante las condiciones que imperan en la fase intestinal. Aunque si bien, en el presente trabajo no se evaluó el contenido de acrilamida durante la fase gástrica e intestinal es importante entender que este comportamiento incide directamente en el contenido final de acrilamida después de terminar el proceso de gastrointestinal simulado.

Por otra parte, en la Figura 21 se puede observar que en la mayoría de los experimentos existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) en cuanto al porcentaje de

bioaccesibilidad para cada experimento cuando se compara la papa sin almacenamiento y con almacenamiento.



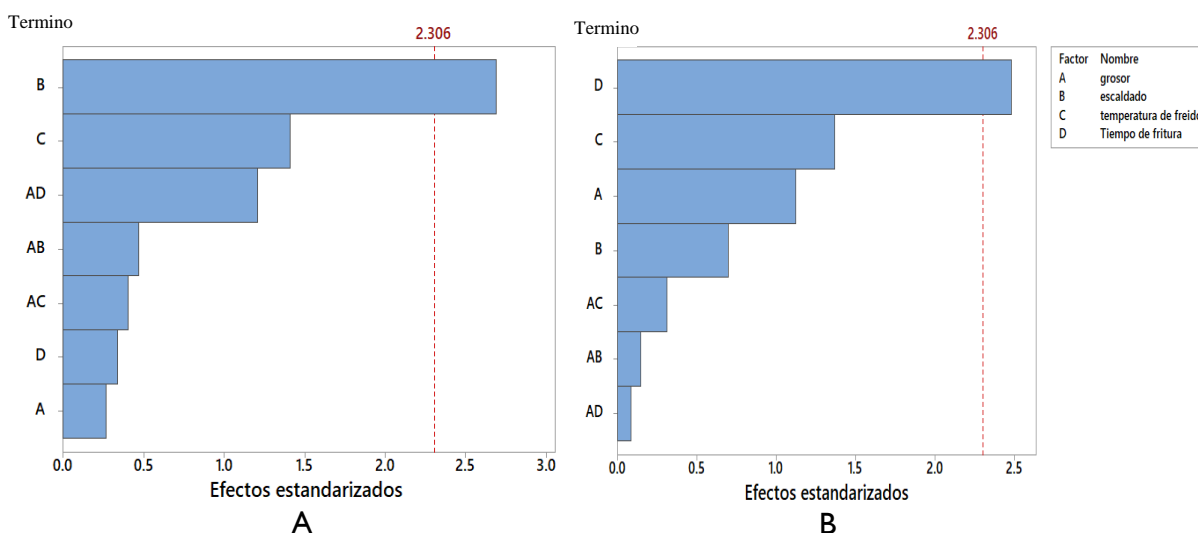
**Figura 21:** Gráfica de comparación del porcentaje de bioaccesibilidad con las papas sin conservación y conservación por 4 meses. Diferentes letras dentro del mismo experimento indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ) con ANOVA.

Al realizar el análisis estadístico del diseño de experimentos para ambos tiempos de almacenamiento de la papa, se encontró un comportamiento muy interesante con respecto a la influencia de los factores empleados en el diseño de experimentos sobre el porcentaje de bioaccesibilidad, que se comentará en el siguiente apartado.

### 3.3.3 Efecto del procesado sobre la bioaccesibilidad de la acrilamida

Para la papa que no fue almacenada, el efecto que más influyó en el porcentaje de bioaccesibilidad fue el escaldado de las papas crudas (Figura 22), mientras que para la papa que fue almacenada por 4 meses fue el tiempo de fritura.

En la papa sin almacenamiento se observó (Tabla 20) que las papas que fueron escaldadas, presentan un mayor porcentaje de bioaccesibilidad de acrilamida en comparación con las que no fueron escaldadas.



**Figura 22:** Diagrama de efectos estandarizados sobre el porcentaje de bioaccesibilidad de la acrilamida: A) papas recién cosechadas y B) papas almacenadas por 4 meses.

Se sabe que el proceso de escaldado se usa comúnmente como una estrategia de disminución de acrilamida en las papas fritas, ya que este pre-tratamiento promueve la lixiviación de los principales precursores que facilitan la formación de acrilamida (Pedreschi, *et al.* 2004).

**Tabla 20:** Resultados del contenido inicial de acrilamida y del porcentaje de bioaccesibilidad en función del proceso de escaldado para la papa sin almacenamiento.

<b>Papa no escaldada</b>		
Código	[AA]	% Bioaccesibilidad
150-5-D	973±71 <sup>bc</sup>	87.2±7.8 <sup>b</sup>
150-10-G	795±63 <sup>ab</sup>	78.5±2.0 <sup>a</sup>
180-10-D	2590±243 <sup>ab</sup>	97.1±1.2 <sup>c</sup>
180-5-G	752±92 <sup>a</sup>	76.9±4.9 <sup>a</sup>
<b>Papa escaldada</b>		
150-5-G	885±62 <sup>ab</sup>	79.1±1.5 <sup>a</sup>
150-10-D	1483±118 <sup>d</sup>	89.2±3.4 <sup>b</sup>
180-5-D	1138±320 <sup>c</sup>	96.6±1.3 <sup>c</sup>
180-10-G	2590±204 <sup>e</sup>	95.4±2.6 <sup>c</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Temperatura de fritura (150-180 °C), tiempo de fritura (5-10 min) y grosor (delgado-groeso). Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Este comportamiento quizá está relacionado con el hecho que durante el proceso del escaldado la papa sufre cambios en su microestructura (gránulos de almidón y degradación de la pared celular) que podría facilitar la interacción entre los precursores que forman a la acrilamida al momento del freído (Pedreschi, Mariotti, Granby, & Risum, 2011). También lo que podría suceder, es que al momento de sufrir cambios micro-estructurales, faciliten la liberación de la acrilamida que se forma durante el proceso, como es el caso del presente trabajo.

Por otra parte, para la papa almacenada por 4 meses se puede observar en la Tabla 21 que en la mayoría de los experimentos el porcentaje de bioaccesibilidad fue significativamente mayor ( $P < 0.05$ ) cuando se empleaban un mayor tiempo de freído en comparación de cuando se utilizaban menores tiempos.

**Tabla 21:** Resultados del contenido inicial de acrilamida y del porcentaje de bioaccesibilidad en función del tiempo de freído para la papa almacenada por 4 meses.

<b>Papa frita por 5 min almacenada</b>		
Código	[AA]	% Bioaccesibilidad
150-NE-D	1554±343 <sup>bc</sup>	71.0±5.2 <sup>a</sup>
150-E-G	1097±407 <sup>a</sup>	71.2±16.0 <sup>a</sup>
180-NE-G	1149±164 <sup>ab</sup>	85.9±4.1 <sup>cd</sup>
180-E-D	1812±146 <sup>c</sup>	73.9±9.9 <sup>a</sup>
<b>Papa frita por 10 min almacenada</b>		
150-NE-G	890±52 <sup>a</sup>	91.2±6.1 <sup>cd</sup>
150-E-D	825±67 <sup>a</sup>	81.8±16 <sup>ab</sup>
180-NE-D	4386±540 <sup>e</sup>	91.2±6.1 <sup>cd</sup>
180-E-G	3540±769 <sup>d</sup>	96.0±2.0 <sup>e</sup>

El código representa los valores de cada factor empleados en el diseño de experimentos; el orden es el siguiente: Tiempo de fritura (5-10 min), escaldado (escaldado y no escaldado) y grosor (delgado-grueso). Diferentes superíndices dentro de la misma columna indica que las medias difieren significativamente ( $P < 0.05$ ).

Se sabe que cuando se incrementa el tiempo de freído de las papas se aumenta la generación de acrilamida, lo que nos lleva a plantear la idea que al haber una mayor cantidad de éste compuesto, éste se puede acumular en la superficie de la papa y por tanto puede ser que se libere más rápido de la matriz alimentaria, este comportamiento se puede

responder con la evidencia que existen reportes que la concentración de acrilamida es mayor en la superficie de la papa ya que es más directo su contacto con el calor que se aplica al alimento (Pedreschi & Moyano, 2005).

Retomando los resultados del capítulo anterior se tiene que el experimento elegido como las mejores condiciones probadas para fritura de papa delgada “150-5-NE-D” y 150-10-E-D (cuando la papa lleva almacenada un tiempo) y gruesa “150-10-NE-G” mostraron un porcentaje de bioaccesibilidad del 71.0 y 92.0 % respectivamente, esta diferencia en el porcentaje se debe principalmente al tiempo de fritura empleado.

### **3.4 CONCLUSIONES**

En el presente estudio se encontró que durante la simulación de la fase intestinal y de diálisis la concentración de acrilamida disminuyó significativamente ( $P < 0.05$ ) en comparación con el contenido inicial de las papas fritas, encontrándose que la molécula de acrilamida es altamente bioaccesible (en promedio un 85%). Además se encontró que los factores de freído que influyen en la bioaccesibilidad de la acrilamida dependen del tiempo de almacenamiento de la papa cruda. Se encontró que en el caso de las papas sin almacenamiento el parámetro de freído que más influyó fue el escaldado, mientras que para las papas almacenadas por 4 meses el parámetro que más peso tuvo fue el tiempo de fritura.

## IV BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, C., Anzaldúa-Morales, R., Talamás, R., & Gastelúm, G. (1997). Low-temperature blanch improves textural quality of french fries. *Journal of Food Science* , 62:568-571.
- Akilen, R., Deljoomanesh, N., Hunschede, S., Smith, C., Arshad, M., Kubant, R., & Anderson, G. (2016). The effects of potatoes and other carbohydrate side dishes consumed with meat and food intake, glycemia and satiety response in children. *Nutrition & Diabetes*, 6(2):195-201.
- Albishiri, H., & El-Hady, D. (2014). Eco-friendly ionic liquid based ultrasonic assisted selective extraction coupled with a simple liquid chromatography for the reliable determination of acrylamide in food samples. *Talanta*, 118:129-136.
- Amrein, T., Limacher, A., Conde-Petit, B., Amado, R., & Escher, F. (2006). Influence of thermal processing conditions on acrylamide generation and browning in a potato model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54:5910-5916.
- Aráoz, R., Molgó, J., & Tandeu de Marsac, N. (2010). Neurotoxic cyanobacterial toxins. *Toxicon*, 56: 813-828.
- Aureli, F., Di Pasquale, M., Lucchetti, D., Aureli, P., & Coni, E. (2007). An absorption study of dietary administered acrylamide in swine. *Food Chemistry and Toxicology* , 45:1202-1209 .
- Ayvaz, H., & Rodríguez-Saona, L. (2015). Application of handheld and portable spectrometers for screening acrylamide content in commercial potato chips. *Food Chemistry*, 154-152.
- Baker, B., Benbrook, C., Groth, E., & Benbrook, K. (2002). Pesticide residues in conventional, integrated pest management (IPM)-grown and organic foods: Insights from three US data sets. *Food Additives and Contaminants*, 19: 427-446.
- Baumann, B., & Escher, F. (1995). Mass and heat transfer during deep-fat frying of potato slices. I. Rate of drying and oil uptake. *LWT-Food Science and Technology* , 28:395-403.
- Becalski, A., Y. Lau, B., Lewis, D., & Seaman, S. W. (2003). Acrylamide in foods: Occurrence, Sources, and modeling. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 802-808.
- Beisson, F., Li, Y., Bonaventure, G., Pollard, M., & Ohlrogge, J. (2007). The acyltransferase GPAT5 is required for the synthesis of suberin in seed coat and root of Arabidopsis. *Plant Cell*, 351-368.

- Bellisle, F., Dalix, A., Mennen, L., Galan, P., Hercberg, S., de Castro, J., & Gausseres, N. (2003). Contribution of snacks and meals in the diet of French adults: a diet-dietary study. *Physiology & Behavior*, 79: 183-189.
- Bergmark, E., Calleman, C., & Costa, L. (1993). Determination of hemoglobin adducts in humans occupationally exposed to acrylamide. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 120:45-54.
- Bermudo, E., Moyano, E., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2004). Microemulsion electrokinetic chromatography for the analysis of acrylamide in food. *Electrophoresis*, 25((18-19)), 3257-3262.
- Bermudo, E., Núñez, O., Puignou, L., & Galceran, M. T. (2006). Analysis of Acrylamide in Food Products by in-line preconcentration capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1129, 129-134.
- Bethke, P., & Bussan, A. (2013). Acrylamide in processed potato products. *American Journal of Potato Research*, 403-424.
- Blanco, C., Gómez, M., Ronda, F., & Caballero, P. (2006). *Técnicas avanzadas de procesado y conservación de alimentos*. Valladolid: Universidad de Valladolid.
- Blank, I. (2005). Current status of acrylamide research in food: Measurement, safety, assessment, and formation. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1043:30-40.
- Boettcher, M., Bolt, H., & Drexler, H. (2006). Excretion of mercapturic acids of acrylamide and glycidamide in human urine after single oral administration of deuterium-labelled acrylamide. *Archives of Toxicology*, 80: 55-61.
- Borouhaki, M., Nikkhah, E., Kazemi, A., Oskooei, M., & Raters, M. (2010). Determination of acrylamide level in popular Iranian Brands of potato and corn products. *Food Chemistry & Toxicology*, 48 (10): 2581-2584.
- Brinkmann, B. (2000). Quality criteria of industrial frying oils and fats. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 587-541.
- Califano, A., & Calvelo, A. (1987). Adjustment of surface concentration of reducing sugars before frying of potato strips. *Journal of Food Processing and Preservation*, 12:1-9.
- Camire, M., Kubow, S., & Donnelly, D. (2009). Potatoes and human health. *Critical reviews in food science and nutrition*, 49:823-840.
- Carbonell-Capella, J., Buniowska, M., Barba, F., Esteve, M., & Frígola, A. (2014). Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 13:155-171.



- Crews, C., Brereton, P., & Davies, A. (2001). The effects of domestic cooking on the levels of 3-monochloropropanediol in foods. *Food Additives and Contaminants*, 19:271-280.
- Dale, M., Griffiths, D., & Todd, D. (2003). effects of genotype, environment, and postharvest storage on the total ascorbate content of potato (*Solanum tuberosum*) tubers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(1):244-248.
- Davies, E. (1961). The infrared and Raman spectra and structure of acrylamide. *Journal of Molecular Spectroscopy*, 6:205-214.
- De Wilde, T., De Meulenaer, B., Mestdagh, F., Govaert, Y., Vandeburie, S., & Ooghe, W. (2005). Influence of storage practices on acrylamide formation during potato frying. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53: 6550-6557.
- Delator, T., Périsset, A., Goldmann, T., Riedeker, S., & Stadler, R. (2004). Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such a chocolate powder, cocoa, and coffe by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44:89-95.
- Dias Soares, C. M., Alves, R. C., Casal, S., Oliveira, M. B., & Oliveira Fernandes, J. (2010). Development and Validation of a Matrix Solid-Phase Dipersión Method to Determine Acrylamide in Coffee and Coffee Substitutes. *Journal of Food Science*, 75(3), T57-T63.
- Doerge, D., Young, J., McDaniel, L., Twaddle, N., & Churchwell, M. (2005). Toxicokinetics of acrylamide and glycidamide in Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 208(3):199-209.
- Duffey, K., Rivera, J., & Popkin, B. (2014). Snacking is prevalent in Mexico. *Journal of Nutrition*, 1843-1849.
- EC. (30 de November de 2017). *European Comission*. Obtenido de Commision regulation EU of 20 november 2017 establishing mitigation measures and benchmark levels for reduction of the presence of acrylamide in food: [http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:21ed1f21-ce21-11e7-a5d5-01aa75ed71a1000902/DOC\\_1&format=PDF](http://eur-lex.europa.eu/resource.html?uri=cellar:21ed1f21-ce21-11e7-a5d5-01aa75ed71a1000902/DOC_1&format=PDF)
- Elmore, J., Briddon, A., Dodson, A., Muttuccumar, N., Halford, N., & Mottram, D. (2015). Acrylamide in potato crisps prepared from 20 UK-grown varieties: effects of variety and tuber storage time. *Food Chemistry*, 182:1-8.
- Eriksson, S., & Karlsson, P. (2006). Alternative extraction techniques for analysis of acrylamide in food: influence of pH and digestive enzymes. *LWT- Food Science and Technology*, 39(4):393-399.

- Fennell, T., Summer, S., Snyder, R., Burgess, J., Spicer, R., & Bridson, W. (2005). Metabolism and hemoglobin adduct formation of acrylamide in humans. *Toxicology Sciences* , 85:447-459.
- Ferrer-Aguirre, A., Romero-González , R., Martinez-Vidal, J., & Garrido-Frenich, A. (2016). Simple and fast determination of acrylamide and metabolites in potato chips and grilled asparagus by liquid chromatography coupled to mass spectrometry . *Food Analytical Methods* , 9:1237-1245.
- Fontijn-Tekamp, F., Slagter, A., Van der Bilt, A., Van T´Hof, M., Witter, D., Kalk, W., & Jansen, J. (2000). Biting and chewing in overdentures, full dentures and natural dentitions . *Journal of Dental Research* , 79:1519-1524.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistr, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 51: 4504-4526.
- Fuhr, U., Boettcher, M., Kingzing-Schippers , M., Weyer, A., Jetter, A., Lazar, A., Taubert, T., Tomalik-Scharte, D., Pournara, P., Jakob, V., Harlfinger, S., Klaassen, T., Berkessel, A., Angerer, J. & Sörgel, F. (2006). Toxicokinetics of acrylamide in humans after ingestion of a defined dose in a test meal to improve risk assesment for acrylamide carcinogenicity. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* , 15:266-271.
- Fujinaga, M., Chernaia, M., Tarasova, N., Mosimann, S., & James, M. (1995). Crystal structure of human pepsin and its complex with pepstatin. *Protein Science* , 4(5):960-972.
- Garland, T., & Patterson, M. (1967). Six cases of acrylamide poisoning . *British Medical Journal* , 4:134-138.
- Garriguet, D. (2007). Canadians' eating habits . *Health Report* , 18: 17-32.
- Geng, Z., Jiang, R., & Chen, M. (2008). Determination of acrylamide in starch-based foods by ion-exclusion liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis* , 21:178-182.
- Gökmen , V. (2016). *Acrylamide in food analysis, content and potential health effects*. London: Academic Press .
- Gökmen, V., Senyuva, H. Z., Acar, J., & Sarioglu, K. (2005). Determination of Acrylamide in potato chips and crisps by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography* , 1088, 193-199.
- Gould, W. (2001). Potatoes and potato chips. En E. Lusas, & L. Rooney, *Snack Foods Processing* (pág. Section III). Florida : CRC press .
- Granda, C., Moreira, R., & Tichy, S. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato chips by low-temperature vacuum frying. *Journal of food science* , 69 [8], E405-E411.

- Haese, N., Matthäus, B., & Vosmann, K. (2003). Minimierungsasätze zur acrylamid-bildung in pflanzlichen lebensmitteln-aufgezeigt am beispiel von kartoffelchips. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, 99:87-90.
- Hamzalioglu, A., & Gökmen, V. (2014). Investigation of the reactions of acrylamide during in vitro multistep enzymatic digestion of thermally processed foods . *Food and Function*, 6(1):108-113.
- Han, K.-H., Matsumoto, A., Shimada, K.-I., Sekikawa, M., & Fukushima, M. (2007). Effects of anthocyanin-rich purple potato flakes on antioxidant status in F344 rats fed a cholesterol-rich diet. *British Journal of nutrition*, 98:914-921.
- Hara, S., Tsuchie, M., Tsujioka, R., Kimura, M., Fuji, M., Kuroda, T., & Ono, N. (2000). High performance liquid chromatographic quantification of busulfan in human serum after fluorescence derivatization by 2-naphtalenethiol. *Analytical Science* , 16 (3): 287-291.
- Harada, T., & Paulus, K. (1986). Analytical methods to characterize the cooking behavior . *LWT-Food science and technology*, 19:39-43.
- Harris, D. (2010). *Análisis químico cuantitativo*. Zaragoza: Editorial Reverté.
- Hess M, J., Jonnalagadda, S., & Slavin, L. (2016). What is a snack, why do we snack, and how can we choose better snacks? A review of the definitions of snacking, motivations to snack, contributions to dietary intake, and recommendations for improvement. *Advances in Nutrition*, 7 (3): 466-475.
- Hess, J., Jonnalagadda, S., & Slavin, J. (2016). What is a snack, why do we snack, and how can we choose better snacks? A review of the definitions of snacking, motivations to snack, contributions to dietary intake, and recommendations for improvement . *Advances in Nutrition* , 466-475.
- Hoebler, C., Karinhi, A., Devaux, M., Guillon , F., Gallant, D., Bouchet, B., Melegari, C. & Barry., J. (1998). Physical and chemical transformations of cereal food during oral digestion in human subjects. *The British Journal of Nutrition* , 80(5):429-436.
- Hoenicke , K., Gatermann, R., Harder, W., & Harting , L. (2004). Analysis of acrylamide in different foodstuffs using liquid chromatography- tandem mass spectrometry and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* , 520 (1-2):207-215.
- Hogervorst, J., Schouten, L., Konings, E., Goldbohm , R., & van den Brant, P. (2007). A prospective study of dietary acrylamide intake and the risk of endometrial, ovarian, and breast cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* , 16:2304-2313.

- Hu, Q., Xu, K., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., Fu, Y., & Li, Y. (2014). Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots. *Biosensors and Bioelectronics*, 54: 64-71.
- Hyung-Hee, L., & Ho-Sang, S. (2014). A new derivatization approach with D-Cysteine for the sensitive and simple analysis of acrylamide. *Journal of Chromatography A*, 1361 (26):117-124.
- Jessuzek, M., & Schieberle, P. (2003). A New LC/MS Method for the Quantitation of Acrylamide Based on a Stable Isotope Dilution Assay and Derivatization with 2-Mercaptobenzoic Acid. Comparison with Two GC/MS Methods. *Journal Of Agricultural and Food Chemistry*(51), 7866-7871.
- Kadry, A., Friedman, M., & Abdel-Rahman, M. (1999). Pharmacokinetics of acrylamide after oral administration in male rats. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7:127-133.
- Kepekci Tekkli, S. E., Önal, C., & Önal, A. (2012). A review of Current Methods for the Determination of Acrylamide in Food Products. *Food Analytical Methods* (5), 29\_39.
- Keramat, J., LeBail, A., Prost, C., & Soltanizadeh, N. (2011). Acrylamide in Foods: Chemistry and Analysis. A review. *Food Bioprocess Technology*(4), 340-363.
- Kim, C., Hwang, E., & Lee, H. (2006). An improved LC MS/MS method for the quantitation of acrylamide in processed foods. *Food Chemistry*, 101:401-409.
- Kocadagli, T., & Gökmen, V. (2016). Metabolism of acrylamide in humans and bioamarkers of exposure to acrylamide. En V. Gökmen, *Acrylamide in food analysis, content & potential health effects* (págs. 109-124). London: Academic Press.
- Koppelman, S., van Koningsveld, G., Knulst, A., Gruppen, H., Pigmans, I., & Jongh, H. (2002). Effect of heat-induced aggregation on the IgE binding of patatin (Sol t 1) is dominated by other potato proteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50:1562-1568.
- Krska, R., Becalski, A., Braekevelt, E., Koerner, T., Cao, X., Dabeka, R., Godefroy, S., Lau, B., Moisey, J., Rawn, D.F., Scott, P.M., Wang, Z. & Forsyth, D. (2012). Challenges and trends in the determination of selected chemical contaminants and allergens in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 139-162.
- Lagalante, A., & Felter, M. (2004). Silylation of acrylamide for analysis by solid-phase microextraction/gas chromatography/ion trap mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12):3744-3748.

- Larsson, S., Akesson, A., Bergkvist, L., & Wolk, A. (2009). Dietary acrylamide intake and prostate cancer risk in a prospective cohort of Swedish men. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 18:1939-1941.
- Lin, S., Akoh, C., & Reynolds, A. (2001). Recovery of used frying oils with adsorbent combinations: Refrying and frequent oil replenishment. *Food Research International*, 159-166.
- Lindsay, H. (1973). A colorimetric estimation of reducing sugars in potatoes with 3,5-dinitrosalicylic acid. *Potatoe Research*, 176-179.
- Lipoeto, N., Geok Lin, K., & Angeles-Agdeppa, I. (2013). Food consumption patterns and nutrition transition in South-East Asia. *Public Health Nutrition*, 16: 1637-1643.
- Liu, F., Liu, X., Zhang, S., Chen, T., & Zhao, J. (2014). Determination and separation mechanism of acrylamide by high-performance liquid chromatography. *Instrumentation Science & Technology*, 42 (4):423-431.
- Lu, Z., Donner, E., Yada, R., & Liu, Q. (2012). Impact of gamma-irradiation, CIPC treatment, and storage conditions on physicochemical and nutritional properties of potato starches. *Food Chemistry*, 133: 1188-1195.
- Lusas, E. W., & Rooney, L. W. (2001). *Snack Foods Processing* (primera edición ed.). Florida : CRC press.
- Martin, F., & Ames, J. (2001). Formation of Strecker aldehydes and pyrazines in a fried potato model system. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49:3885-3892.
- Martinez, E., Rodríguez, J., Bautista, M., Rangel-Vargas, E., & Santos, E. (2018). Use of 2-Naphthalenethiol for derivatization and determination of acrylamide in potato crisps by high-performance liquid chromatographic with fluorescence detection. *Food Analytical Methods*, 11(6): 1636-1644.
- McClements, D., & Li, Y. (2010). Structured emulsion-based delivery systems: controlling the digestion and release of lipophilic food components. *Advances in Colloid and Interface Science*, 159(2):213-228.
- Mery, D., Pedreschi, F., & Soto, A. (2013). Automated design of a computer vision system for visual food quality evaluation. *Food and Bioprocess Technology*, 6:2093-2108.
- Mesias, M., & Morales, F. (2015). Acrylamide in commercial potato crisps from Spanish market: Trends from 2004 to 2014 and assessment of the dietary exposure. *Food Chemistry and Toxicology*, 81:104-110.

- Mestdagh, F., Maertens, J., De Wilde, T., Cucu, T., Delporte, K., Van Peteghem, C., & De Meulenaer, B. (2007). Chemical pre-treatments of potato products: mechanisms of acrylamide mitigation and effects on the sensorial quality. *Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences*, 72(1):9-12.
- Miller, J., & Miller, J. (2010). *Statistics and chemometrics for analytical chemistry*. England: Pearson.
- Miller, M., Carter, D., & Sipes, I. (1982). Pharmacokinetics of acrylamide in Fisher -344 rats. *Toxicology Applied Pharmacology*, 63:36-44.
- Minekus, M., Alvinger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., . . . Brodkorp, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food- an international consensus. *Food and Function*, 5:1113-1124.
- Mittal, G., & Zang, J. (2000). Use of artificial neural network to predict temperature, moisture, and fat in slab-shaped foods with edible coatings during deep-fat frying. *Journal of Food Science*, 65:978-983.
- Moreira, R., Castell-Perez, M., & Barrufet, M. (1999). *Deep fat frying: fundamentals and applications*. Gaithersburg : Aspen Publishers.
- Mottram, D., Wedzicha, B., & Dodson, A. (2002). Acrylamide is formed in the Maillard reaction. *Nature*, 419:448-449.
- Mozaffarian, D., Katan, M., Ascherio, A., Stampfer, M., & Willet, W. (2006). Trans fatty acids and cardiovascular disease. *New England Journal of Medicine*, 1601-1613.
- Mucci, L. A., & Adami, H.-O. (2009). The plight of the potato: Is dietary acrylamide a risk factor for human cancer? *Journal of the National Cancer Institute*, 101(9), 618-621.
- Muncke, J. (2009). Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source. *Science of the total Environment*, 407: 4549-4559.
- Muttucumaru, N., Powers, S., Elmore, J., Dodson, A., Briddon, A., Mottram, D., & Halford, N. (2017). Acrylamide-forming potential of potatoes grown at different locations, and the ratio of free asparagine to reducing sugars at which free asparagine becomes a limiting factor for acrylamide formation. *Food Chemistry*, 220:76-86.
- Nakajima, S., Hira, T., Tsubata, M., Takagaki, K., & Hara, H. (2011). Potato extract (protein) suppresses food intake in rats through inhibition of luminal trypsin activity and direct stimulation of cholecystokinin secretion from enteroendocrine cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(17): 9491-9496.

- Notardonato, I., Avino, P., Centola, A., Cinelli, G., & Ruso, M. (2013). Validation of a novel derivatization method for GC-ECD determination of acrylamide in food. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 6137-6141.
- Omar, M., Elbashir, A., & Schimitz, O. (2015). Determination of acrylamide in Sudanese food by high performance liquid chromatography coupled with LTQ Orbitrap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 176:342-349.
- OMS, (F. (2011). *Evaluation of certain food contaminants. In: Seventy-second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. Rome: WHO technical reports series 959.
- Ono, H., Chuda, Y., Ohnishi-Kameyama, M., Yada, H., Ishizaka, M., Koboyashi, H., & Yoshida, M. (2003). Analysis of acrylamide by LC-MS/MS and GC-MS in processed Japanese foods. *Food Additives and Contaminants*, 20 (3): 215-220.
- Ouhit, A., Al-Sharbaty, M., Gupta, I., & Al-Farsi, Y. (2014). Potato chips and childhood: What does the science say? An unrecognized threat? *Nutrition* (30), 1110-1112.
- Ovaskainen, M., Reinivuo, H., Tapanainen, H., Hannila, M., Korhonen, T., & Pakkala, H. (2006). Snacks as an element of energy intake and food consumption. *European Journal of Clinical Nutrition*, 60: 494-501.
- Owen, L., Castle, L., Kelly, J., Wilson, L., & Lloyd, A. (2005). Acrylamide analysis: assessment of results from six rounds of food analysis performance assessment scheme (FAPAS) proficiency test. *Journal of AOAC International*, 88: 285-291.
- Pacetti, D., Gil, E., Frega, N., Álvarez, L., Dueñas, P., Garzón, A., & Lucci, P. (2015). Acrylamide levels in selected Colombian foods. *Food Additives and Contaminants part B*, 8 (2):99-105.
- Paleologos, E., & Kontominas, M. (2005). Determination of acrylamide and methacrylamide by normal phase high performance liquid chromatography and UV detection. *Journal of Chromatography A*, 1077, 128-135.
- Palermo, M., Gökmen, V., De Meulenaer, B., Ciesarová, Z., Zhang, Y., Pedreschi, F., & Fogliano, V. (2016). Acrylamide mitigation strategies critical appraisal of the FoodDrinkEurope toolbox. *Food and Function*, (7):2516-2525.
- Parzefall, W. (2002). Risk Assessment of dioxin contamination in human food. *Food Chemistry and Toxicology*, 40: 1185-1189.
- Pedreschi, F., & Moyano, P. (2005). Oil uptake and texture development in fried potato slices. *Journal of Food Engineering*, 70:557-563.

- Pedreschi, F., Mariotti, S., Granby, K., & Risum, J. (2011). Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching. *LWT-Food Science and Technology*, 44:1473-1476.
- Pedreschi, F., Mery, D., Mendoza, F., & Aguilera, J. (2004). Classification of potato chips using pattern recognition. *Journal of Food Science*, 69,264-270.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaak, K., & Granby, K. (2005). Color changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, 38:1-9.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Santis, N., & Pedreschi, R. (2007). Physical properties of pre-treated potato chips. *Journal of Food Engineering*, 1474-1482.
- Perez Llamas, F., & Zamora, N. S. (2002). *Nutrición y Salud Humana*. MURCIA: Aula de mayores. Universidad de Murcia.
- Petersson, E., Rosen, J., Turner, C., Danielsson, R., & Hellenas, K. (2006). Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: an optimisation study. *Analytical Chemistry Acta*, 557:287-295.
- Pittet, A., Périsset, A., & Oberson, J. (2004). Trace level determination of acrylamide in cereal-based foods by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1035:123-130.
- Powers, S., Mottram, D., Curtis, A., & Halford, N. (2013). Acrylamide concentrations in potato crisps in Europe from 2002 to 2011. *Food Additives and Contaminants Part A*, (30):1493-1500.
- Rawn, D., Breakell, K., Verigin, V., Nicoladakis, H., Sit, D., & Feeley, M. (2009). Persistent organic pollutants in fish oil supplements on the Canadian market: Polychlorinated biphenyls and organochlorine insecticides. *Journal of Food Science*, 74: T14-T19.
- Reddy, K., Salleh, B., Saad, B., Abbas, H., Abel, C., & Shier, W. (2010). An overview of mycotoxin contamination in foods and its implications for human health. *Toxin Reviews*, 29: 3-26.
- Robert, P., Gorena, T., Romero, N., Sepulveda, E., Chavez, J., & Saenz, C. (2010). Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. *International Journal of Food Science and Technology*, 45:1386-1394.
- Romani, S., Bacchiocca, M., Rocculi, P., & Dalla, R. (2009). Influence of frying conditions on acrylamide content and other quality characteristics of French fries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22:582-588.



- Romani, S., Bacchiocca, M., Rocculi, P., & Dalla Rosa, M. (2009). Influence of frying conditions on acrylamide content and other quality characteristics of French fries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22: 582-588.
- Rommens, C., Yan, H., Swords, K., Richael, C., & Ye, J. (2008). Low acrylamide french fries and potato chips. *Plant Biotechnology Journal*, 6:843-853.
- Rosén, J., & Hellenäs, K. (2002). Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127 (7): 880-884.
- Russo, V., Avino, P., Centola, A., Notardonato, I., & Cinelli, G. (2014). Rapid and simple determination of acrylamide in conventional cereal-based foods and potato chips through conversion to 3-[bis(trifluoroethanoyl)amino]-3-oxopropyl trifluoroacetate by gas chromatography coupled with electron capture and ion trap mass spectr. *Food Chemistry*, 146:204-211.
- Rydeberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., & Törnqvist, M. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51:7012-7018.
- Sahin, S., Sastry, S., & Bayindirili, L. (1999). Heat transfer during frying of potato slices. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32:19-24.
- Salvador, A., Varela, P., Sanz, T., & Fiszman, S. (2009). Understanding potato chips crispy texture by simultaneous fracture and acoustic measurements, and sensory analysis. *LWT- food Science and Technology*, 763-767.
- Sanny, M., Jinap, S., Bakker, E., van Boekel, M., & Luning, P. (2012). Is lowering reducing sugars concentration in french fries an effective measure to reduce acrylamide concentration in food service establishments. *Food Chemistry*, 135(3):2012-2020.
- Sansano, M., Heredia, A., Peinado, I., & Andrés, A. (2017). Dietary acrylamide: what happens during digestion. *Food Chemistry*, 237:58-64.
- Satter, E. (2007). Eating competence: definition and evidence for the Satter Eating Competence model. *Journal of Nutrition Education and Behavior*, 39 (5 Suppl): 142-153.
- Schabacker, J., Schwend, T., & Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12): 4021-4025.
- Schabacker, J., Schwend, T., & Wink, M. (2004). Reduction of acrylamide uptake by dietary proteins in a Caco-2 gut model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(12):4021-4025.

- Segnini, S., Dejmek, P., & Öste, R. (1999). A low cost video technique for a color measurement of potato chips. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, 32:216-222.
- Serna Saldívar, O., & R, S. (1996). *Química Almacenamiento e Industrialización de los Cereales* (1° edición ed.). México, D.F: AGT editor S.A.
- Shiraishi, Y. (1978). Chromosome aberrations induced by monomeric acrylamide in bone marrow and germ cells of mice . *Mutation Research* , 57:313-324.
- Skog, K., Johansson, M., & Jagerstad, M. (1998). Carcinogenic heterocyclic amines in model systems and cooked foods: a review on formation, occurrence and intake . *Food Chemistry and Toxicology* , 36:879-896.
- Smith, C., Perfetti, T., Rumble, M., Rodgman, A., & Doolittle, D. (2000). IARC group 2A carcinogens reported in cigarette mainstream smoke. *Food Chemistry and Toxicology*, 38:371-383.
- Soares, C., Cunha, S., & Fernandes, J. (2006). Determination of acrylamide in coffee products by GC-MS using an improved SPE clean up. *Food additives and Contaminants*, 1276-1282.
- Sörgel, F., Weissenbacher, R., Kinzig-Schippers, M., Hofmann, A., Illauer, M., Skott, A., & Landersdofer, C. (2002). Acrylamide: increased concentrations in homemade food and first evidence of its variable absorption from food, variable metabolism and placental and breast milk transfer in humans. *Chemotherapy* , 48 (6):267-274.
- Stadler, R., & Studer, A. (2015). Acrylamide formation mechanisms. En V. Gökmen, *Acrylamide in food: analysis, content and potential health effects* (págs. 1-17). London: Elsevier .
- Stadler, R., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P., Robert, M.C., & Riediker, S. (2002). Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*, 419:448-450.
- Stewart, D., & Taylor, M. (2017). Potato- a basis for human nutrition and health benefits . *AHDB Potatoes*, 1-60.
- Stolker , A., & Brinkman, U. (2005). Analytical strategies for residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents in food-producing animals- A review. *Journal of Chromatography A*, 1067: 15-53.
- Studer, A., Blank, I., & Stadler, R. (2004). Thermal processing contaminants in foodstuffs and potential strategies of control. *Czech Journal of Food Science*, 22: 1-10.
- Sundaraganesan, N., Puviarasan, N., & Mohan, S. (2001). Vibrational spectra, assignments and normal coordinate calculation of acrylamide. *Talanta*, 54(2): 233-241.

- Tae kim, C., Hwang, E.-S., & Joo Lee, H. (2005). Reducing Acrylamide in Fried Snack Products by Adding Amino Acids . *Journal of Food Science* , 70(5), 354-358.
- Tareke , E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Tornqvist, M. (2000). Acrylamide: a cooking carcinogen? *Chemical Research in Toxicology*, 13: 517-522.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of Acrylamide, a Carcinogen Formed in Heated Foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(50), 4998-5006.
- Tarn, T., Tai, G., & Liu, Q. (2006). Quality improvement. In: handbook of potato production, improvement, and postharvest management. En J. Gopal, & S. Khurana. New York: Haworth Press Inc.
- Tateo, E., & Bononi, M. (2003). A GC/MS method for the routine determination of acrylamide in food. *Italian Journal of Food Science* , 15:149-151.
- Taubert, D., Harlfinger, S., Henkes, L., Berkels, R., & Schöming, E. (2004). Influence of Processing Parameters on Acrylamide Formation during Frying Potatoes . *Journal of Agricultural and Food Chemistry*(52), 2735-2739.
- Tittlemier, S., Lau, B., Ménard, C., Corrigan, C., Sparling, M., & Gaertner, D. (2009). Melamine in infant formula sold in Canada: Occurrence and risk assesment . *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57: 5340-5344.
- Troung, V., Pascua, Y., Reynolds, R., Thompson, R., Palazoglu, T., Mogol, B., & Gökmen, V. (2014). Processing Treatments for mitigating acrylamide formation in Sweetpotato French fries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62:310-316.
- Tzia, C., Giannou , V., & Varzakas, T. (2016). Snack Foods. *Handbook of Food Processing: Food Safety, Quality and Manufacturing Processes* (págs. 573-583). Taylor & Francis Group, LLC.
- Vincent, J. (1998). The quantification of crispness. *Journal of the Science of Food and Agriculture* , 78:162-168.
- Vorria, E., Giannou, V., & Tzia, C. (2004). Hazard analysis and critical control point of frying-safety assurance of fried foods . *European Journal of Lipid Science and Technology*, 759-765.
- Wang , Z., Forsyth, D., Lau, B., Pelletier, L., Bronson , R., & Gaertner, D. (2009). Estimated dietary exposure of Canadians to perchlorate through the consumption of fruits and vegetables available in Ottawa markets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 57:9250-9255.
- Wang, H., Albert, W., Shuang, S., & Choi, M. (2008). SPE/HPLC/UV studies on acrylamide in deep-fried flour based indigenous Chinese foods . *Microchemical Journal*, 89: 90-97.

- Weichselbaum, E. (2010). An overview of the role of potatoes in the UK diet . *Nutrition bulletin* , 35(3): 195-206.
- Wenzl, T., de la Calle, B., & Anklam, E. (2003). Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Additives and Contaminants* , 20: 885-902.
- Wenzl, T., Karasek, L., Rosén , J., Hellenaes, K., Crews, C., Castle, L., & Anklam, E. (2006). Collaborative trial validation study of two methods, one based on high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and on gas chromatography-mass spectrometry for the determination of acrylamide in bakery and potato products . *Journal of Chromatography A*, 1132 (1-2): 211-218.
- Wilson, A., Work, T., Bushway, A., & Bushway, R. (1981). HPLC determination of fructose, glucose and sucrose in potatoes. *Journal of Food Science*, 46:300-301.
- Wilson, K., Mucci, L., Rosner, B., & Willet, W. (2010). A prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 10:2503-2515.
- Wong, W., Chung , S., Lam, C., Ho, Y., & Xiao, Y. (2014). Dietary exposure of Hong Kong adults to acrylamide: results of the first Hong Kong total diet study. *Food Additives & Contaminants Part A*, 31 (5): 799-905.
- Zhang, Y., & Zhang, Y. (2007). Formation and reduction of acrylamide in Maillard reaction: a review based on the current state of knowledge . *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* , 47:521-542.
- Zhang, Y., Ren, Y., & Zhang, Y. (2009). New Research Developments on Acrylamide: Analytical Chemistry, Formation Mechanism, and Migration Recipes. *Chemical Reviews*(109), 4375-4397.
- Zhou, S., Wang, D., Zhang, C., Zhao , Y., Zhao, M., & Wu, Y. (2015). A novel interaction mode between acrylamide and its specific antibody. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry* , 36(3):295-311.
- Zyzak, D., Sanders, R., Stojanovic, M., Tallmadge, D., Elberhart, B., Ewald, D., Gruber, D.C., Morsch, T.R., Strothers, M.A., Rizzi, G.P., & Villagran, M.D. (2003). Acrylamide formation mechanism in heated foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47:4782-4787.