



UNIVERSIDAD DE JAÉN
Facultad de Ciencias Experimentales

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de los niveles de concentración de acrilamida en alimentos térmicamente procesados.

Alumno: Laura Hermosilla Parrado

Octubre, 2018

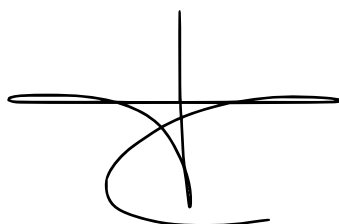
Grado en Química

Trabajo Fin de Grado

Evaluación de los niveles de concentración de acrilamida en alimentos térmicamente procesados.

Alumna: Laura Hermosilla Parrado

Jaén, Octubre, 2018



ÍNDICE

1. RESUMEN/ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1.Acrilamida.....	2
2.2 Presencia de acrilamida en alimentos.	2
2.2.1 Mecanismo de formación.....	3
2.2.2 Influencia de la temperatura y el tiempo de procesado.	5
2.3. Toxicidad: efectos en la salud humana	6
2.4. Legislación sobre el contenido de acrilamida en los alimentos	7
2.5 Preocupación internacional.....	8
3. OBJETIVOS	10
4. MÉTODOS PARA LA MITIGACIÓN Y ANÁLISIS DE ACRILAMIDA.....	11
4.1. Métodos para la mitigación.	11
4.1.1. Efectos de los materiales crudos	11
4.1.2. Efecto de los aditivos.....	12
4.1.3. Efectos debido a los métodos de procesamiento	13
4.1.4. Efecto del pH, el agua y la fermentación.....	14
4.2 Métodos de análisis de acrilamida.....	15
4.2.1.1 Extracción en fase solida (SPE).....	15
4.2.1.2 Extracción líquido-líquido (LLE).	16
4.2.1.3.Extraccion sólido-líquido y clean-up con fase sólida magnética	17
4.2.1.4 Pretratamiento de muestra utilizado en métodos de detección rápida	17
4.2.1.5 QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe).....	18
4.2.2.1 Cromatografía de gases (CG).....	20
4.2.2.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS)	21
4.2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).....	22
4.2.2.2.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)....	24
4.2.2.3 ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)	25
5. DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS TÉRMICAMENTE PROCESADOS	26
6. CONCLUSIONES	38
7. BIBLIOGRAFÍA.....	39

1. RESUMEN/ABSTRACT

La acrilamida es una sustancia que se forma espontáneamente en los productos alimentarios que contienen almidón durante los procesos de cocinado a altas temperaturas. Es utilizada también en la industria para producir polímeros de poliacrilamida. Ha sido clasificada por la Agencia Internacional de Investigación sobre el Cáncer (IARC) en el grupo 2^a, es decir, como sustancia potencialmente cancerígena y esta clasificada en el grupo 2A debido a su toxicidad para el sistema nervioso. En el presente trabajo se han estudiado sus características, toxicidad y legislación existente.

Se han revisado también los métodos de extracción usualmente utilizados en el análisis de alimentos entre las que se encuentran la extracción en fase sólida y la extracción en fase líquida. En cuanto a los métodos de determinación cuantitativa utilizadas para el análisis de este compuesto destacan la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas.

Acrylamide is a substance that is spontaneously formed in food products that contain starch during cooking processed at high temperatures. It is also used in the industry to produce polyacrylamide polymers. It has been classified by the International Agency for Research on Cancer (IARC) in group 2^a, that is, as a potentially carcinogenic substance and is classifies in a group 2A duo to its toxicity to the nervous system.

In the present work, I have reviewed acrylamide characteristics, toxicity, and current legislation.

I have also reviewed the extraction methods usually used in the analysis of foods, including solid phase extraction and liquid phase extraction. The quantitative determination methods used for the analysis of this compound include gas chromatography coupled to mass spectrometry, and liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Acrilamida

La acrilamida (2-propenamida, C_3H_5NO) es un sólido cristalino incoloro, no volátil y con un peso molecular de $71,09 \text{ g mol}^{-1}$, cuya estructura química se muestra en la Figura 1. Se produce por la hidratación de acrilonitrilo. Se disuelve en agua, alcohol y otros solventes polares pero tiende a ser hidrolizada en ácido acrílico y soluciones alcalinas. Existe en forma de monómero y polímero.

Se utiliza en la industria de polímeros para producir polímeros de poliacrilamida, en la industria de tratamientos de agua para clarificarla, en la industria del papel y como reactivo en el laboratorio para geles de electroforesis.

Fue en 1994 cuando la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) clasificó la acrilamida como una sustancia potencialmente cancerígena para humanos, asociada al grupo 2A en función de la carcinogenicidad en roedores. La clasificación en 2002 fue aceptada por la Organización Mundial de la Salud (OMS).

Se descubrió que la forma monómera de la acrilamida es la que está presente en los alimentos y que es tóxica para el sistema nervioso. Esta presente en alimentos cocinados y en el humo del tabaco. En 2002, la Administración Nacional de Alimentos de Suecia (SNFA) fue la que proporcionó las primeras informaciones sobre la presencia de acrilamida en alimentos. La contaminación se produce por el tratamiento térmico al que se someten los alimentos, sobre todo en productos de patata, café tostado, cereales y productos a base de pan. (Krishnakumar et al., 2014).

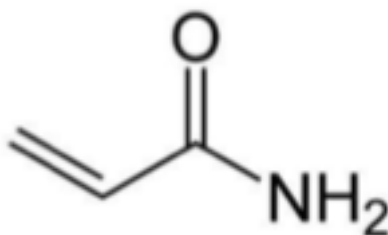


Figura 1. Estructura química de la acrilamida.

2.2 Presencia de acrilamida en alimentos.

La acrilamida se forma en alimentos ricos en carbohidratos (azúcares reductores) cocinados a temperaturas elevadas, superiores a 120°C , al freír, hornear o asar.

Investigadores de la Universidad de Estocolmo y La Agencia Nacional Sueca de Alimentos, informaron en abril de 2002 el hallazgo de una gran cantidad de acrilamida en algunos alimentos procesados térmicamente. A partir de este momento la acrilamida ha supuesto una preocupación creciente para la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), OMS, el Comité Conjunto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios (JECFA) y la Administración de Medicamentos y Alimentos de EEUU (FDA), así como otras agencias nacionales de alimentos y otras instituciones de investigación.

Se encuentra la presencia de acrilamida en diferentes productos y con diversos niveles (JECFA 2011). La Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) redactó un informe sobre el control de niveles de acrilamida entre 2007 y 2010, concluyendo que los niveles medios de acrilamida van desde los 31 $\mu\text{g/kg}$ (alimentos procesados para lactantes y niños a base de cereales) hasta 1.350 $\mu\text{g/kg}$ (sucedáneos del café) (EFSA, 2011). Los principales productos de alimentación donde se encuentran mayores concentraciones de acrilamida son las patatas fritas con rangos de concentración entre 272 y 570 $\mu\text{g/kg}$, los productos de panadería 75-1.044 $\mu\text{g/kg}$ y el café con sus sucedáneos 229-890 $\mu\text{g/kg}$; siendo además estas categorías las principales exposiciones de acrilamida en los adultos. Las exposiciones de clase media y alta de acrilamida son de 1 y 4 $\mu\text{g/kg}$ por día respectivamente (JEFCA, 2011). Un primer paso para marcar los límites normativos fue la inclusión de 10 categorías de alimentos que se propusieron en 2011 y más tarde en 2013 se actualizaron.

2.2.1 Mecanismo de formación

El mecanismo más aceptado para la formación de acrilamida es la vía de azúcares reductores de la asparagina, junto con la reacción de Maillard. La acrilamida por esta ruta se forma como esta reflejado en la Figura 2. Esta reacción es un pardeamiento no enzimático (es el resultado de muchas reacciones químicas que generan polímeros coloreados y productos volátiles) que pueden dar sabor y olor que es desarrollada en los alimentos durante la cocción o la fritura. La asparagina es considerada la fuente de nitrógeno para la formación de acrilamida. Este aminoácido por si solo no produce acrilamida fácilmente, pero junto a los azúcares reductores como la fructosa o la glucosa, acelera la formación.

El contenido de fructosa y glucosa de los alimentos está relacionado con la formación de acrilamida. La asparagina libre es un factor importante en la formación de esta amina en productos de centeno y trigo. En base a distintos estudios realizados se ha demostrado que los azúcares reductores son los factores limitantes en las patatas y la asparagina, que es principal componente en el salvado de cereales, es el factor limitante en los productos a base de cereales. (Q. Hu et al.,2015).

El principal procedimiento que da lugar a la aparición de la acrilamida en los alimentos se debe a una parte de la reacción de Maillard, con aminoácidos libres (asparagina) y azúcares reductores (glucosa y fructosa). La reacción de Maillard es una reacción de pardeamiento no-enzimático que tiene lugar en los alimentos durante la fritura o cocción. Esta reacción tiene lugar cuando se da una combinación adecuada de carbohidratos, lípidos y proteínas para lograr un color, sabor y aroma buscados.

En las patatas de calidad la asparagina está presente como un aminoácido libre (93,6 mg/100g). Requiere de hidratos de carbono para dar lugar a la acrilamida. El contenido de fructosa y glucosa tiene un fuerte vínculo con la formación de acrilamida. El principal determinante de la formación de acrilamida en las tipologías de centeno, harinas y masa cocidas es la concentración de asparagina (Krishnakumar et al., 2014).

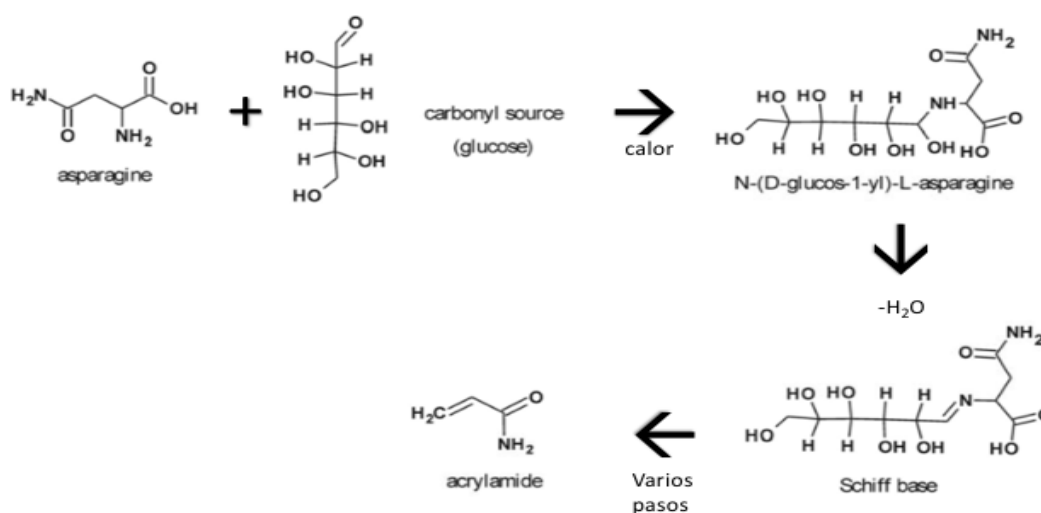


Figura 2. Formación de acrilamida por vía de azúcares reductores.

(Fuente: Krajewska A et al., 2009).

2.2.2 Influencia de la temperatura y el tiempo de procesado.

Según Matthäus et al.,2004 y Pedreschi et al.,2005, dos factores indicadores de la cantidad de acrilamida que se forma en las patatas son la temperatura y el tiempo de fritura. La cantidad de acrilamida que se forma depende de la cantidad de precursores directos como asparagina y azúcares reductores que contenga la materia prima (Olsson et al .,2004; Williams, 2005).

Estudios de distintos autores (Mottran et al.,2002; Stadler et al.,2002) demostraron que el límite inferior de temperatura para la formación de acrilamida es de 120°C. Esto es debido a que la distribución de la temperatura en la patata se produce desde el exterior al interior ya que la matriz tiene más resistencia a la transferencia de calor, además se demuestra también la importancia de la humedad. En el proceso de fritura el aceite adquiere temperaturas muy elevadas lo cual la deshidratación es mas rápida y es por tanto, que los altos niveles de temperatura y la baja humedad favorecen la formación de acrilamida (Gökmen et al.,2006).

Una cantidad suficiente de agua en el aceite que se usa al freír, actúa como inhibidor de la formación de acrilamida. Si se quiere reducir el nivel de acrilamida formada durante el proceso de fritura, se debe asegurar que las rodajas de patata tengan una cantidad mayor al 10% de agua, ya que por debajo de este porcentaje se produce la formación de acrilamida. Por encima de los 150°C la producción de acrilamida aumenta considerablemente. Es posible que a esta temperatura los valores de humedad estén mas bajos de los valores críticos y la reacción de Maillard se acelere (Gertz et al., 2002).

En el café la acrilamida se forma durante el proceso de tostado y los niveles varían dependiendo de la variedad del café. Para este alimento no hay estudios ni se dispone de tecnología adecuada para disminuir los niveles de acrilamida formados pero se sugiere un tostado por convección. (Valenzuela R B et al .,2007).

En resumen a lo anteriormente citado, como podemos ver en la Figura 3, el aumento de acrilamida esta relacionado con el aumento de la temperatura entre 195 y 225°C y la duración del procesamiento entre 16-24 min. Los resultados muestran que la temperatura tiene un efecto más pronunciado que el tiempo de procesamiento.

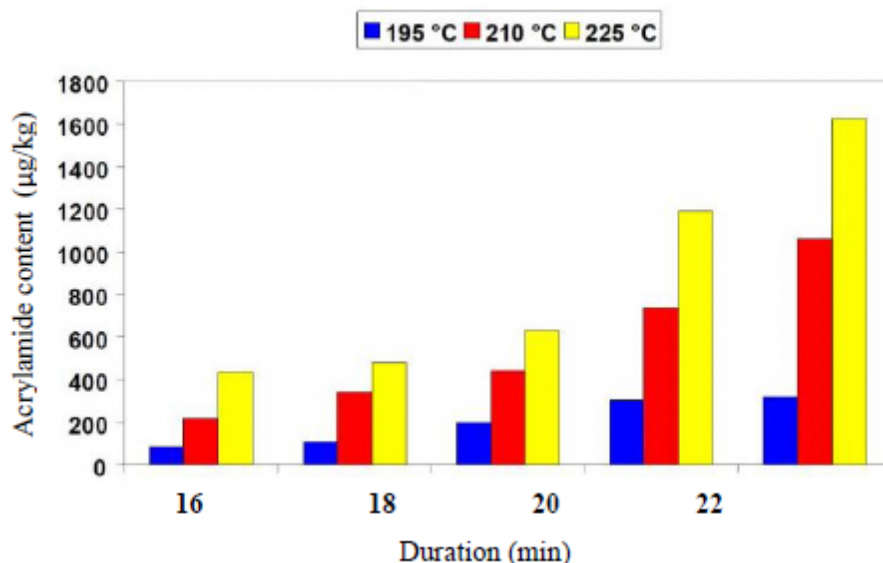


Figura 3. Influencia de la temperatura y el tiempo de procesado en la cantidad de acrilamida (Fuente: Pedreschi et al.,2005)

2.3. Toxicidad: efectos en la salud humana

En 1994 la IARC clasificó a la acrilamida como grupo “2A” (probable sustancia cancerígena para el ser humano) debido a su neurotoxicidad, carcinogenicidad y genotoxicidad (Erkekoglu et al., 2010). A posteriori la Comisión Europea clasificó a la acrilamida como carcinógeno de categoría 2 y mutágeno de categoría 2. Asimismo, la Agencia Europea de Sustancias Químicas tildó a la acrilamida como sustancia de “gran preocupación” en el año 2010.

La FAO y la OMS en la 72ª reunión de la JECFA (JECFA, 2011) resumió y actualizó los estudios de la acrilamida en todo el mundo desde su 64ª reunión (JECFA, 2005). El informe derivado de tal reunión arrojaba descubrimientos de tumores multiorgánicos en animales de laboratorio después de la exposición a la acrilamida, aunque no se ha evidenciado de forma fehaciente la relación entre la ingesta de acrilamida y el aumento de cánceres múltiples a partir de investigaciones epidemiológicas (Friedman et al.,1995).

Existen dos formas de genotoxicidad en las que puede darse la acrilamida. En la primera de ellas, la acrilamida puede convertirse en el metabolito glicidamida, siendo 3 veces más alta en mutabilidad que la misma e incluso pudiendo inducir a mutaciones puntuales en varios sistemas (Fazendeiro, 2013). En la otra forma, la acrilamida actúa como un aceptor de Michael para formar aductos con grupos tiol, hidroxilo y amino en

el ADN, lo que conduce al daño del mismo (Doroshenko 2009; Erkekoglu y Baydar 2010; Hogervorst 2010; Watzek 2012; Zeiger 2009).

Trabajadores expuestos a la acrilamida sufren daños del sistemas nervioso periférico y central, puesto que los efectos de la acrilamida son neurotóxicos y crónicos (Huang 2011; Pennisi 2013). El nivel de efectos adversos no observados para los cambios morfológicos en los sistemas nerviosos de ratas fue de 200 µg/kg por día. Estudios han informado que 40 µg/kg día es la ingesta diaria tolerable (IDT) para la neurotoxicidad y 2,6 µg/kg día para el cáncer (Tardiff et al.,2010).

2.4. Legislación sobre el contenido de acrilamida en los alimentos

La acrilamida tiene un efecto negativo sobre la salud del ser humano. Por esta razón la Unión Europea (UE) ha establecido unos límites máximos de concentración para productos alimentarios como la patata, café, galletas, alimentos infantiles.

Se han establecido unos límites que vienen impuestos por el Reglamento (CE) N° 852/2004 del Parlamento Europeo, que ha sufrido una serie de modificaciones, por lo que finalmente y la usada en la actualidad es la que se recoge en el en texto del Reglamento (UE) 2017/2158 de la Comisión del 20 de noviembre de 2017.

La Tabla 1 recoge los niveles de referencia permitidos del reglamento actual de los alimentos comúnmente más utilizados en la sociedad, siendo para las patatas fritas caseras 500 µg/kg, patatas chips 750 µg/kg, café tostado 400 µg/kg y café soluble 850 µg/kg además otros productos como el pan de molde a base de trigo 50 µg/kg y alimentos infantiles como las galletas y otros alimentos a base de cereales como la papilla que están en el rango de 150µg/kg para galletas y 40 µg/kg para alimentos infantiles.

Tabla 1. Niveles de concentración recomendables en alimentos establecidos por la Unión Europea

Alimento	Niveles de referencia (µg/kg)
Patatas fritas listas para consumir	500
Patatas chips	750
Pan de molde	50
A base de trigo	
Otro pan de molde	
Cereales par desayuno	300
A base de salvado y cereales integrales	
A base de trigo y centeno	
A base de maíz, avena, espelta, cebada y arroz	
Galletas y barquillos	350
Galletas saladas	400
Pan crujiente	350
Pan de especias	800
Café tostado	400
Café instantáneo (soluble)	850
Sucedáneo de café compuesto de cereales	500
Alimentos elaborados a base de cereales para lactantes y niños de corta edad.	40
Galletas y biscotes para lactantes y niños de corta edad.	150

2.5 Preocupación internacional

Organizaciones como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Agencia Española de Consumo, Seguridad Alimentaria y Salud (AECOSAN), la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), la Organización de Consumidores y Usuarios (OCU) y periódicos como el ABC o el PAIS hacen partícipes su preocupación por la existencia de la acrilamida, tal es así que cada vez están anunciando más noticias e investigaciones sobre ello y tratan de concienciar a la sociedad.

La Comisión Europea en 2017 aprobó el reglamento 2017/2158 que ha entrado en vigor el 11 de Abril de 2018 donde se proponen medidas de mitigación y niveles de referencia para la reducción de acrilamida en alimentos.

AECOSAN junto con la Comisión Europea están preparando un borrador guía para que la aplicación del borrador sea más sencilla. Además, se pretende que para finales de 2018 se realicen jornadas informativas destinadas a los profesionales del sector que afecta.

En la figura 4 podemos ver el encabezado de la página web de AINIA un centro tecnológico de Valencia, donde se anuncia el reglamento anteriormente citado.



Figura 4. Encabezado pagina AINIA

(Fuente:<https://www.ainia.es/tecnalimentalia/legislacion/comision-europea-limites-acrilamida-alimentos/>)

AECOSAN en su página web da recomendaciones de cómo reducir la formación de acrilamida en los alimentos a través de su forma de cocinado. Como podemos ver en las figuras 5 y 6 las patatas fritas y el pan son mucho más sanos cuando están dorados pero muy perjudiciales cuando el dorado pasa a ser quemado.



Figura 5. Recomendaciones de AECOSAN

(Fuente:http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/reducir_exposicion_acrilamida.htm)

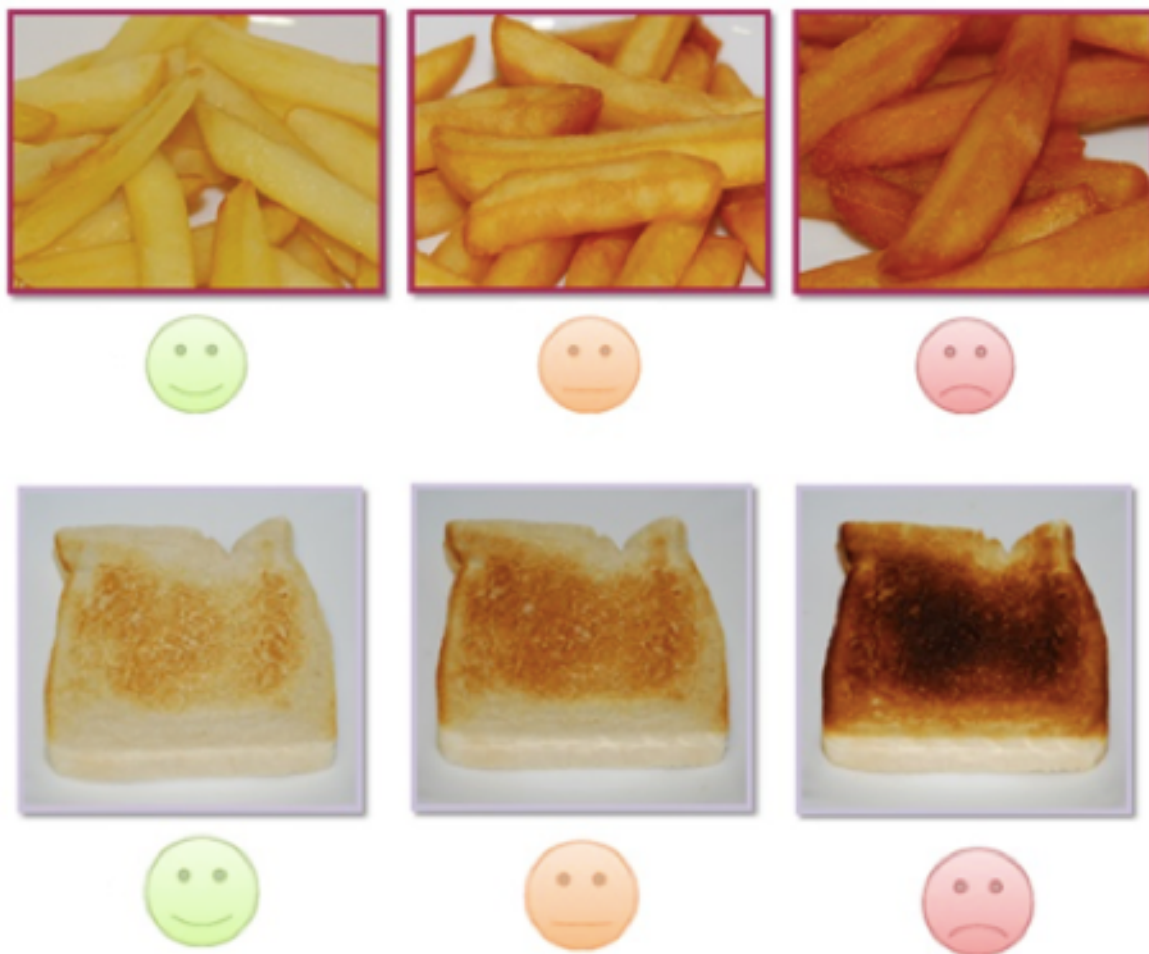


Figura 6. Recomendaciones AECOSAN

(Fuente:http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/para_el_consumidor/ampliacion/reducir_exposicion_acrilamida.htm)

3. OBJETIVOS

El presente trabajo tiene como objetivo principal la evaluación de los niveles de concentración de acrilamida en alimentos tales como las patatas y café.

Este compuesto ha tomado una gran importancia en los últimos años ya que se está llegando a considerar probable carcinogénico para humanos. Como puede verse en la figura 7, la mayor parte de las investigaciones realizadas en los últimos años sobre la formación de acrilamida en alimentos se centran en patatas (53% de publicaciones) y café (17% de publicaciones). Nos centramos en estos alimentos ya que son los más investigados por encontrarse mayores niveles de acrilamida en estos: Es por ello que se va proceder a realizar una revisión de los distintos tratamientos de muestra y de las distintas técnicas de análisis utilizadas para estos alimentos.

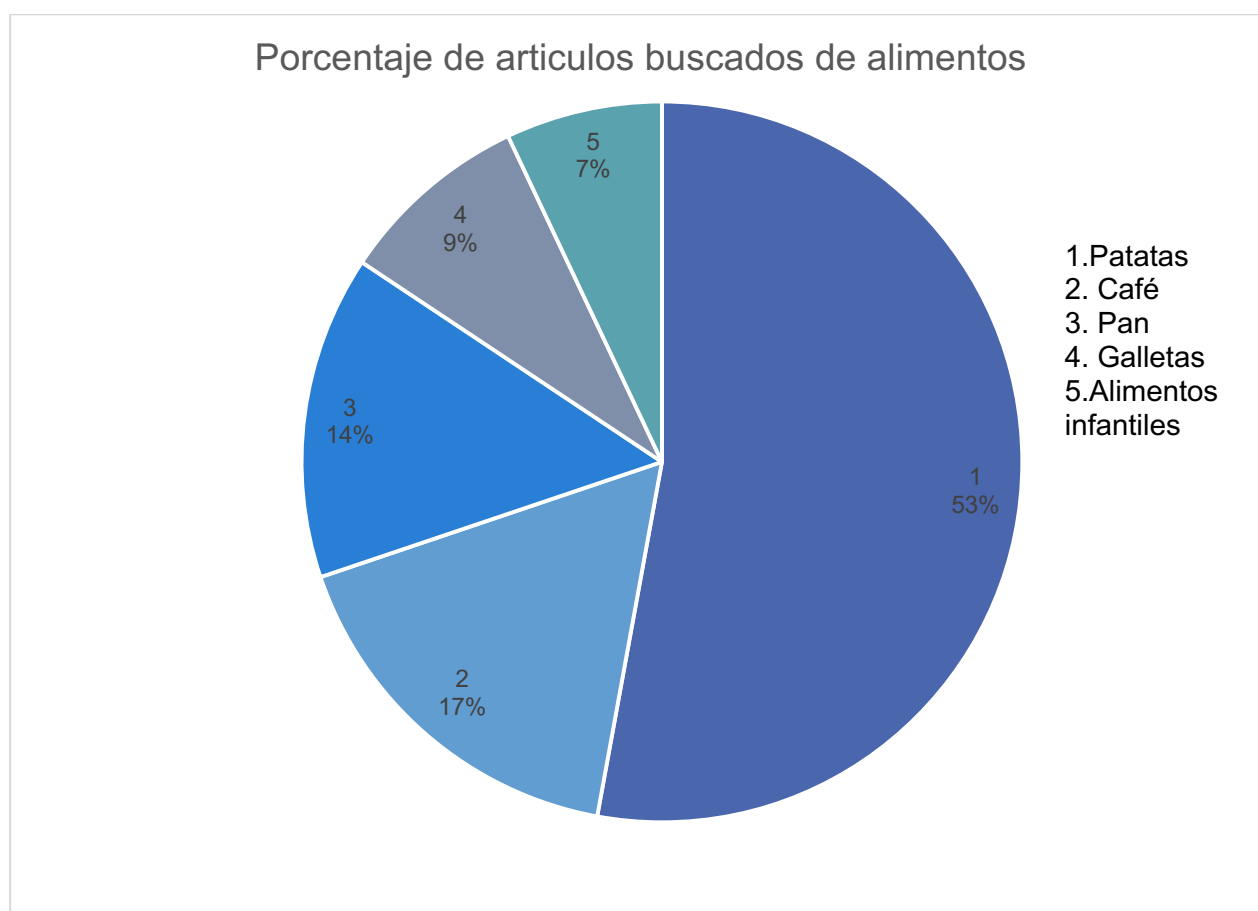


Figura 7. Porcentaje de información encontrada de alimentos con acrilamida

4. MÉTODOS PARA LA MITIGACIÓN Y ANÁLISIS DE ACRILAMIDA.

4.1. Métodos para la mitigación.

4.1.1. Efectos de los materiales crudos

Para ver como influye la formación de acrilamida en los productos de patata y cereales se ha estudiado la influencia de la variedad, el año de cosecha, las condiciones en la que se ha llevado a cabo el almacenamiento de producto y la fertilización usada. La composición en las patatas varía dependiendo de la variedad. Las patatas contienen gran cantidad de azúcares reductores, que es el principal factor para la formación de acrilamida. Por tanto, para reducir la formación de acrilamida es conveniente controlar los azúcares reductores y la asparagina. (David et al., 2012)

Una variedad de patatas con bajas concentraciones de azúcares reductores puede ser una forma efectiva de reducir la formación de acrilamida.

Las condiciones climáticas y el año de cosecha también tienen un efecto significativo en la asparagina y los azúcares reductores en la patata. Un estudio (Park et al., 2005) comparó muestras del año de cosecha 2004 con 2003, observando que el contenido en asparagina fue menor en el año 2004. Los resultados de este estudio fueron que un verano excesivamente caluroso dio como resultado que se generó una menor cantidad de asparagina. La fertilización es también un factor clave; se ha estudiado que si se fertiliza menos con compuestos nitrogenados se da una mayor concentración de azúcares reductores, lo que conlleva una mayor formación de acrilamida en los productos de patata. Para productos de trigo no se vio afectada la formación de azúcares reductores con la fertilización.

Las patatas se almacenan durante varios meses, por lo que las frías temperaturas y el tratamiento de las patatas a alta temperatura como el endulzamiento senescente, son las causas principales para la acumulación de azúcares durante su almacenamiento.

Para reducir la formación de acrilamida, lo ideal es almacenar las patatas a 8 °C.

4.1.2. Efecto de los aditivos

La asparaginasa es una enzima que convierte el precursor (asparagina) en amoníaco y ácido aspártico, por lo que puede reducir la formación de acrilamida en alimentos. Se produce comercialmente a partir de *Aspergillus niger* (DSM's Preventase) y se encuentra una aplicación mayor para los productos de patatas y cereales. Aunque es una estrategia bastante prometedora para la reducción de acrilamida, es costosa con respecto a otras estrategias.

También se reduce el contenido de acrilamida en alimentos añadiendo aminoácidos o sustancias ricas en proteínas. En varios estudios, (Rydberg et al., 2003; Vattem et al., 2005) se evaluaron ciertos aminoácidos tales como la glicina, cisteína, metionina, glutatión y lisina para la formación de acrilamida y su cinética de eliminación.

Al añadir cisteína y metionina a galletas y masa de patata, la formación de acrilamida disminuyó en un 50%. Se estudió también el efecto de la cisteína en pan crujiente pero en este no existían tales efectos.

La adición de antioxidantes influye en la reacción de Maillard, dando como resultado formación de acrilamida. Los antioxidantes procedentes de los extractos de romero, hojas de bambú y extracto de té verde pueden reducir efectivamente la presencia de acrilamida en alimentos calentados. (Fernandez et al.,2003)

El mecanismo exacto de la formación de acrilamida aún no se conoce realmente pero se propone que podría interactuar con aldehídos activos y bloquear la oxidación de la acroleína. Estos estudios se basan en condiciones *in vitro* o a escala pequeña y quizás no puedan dar los mismos resultados a niveles comerciales o industriales.

Se añadió a la masa de patata cationes mono y divalentes tales como Na^+ , Ca^{2+} o Mg^{2+} , observando un notable efecto en la reducción de acrilamida. Además, los cationes polivalentes también pueden reducir la formación de acrilamida durante el calentamiento. Estos iones podrían interactuar con la asparagina de manera que se evite la formación intermedia de la base de Schiif y con ello la formación de acrilamida.

4.1.3. Efectos debido a los métodos de procesamiento

La mayor parte de las soluciones para paliar la acrilamida se centran en la etapa de procesamiento. Las principales condiciones que influyen en la formación de la acrilamida son: temperatura y tiempo de cocción, escaldado y fritura. Diversas líneas de estudio (Elmore JS et al.,2005) se centran sobre la correlación existente entre la temperatura de cocción y el tiempo de cocción y la formación de acrilamida. No obstante, la dupla prolongada de temperatura y tiempo de cocción (260°C, 20 min.) disminuyó el contenido de acrilamida en los alimentos. Biedermann y Grob descubrieron la aparición de acrilamida a una temperatura inferior a 100°C (Annese M et al.,2010). En contraste con los métodos tradicionales de cocción, las condiciones optimizadas como la temperatura y el perfil de humedad relativa, arrojaron una reducción del 50% de la formación de la acrilamida. La radiación para la cocción de los alimentos es más efectiva en la reducción de acrilamida que los hornos con convección. Además, la combinación de calentamiento por convección y dieléctrico (microondas) resultó ser efectiva para la reducción de acrilamida en alimentos de panadería. El horneado con una alta humedad relativa demostró ser efectivo para mitigar la acrilamida. Esto puede conseguirse no solo reduciendo la temperatura, sino además utilizando vapor para calentar en la parte final de la cocción, 200°C y 20 min son los valores de referencia en cuanto a temperatura y tiempo respectivamente, en

el proceso de cocción. Es en la corteza externa del pan donde se concentra la mayor parte de acrilamida y solo hay una pequeña presencia en la miga del pan.

El escaldado reduce la formación de la acrilamida principalmente por lixiviación de los precursores (azúcares reductores) antes de la fritura. Se pueden variar la temperatura y el tiempo de escaldado para mantener constantes las especificaciones del producto. El escaldado a 70°C y durante un periodo de tiempo de 10-15 minutos, supone una reducción del 65-96% de acrilamida en patatas fritas.

Freír los alimentos es un proceso que abarca desde el ámbito industrial hasta el ámbito doméstico. La formación de la acrilamida está relacionada con el desarrollo del color de los alimentos, que se produce en la reacción de Maillard durante el proceso de calentamiento, en especial en el tramo final de la fritura. Unas condiciones de fritura más exhaustivas (tiempo y temperatura), dan lugar a unas patatas fritas más oscuras y con una mayor concentración de acrilamida. Es decir, se debe tener un control sobre factores como la temperatura (no pasando de 170-175°C) y el tiempo para prevenir la aparición de la acrilamida. La fritura en condiciones de baja presión supone una mayor reducción de acrilamida (Vleeschowwersk et al.,2007).

4.1.4. Efecto del pH, el agua y la fermentación

El pH tiene una gran influencia en la reacción de Maillard. Es sabido que un alto pH influye en los nutrientes de los alimentos. Investigadores (Grob K, 2007;Jung MY et al.,2003) demostraron que un nivel reducido de pH implica una reducción sustancial de acrilamida durante la fritura y la cocción. Para reducir el pH de los alimentos se puede tratar con un ácido, dando aparición a sustancias asociadas a Maillard. Realizando distintos tratamientos con ácidos, se rebajó la cantidad de acrilamida en alimentos de panadería, aperitivos de maíz y galletas.

En los alimentos la actividad del agua juega un papel importante en la mitigación de la acrilamida. Solo cuando la actividad del agua en alimentos es inferior a 0,8% tiene aparición la acrilamida, mientras que la formación de la misma es alta cuando la activa del agua es igual o inferior a 0,4% (Hoenicke K et al., 2004).

Con la fermentación es posible controlar la formación de acrilamida en los alimentos, manteniendo la composición del precursor y el pH. Un mayor tiempo de fermentación (una hora al menos) afecta directamente en la cantidad de acrilamida del pan y de las patatas fritas. (Fredriksson H et al.,2004). La fermentación combinada de ácido láctico

y escaldado presenta una mayor reducción de acrilamida en productos de patata (Baardseth P et al.,2006).

4.2 Métodos de análisis de acrilamida

4.2.1 Métodos de extracción y purificación de acrilamida

La determinación de acrilamida en matrices de alimentos como patatas y café, requiere una preparación de la muestra antes del análisis instrumental. Los pasos típicos dentro de la preparación de muestras incluyen extracción, purificación y limpieza y, en algunos casos la derivatización en función del método de análisis.

La extracción en fase sólida (SPE) y la extracción líquido-líquido (LLE) son las técnicas más ampliamente usadas para el aislamiento de acrilamida en muestras de patatas y café.

La extracción es un proceso crítico para el pretratamiento en alimentos para detectar acrilamida. Por regla general, se emplean disolventes polares para la extracción de acrilamida, entre los que se encuentran el agua o soluciones salinas tales como ácido fórmico o disolventes orgánicos como acetona o acetonitrilo (Chen F et al.,2008). Para muestras ricas en proteínas tales como las patatas se usan reactivos de Carrez (ferrocianuro de potasio y sulfato de zinc), acetona, etanol o metanol para precipitar y eliminar las proteínas (Bagdonaite, Derler y Murkovic.,2008).

En las tablas 2 y 3 se resumen los distintos tratamientos de muestra para cada alimento.

4.2.1.1 Extracción en fase solida (SPE)

Se utiliza en la purificación de extractos de alimentos debido a su simplicidad, precisión y estabilidad (JECFA,2011). Se basa en la diferente afinidad que presenta el analito (o la matriz) por una fase sólida o por la propia muestra líquida (o el extracto obtenido). Esta técnica es ideal para la extracción de analitos presentes en muestras líquidas y para la purificación de los extractos obtenidos mediante las distintas técnicas de extracción.

La forma más habitual de trabajo se muestra esquemáticamente en la Figura 8, donde la fase sólida esta colocada en un cartucho. El primer paso consiste en acondicionar el cartucho con un disolvente de propiedades similares a la muestra. En segundo lugar, se pasa un determinado volumen de muestra quedando los analitos retenidos.

En tercer lugar, se hace una etapa de lavado para eliminar los interferentes y como último paso, los analitos son eluidos con un disolvente adecuado.

Los cartuchos más utilizados son Oasis HLB junto con Bond Elut-Accuat y una columna de SPE con mezcla de C₁₈, SCX y SAX (Bortolomeazzi et al., 2012).

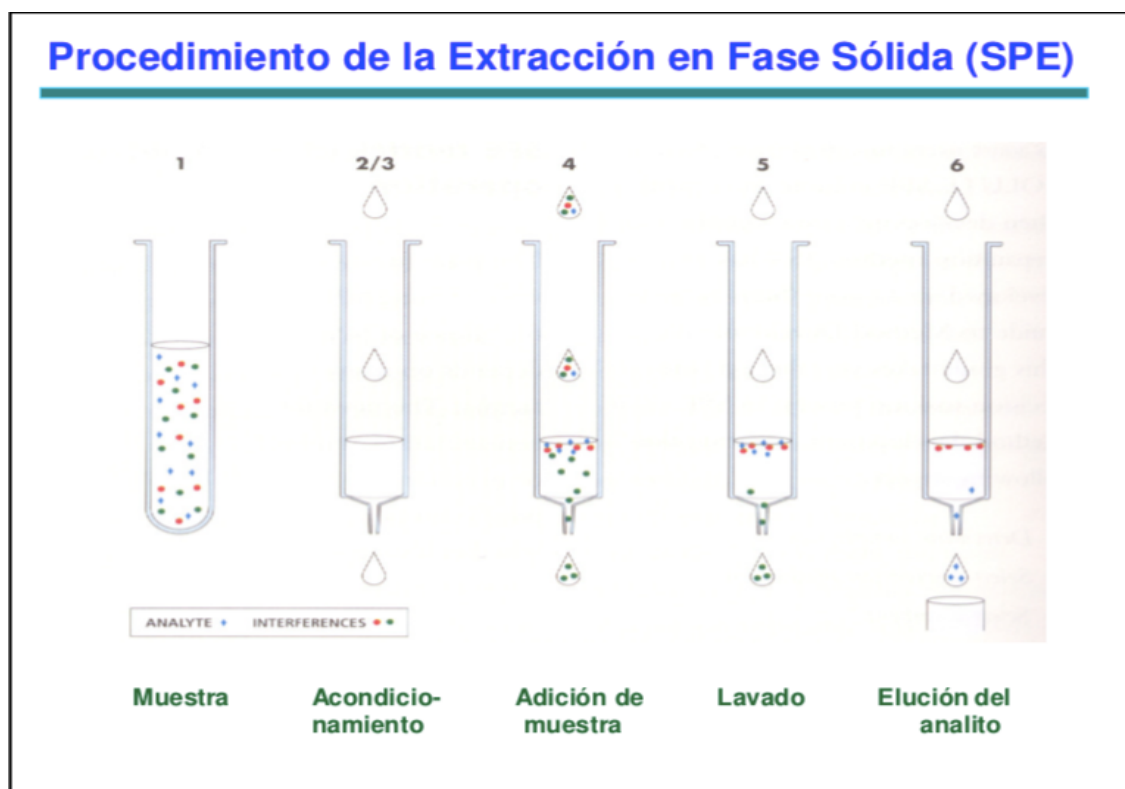


Figura 8. Esquema de las etapas de extracción SPE

(Fuente: Bortolomeazzi et al., 2012)

4.2.1.2 Extracción líquido-líquido (LLE).

La extracción líquido-líquido es un proceso de separación que consiste en la transferencia de un soluto de un disolvente a otro, siendo los disolventes inmiscibles entre si. Una fase generalmente es acuosa y la otra fase es un disolvente orgánico. Como todos los procesos de extracción, la extracción líquido-líquido conlleva una etapa de contacto seguida de una separación de fases. Debido a que las dos fases son inmiscibles, forman dos capas, en donde la fase más densa queda en la parte inferior del embudo de decantación. El equilibrio se alcanza cuando el potencial químico del soluto extraíble esta igualado en las dos fases, esto conlleva a la definición de “coeficiente de distribución” que es una expresión de la preferencia que tiene el soluto por los solventes (Cámara C.,2012)

La eficacia del proceso de extracción líquido-líquido se puede mejorar modificando el coeficiente de distribución.

La LLE es una técnica muy útil para la extracción de compuestos orgánicos de diferente naturaleza ya que se puede modificar el coeficiente de distribución además de ser un método barato y fácil de realizar, pero tiene el inconveniente de que es lento, difícil de automatizar y se usan solventes tóxicos. La elección de los solventes depende de la polaridad de los analitos; en general, los disolventes polares extraen analitos polares de forma mas eficiente que si estos son analitos apolares (Cortada-Cortés C.,2012)

4.2.1.3. Extracción sólido-líquido y clean-up con fase sólida magnética

Este procedimiento (Hammid R.N et al.,2018) se lleva a cabo en unas ciertas condiciones óptimas (1g de muestra, 5ml de acetonitrilo (ACN) que actúa como disolvente de extracción y 70mg de adsorbente). Para ello la muestra se añade a un tubo de centrifuga y se añade 100 ml de acrilamida, se deja un tiempo suficiente para que la acrilamida difunda por la muestra, una vez realizado este proceso se procede a añadir 5 ml de hexano para su desengrase y se mezcla. Para la extracción, se añaden 5 ml de ACN se agita y se lleva a centrifugación. Después de su centrifugación se pueden observar dos fases, una de ellas es la fase de hexano que incluye la grasa, esta es la capa superior y la fase inferior es la de ACN, una fase de color rosado, que contiene acrilamida extraída y otros componentes solubles. La fase de hexano se elimina y se trabaja con la fase de ACN que se pipetea y se filtra a través de un filtro de jeringa de nylon a un vial.

A continuación, una vez filtrada dicha fase se añade 70mg de adsorbente, uno de los mas utilizados es $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-G-TEOS-MTMOS}$, esto se realiza con fines de limpieza, la mezcla es agitada y se lleva a GS-MS.

4.2.1.4 Pretratamiento de muestra utilizado en métodos de detección rápida

Para los métodos de detección rápida, el pretratamiento de muestra en algunas ocasiones se modifica o directamente se anula. La purificación a través de extracción SPE se reemplaza o incluso es eliminada.

Para inmunoensayos (Quan et al.,2011) se utiliza una solución salina tamponada con fosfato (PBS) para extraer acrilamida y además elimina de manera muy exacta la

interferencia matricial tanto en extracción como en detección y directamente se agrega el extracto en micropocillos para la detección.

El pretratamiento en biodetección electroquímica puede resultar algo más complicado en comparación con los inmunoensayos pero bastante más simple que con los métodos estándar. Las señales electroquímicas están basadas en reacciones redox en la superficie del electrodo de trabajo. Sin embargo, las proteínas y la grasa dificultan la transferencia de electrones entre el electrodo y la solución. En consecuencia, se eliminan la grasa y las proteínas mediante hexano y reactivos de Carrez (ferrocianuro de potasio y sulfato de zinc), respectivamente, seguido de la extracción de acrilamida con la utilización de disolventes polares. Además, el tratamiento con ultrasonidos y la filtración ayuda a la facilitación de la extracción y la purificación (Zargar et al.,2009).

4.2.1.5 QuEChERS (Quick Easy Cheap Effective Rugged Safe)

El método QuEChERS es un método de extracción y limpieza, muy popular ya que disminuye la cantidad de solventes a utilizar, los costes, el tiempo de respuesta y la eficacia en la extracción. Este método combina una etapa de extracción simple y una segunda etapa de extracción dispersiva en fase solida (dSPE) y un protocolo de limpieza que obtiene recuperaciones excelentes y una eliminación adecuada de interferencias (Anastassiades M et al.,2003).

En una primera etapa, se realiza la extracción con un disolvente orgánico, habitualmente acetonitrilo, en presencia de sales, cuyo procedimiento lo podemos ver en la figura 9. Las sales que se emplean en este punto son sulfato de magnesio (retiene agua y facilita la extracción) y cloruro sódico (favorece la separación de las fases y hace que la solubilidad del analito disminuya en la fase acuosa).

La segunda etapa de este método consiste en un clean-up del extracto mediante una dSPE. Las sales y sorbentes empleados en esta fase son sulfato de magnesio anhidro (elimina el agua), amina primaria/secundaria PSA (elimina ácidos grasos, ácidos orgánicos, azúcares y pigmentos), sorbente C₁₈ (limpian los excesos de grasas que existan, esteroides y sustancias no polares) y el carbón grafitado (para eliminar pigmentos).



Figura 9. Procedimiento de la extracción QUECHERS (Fuente: QuEChERS, phenomenex 2012)

4.2.2 Métodos de análisis de acrilamida en patata y café

Los métodos de determinación y cuantificación, al igual que los métodos de extracción y purificación han cambiado respecto a años atrás. Entre los métodos más utilizados para la determinación de acrilamida se encuentran la cromatografía de gases, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, además de métodos de cromatografía líquida.

Existen además técnicas de análisis cuyo objetivo es obtener resultados rápidos que dependiendo de la técnica se obtendrán mejores o peores resultados dependiendo de la sensibilidad y la selectividad de esas técnicas. Las técnicas actualmente utilizadas como métodos con resultados rápidos son: cromatografía líquida acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS), cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), técnica cualitativa del Test (ELISA; del ingles “ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas”) además de técnicas de fluorescencia y de biosensores electroquímicos.

4.2.2.1 Cromatografía de gases (CG)

La cromatografía de gases es un método físico de separación compuesto de fase móvil, puerto de inyección, horno de la columna, columnas, fase estacionaria, detector y sistema de registro de datos (Olguín et al.,2004). El esquema de un cromatógrafo de gases está descrito en la figura 10. Describe cómo se distribuye el analito entre la fase móvil de tipo gaseoso y una fase estacionaria que puede ser líquida o sólida donde la separación del analito se realiza en función de cómo las sustancias químicas se distribuyen entre la fase móvil y la fase estacionaria (Duque et al.,2015).

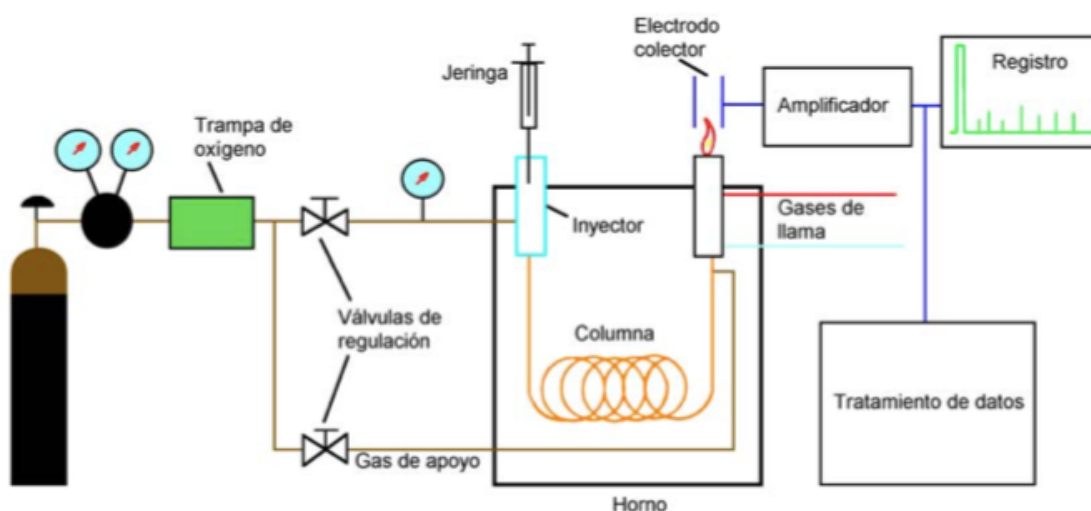


Figura 10. Esquema de un cromatógrafo de gases

(Fuente:http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_de_gases.pdf)

La muestra es inyectada en la fase móvil, la cual es un gas inerte. Los componentes de la muestra pasan a través de la fase estacionaria que se encuentra colocada en la columna dentro del horno con temperatura programada, las columnas actualmente utilizadas son las columnas capilares.

El tiempo de retención en la columna, es decir, la velocidad de migración de cada componente ocurre en función de cómo se distribuyen la fase móvil y la fase estacionaria (Sogorb y Vilanova E., 2004). Los diferentes solutos que contienen la muestra presentan distinta afinidad por la fase estacionaria, esto permite que se puedan separar: los componentes que se retienen fuertemente en esta fase se mueven lentamente en la fase móvil al contrario que ocurre con los componentes que se retienen débilmente que se moverán rápidamente en la fase móvil. La presión de

vapor de los componentes es un factor clave en este equilibrio (a mayor presión de vapor, menor tiempo de retención en la columna). Debido a la diferencia de movilidad, los distintos componentes de la muestra se separan en bandas que se pueden analizar tanto cuantitativamente como cualitativamente empleando detectores seleccionados (Olguín et al.,2004). El análisis de acrilamida se puede llevar a cabo directamente sin derivatizar la molécula o mediante bromación (Zhang et al.,2005).

4.2.2.1.1 Cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-MS)

La unión de la cromatografía de gases (CG) junto con la espectrometría de masas (MS) es una técnica para la separación, identificación y cuantificación de componentes volátiles y semivolátiles, a la vez que permite además la separación e identificación de mezclas complejas (Garrido et al.,2008).

Cuando se inyecta en el cromatógrafo de gases una mezcla de compuestos se separan en una columna cromatográfica, obteniendo así una elución sucesiva de componentes individuales que están aislados que pasan rápidamente al espectrómetro de masas. Cada componente es registrado como un pico cromatográfico y es identificado a través de su respectivo espectro de masas.

Mediante la técnica de cromatografía gases-masas la acrilamida puede analizarse o bien mediante derivatización con bromación.

❖ Análisis directo de acrilamida

Algunos autores (Amrein et al.,2005; Ellenberg et al.,2004, Hoenicke et al.,2004) proponen el análisis de acrilamida directo, debido a la alta polaridad de las columnas de acrilamida donde se utiliza fases polares como el polietilenglicol. El mayor problema en el análisis de CG sin derivatizar es la falta de picos característicos en el espectro de masas de la acrilamida. Los principales fragmentos son iones con relación masa-carga 55 y 72, utilizados además para la cuantificación. Existen sustancias con tiempos de retención aproximados a la acrilamida como el maltol o ácido heptanoico, que producen los mismos iones, lo cual puede inducir a error en la cuantificación (Biedermann et al.,2002; Shalini et al., 2010).

❖ **Análisis de acrilamida por derivatización con bromación**

El análisis mediante bromación se da desde 1990 (Castle,1993) y está compuesta por una extracción acuosa a raíz de la matriz seguida de una derivatización de acrilamida en 2,3-dibromopropionamida.

La derivatización se consigue mediante una solución acuosa de bromo elemental o con la utilización de KBrO_3 y KBr que son compuestos más seguros. Seguidamente, el derivado formado se extrae con acetato de etilo que puede ser inyectado mediante CG-MS directamente o para conseguir límites de detección más bajos puede ser preconcentrado o purificado. Aunque este método implica tiempos de trabajo mayores y es más complicado muestra mayores ventajas a en lo que se refiere a sensibilidad y selectividad, eliminación de interferentes y aumento de la volatilidad (Zhang et al.,2010; Shalini et al.,2009)

En lo relativo a la separación, se utilizan columnas de polaridad media-alta (Cheng et al.,2006). El empleo de CG-M/MS o con acoplamiento a un espectrómetro de masas de alta resolución puede disminuir la interferencia y obtener un buen límite de detección en ciertos alimentos (Hoenicke et al.,2004).

4.2.2.2 Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una técnica de separación analítica, que se lleva a cabo gracias a la afinidad del analito por una de las fases, fase estacionaria o fase móvil. Un líquido (fase móvil) circula en contacto con otro líquido inmiscible o un sólido que es la fase estacionaria. Al introducir los analitos (mezcla de sustancias) en la corriente de la fase móvil, cada analito avanza a lo largo de la corriente del sistema a una velocidad distinta, esto sucede dependiendo de la afinidad que tenga este por las fases anteriormente nombradas. Una vez terminado el recorrido de la muestra hace que cada analito eluya a un tiempo diferente por lo que al salir de este, se encuentran separados (Hernández,2007).

Este tipo de cromatografía de alta resolución requiere la existencia de una serie de dispositivos formando un sistema; como podemos observar en la figura 11 los componentes son:

- Dispositivo que suministra eluyentes (Bomba y mezclador de eluyentes)
- Dispositivo de inyección, el cual permite introducir la muestra en el sistema

- Columna que es el sistema de análisis
- Conducciones y conexiones
- Detector y registrador

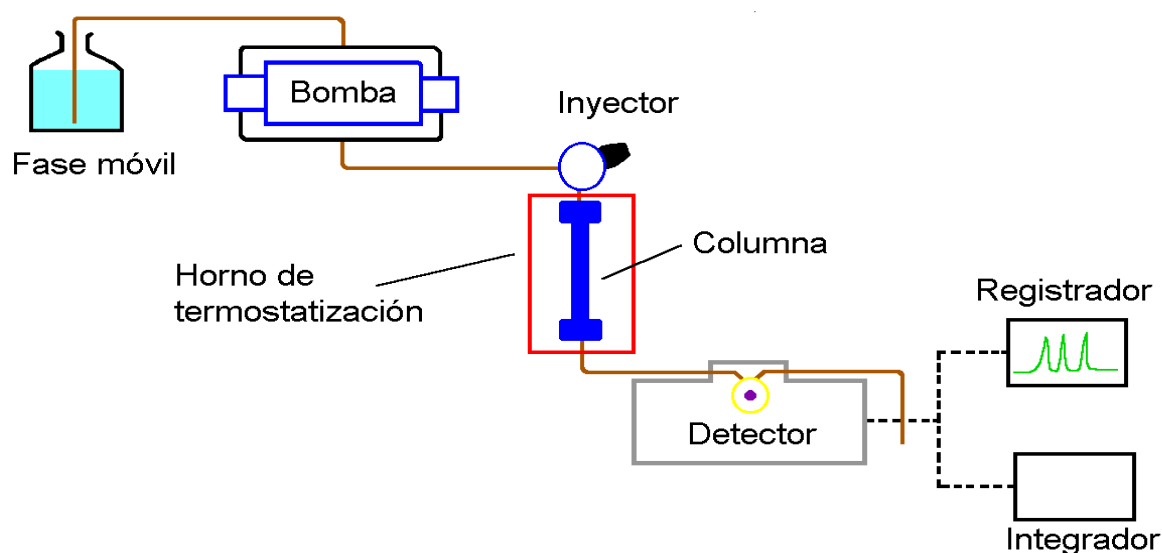


Figura 11. Componentes de un HPLC

(Fuente:http://www.mncn.csic.es/docs/repositorio/es_ES/investigacion/cromatografia/cromatografia_liquida_de_alta_eficacia.pdf)

Este método puede tener diferentes tipos de detectores para el análisis de acrilamida. Estos detectores son detectores de fluorescencia, de ultra-violeta (UV), detectores de índice de refracción, detectores electroquímicos entre otros. Para la determinación de acrilamida los más utilizados son los de UV y los de fluorescencia. En ocasiones al cromatógrafo se le agrega un espectrómetro de masas (MS).

- Detectores UV: Estos son clasificados como detectores de absorbancia. Proporcionan una buena sensibilidad y estabilidad además de su facilidad para operar. Durante el análisis la muestra pasa a través de una celda transparente de vidrio sin color que es la llamada celda de flujo. La luz UV es irradiada en la celda de flujo donde se encuentra la muestra que absorbe una parte de la luz UV. La intensidad de la luz que se observa para la fase móvil (sin muestra) y la muestra que contiene el eluyente será diferente. Al medir esta diferencia, se puede determinar la cantidad de muestra. Es importante elegir una buena longitud de onda dependiendo del analito. Para la acrilamida la longitud de onda más adecuada es de 254 nm.

- Detectores de fluorescencia: La fluorescencia se produce en compuestos con determinados grupos funcionales que se excitan a unas determinadas longitudes de onda y emiten una radiación de longitud de onda mayor que la radiación absorbida. La intensidad de esta luz emitida es la que se sirve para analizar la concentración de analito. Tienen una gran ventaja y es que son muy sensibles, llegando a ser más sensibles que los detectores de absorbancia (Gomis Yagües, 2008).

4.2.2.2.1 Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC-MS/MS)

El método de cromatografía líquida acoplada a masas-masas o masas tándem (LC-MS/MS) es un método de análisis para acrilamida ya que esta requiere de un método que sea de confianza para cuantificar cantidades pequeñas de este compuesto, fue creado en 2002 por Rosen & Hellenas, para verificar los resultados iniciales de el análisis de acrilamida por bromación en GC-MS.

LC-MS/MS tiene una alta selectividad en lo que se refiere al sistema de detección; la mayor parte de los trabajos publicados emplean la espectrometría de masas con un analizador de triple cuádruplo con ionización positiva por electrospray (Electrospray ionization, ESI) en el modo monitorización de reacción múltiple o MRM (Wenzl T et al., 2003 y 2007).

Los iones motorizados para el análisis de acrilamida por LC-MS/MS son $(\text{CH}_2=\text{CHC}=\text{O})^+=55$ y $(\text{CH}_2=\text{CHC}=\text{NH})^+=54$, $(\text{CH}_2\text{CHCONH}_2)=72$ m/z (Ahn et al., 2002).

La transición que tiene alta abundancia relativa es la $72>55$ que es la que siempre se selecciona para la cuantificación (Hoenicke et al., 2004; Rosen & Hellenas, 2002).

Para confirmar la presencia de acrilamida se han seleccionado en ocasiones las transiciones $72>54$, $72>44$ y $72>27$ (Becalski et al., 2003; Delatour et al., 2004). Se usa como patrón interno para la detección de isótopos de acrilamida la transición $75>58$ para el caso de $(^2\text{H}_3)$ acrilamida y $(^{13}\text{C}^3)$ acrilamida (Petersson et al., 2006) y una relación de iones de transición de 55/58 de iones para cuantificar la acrilamida (Cheng et al., 2009).

A pesar de que el modo MS-MS tiene una alta selectividad y que permite una buena separación de los analitos, inevitablemente se pueden producir interferencias, especialmente cuando la matriz es compleja (Becalski et al., 2003); se pueden

observar picos con tiempo de retención idénticos a la acrilamida y la acrilamida deuterada. Para que esto no ocurra, se recomienda volver a extraer el extracto acuoso obtenido en la muestra por medio de disolventes orgánicos de carácter polar como por ejemplo el acetato de etilo. Así de este modo, se pueden extraer interferentes como sales, azúcares, almidones o aminoácidos que permanecen en la fase acuosa y el extracto obtenido se puede analizar por LC-MS/MS (Becalski et al.,2003; Hoenicke et al.,2004; Zhang et al.,2005). En la transición 72>55 también existen compuestos que pueden interferir; para separarlos se debe utilizar una columna de intercambio iónico (Cavalli et al.,2004).

Debido al bajo peso molecular de la acrilamida y de sus fragmentos iónicos, la confirmación se logra monitorizando diferentes transiciones características. Sin embargo, ya que la acrilamida es una molécula muy polar con escasa retención en los rellenos convencionales de fase inversa, y a pesar del empleo de espectrómetros de masas en tándem operando en motorización de reacciones seleccionadas, la identificación de este compuesto se basa en los tiempos de retención cromatográfica y en la presencia y abundancia relativa de los iones característicos (Arribas G, 2013).

4.2.2.3 ELISA (Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas)

Esta técnica es llamada comúnmente ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) es un método rápido basado en la realización de inmunoensayos enzimáticos, es decir, en la formación de la unión del anticuerpo-antígeno con alta especificidad y afinidad, la unión se mide mediante detección óptica de productos coloreados catalizados por marcadores enzimáticos. Debido a la alta afinidad que tiene el antígeno por el anticuerpo y la alta eficacia que tiene la catálisis enzimática, ELISA tiene muchas ventajas como buena sensibilidad, selectividad y un alto rendimiento. El proceso está reflejado en la figura 12. La acrilamida al tener bajo peso molecular carece de grupos epitópicos fuertes y carece de inmunogenicidad. Por lo tanto, el antígeno completo debe sintetizarse a partir de unas proteínas transportadoras y la conjugación con acrilamida. Entonces, el anticuerpo de acrilamida se produce por inmunoreacciones que son producidas por el antígeno completo (Hu Q et al., 2015). Una forma de hacer este método es usar glutaraldehído para conjugar. Los dos grupos terminales sirven de puente para conectar los grupos amino de la proteína y la acrilamida generando una base de Schiff (Chan, Husseinayah y Sam., 2013).

Zhang, Gao et al.,2009 utilizaron este método para sintetizar un antígeno artificial a partir de acoplar acrilamida con albumina de suero bovino (BSA). Este es un método simple pero puede causar resultados bajos además de la pérdida de epítopes antigénicos (Zhou, Zhang, Wang y Zhao.,2008).

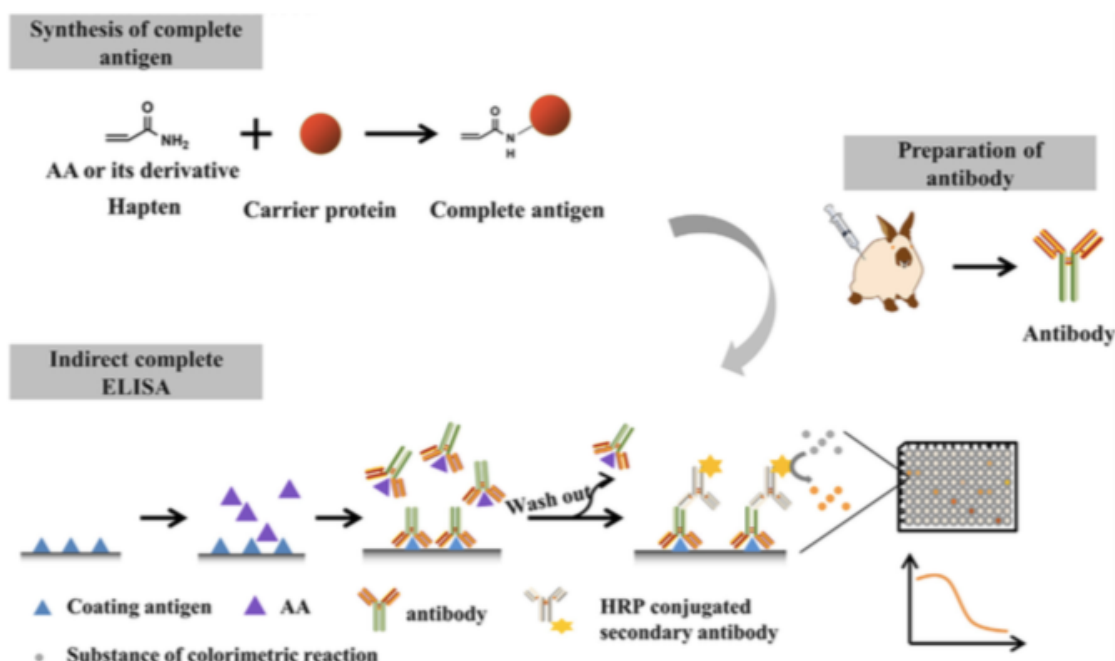


Figura 12. Esquema del método ELISA (Fuente: Hu Q et al.,2015)

5.DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA EN ALIMENTOS TÉRMICAMENTE PROCESADOS

Según diferentes estudios se ha demostrado que las patatas que no han sido sometidas a tratamiento térmico no contienen acrilamida pero si los precursores para la reacción de Maillard, demostrándose que el contenido de azúcares reductores que presentan las patatas, corresponden con la cantidad de acrilamida que se forma (Olsson et al.,2004).

Estudios demuestran que la cantidad de asparagina y azúcares reductores varía en función de la variedad de patata (Knutsen et al.,2009).

Mesías et al.,2017 han realizado estudios sobre la formación de acrilamida bajo condiciones controladas de manipulación y fritura donde se ha demostrado que las variedades de patata con menor contenido en azúcares reductores se asocian a una menor producción de acrilamida; es recomendable que si las patatas se van a destinar

a fritura se utilicen variedades con menores cantidades de azúcares reductores (Palermo et al.,2016). Algunos autores (Torres y Parreño,2009) recomiendan usar distintas variedades de patatas con diferentes características para fritura en tiras o patatas “chips”. La forma de cocinado es un factor importante; cuando se somete a un proceso de fritura donde se alcanzan temperaturas mayores a 120°C y humedad inferior a 2,5%, se forman mayores cantidades de acrilamida (Mottram et al.,2012), es por ello que como se puede observar mas adelante, la mayoría de los estudios realizados son en patatas fritas o en patatas “chips”. En las revisiones realizadas para la determinación de acrilamida en patatas encontramos que se emplean principalmente la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (LC-MS/MS), la cromatografía de líquidos con detección de electroquímica pulsada (LC-PED) y detección con diodo array (LC-DAD), la cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS/MS) y con detección de fluorescencia, cromatografía líquida de alta resolución acoplada a triple cuádruplo en tándem con espectrometría de masas (HPLC-QqQ-MS/MS) y con detección con ultravioleta (HPLC-UV). También es bastante empleada la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), la cromatografía de gases con ionización química positiva acoplado a espectrometría de masas (GC-PCI-MS/MS) y la cromatografía de gases con detección con electrón de captura (GC-ECD). En menor medida aunque también se utiliza es la cromatografía capilar como por ejemplo la inyección de muestra en campo ampliado con electroforesis capilar en tándem con espectrometría de masas (FASI-CE-MS/MS), la electroforesis capilar de zona (CZE) y la cromatografía capilar con electrocinética miscelar (MEKC).

También se usan técnicas de detección rápida como puede ser el método ELISA, métodos de biosensores electroquímicos y métodos de fluorescencia.

En las tablas 2 y 3 se muestra un resumen de los métodos utilizados para la determinación de acrilamida en patatas. Podemos observar que la técnica más empleada es GC-MS utilizando una dispersión de matriz con cartuchos C₁₈ después una derivatización (bromación) y seguido de clean-up con n-hexano.

En otros casos se utiliza extracciones en fase sólida que pueden ser magnética de fase invertida (RP-MSEP) o dispersiva (dSPE) estas dos utilizan como sorbente híbrido sol-gel de tetraetoxisilano-metiltrimetosilano.

Hay estudios también que utilizan una extracción asistida con ultrasonidos y microextracción dispersiva líquido-líquido, derivatizando con xanthidrol y clean-up con agua.

Otro estudio que fue realizado por Fernandes J.O. (Fernandes J.O et al., 2007) se analizaron 17 muestras de patatas fritas de distintos supermercados locales y de estas se tomó una muestra representativa de 20g, se trituró en un molino eléctrico y se almacenó a 4°C. Se aplicó una técnica de preparación de muestras basada en dispersión de fase sólida de matriz (MSPD). Se tomaron alícuotas de 0,5g de patatas se trituraron y dispersaron con 2 g de sorbente C₁₈ se mezclaron y la mezcla se empaquetó en una columna vacía y después de limpiarlo con n-hexano para desgrasarlo, la acrilamida se eluyó con agua (se realizó por duplicado, utilizando 4ml en cada ocasión). Después de un proceso de bromación del extracto, las muestras se analizaron con GS-MS en el modo de monitorización de iones seleccionado. Este método presenta buenas recuperaciones y los límites de detección y cuantificación fueron 12,8 y 38,8 µg kg⁻¹.

En otro estudio realizado por Lim H.H (Lim H.H et al., 2014) se tomaron 10 marcas distintas de patatas fritas y café en un supermercado local y se compraron patatas fritas en cinco restaurantes locales de comida rápida de Corea del Sur. Antes del muestreo cada muestra fue homogeneizada. Se analizaron 2 g de muestra, la acrilamida se extrajo con estos 2 g más 6 ml de cloruro de metileno. El extracto orgánico se diluyó con 3 ml de hexano y después, el analito se extrajo de nuevo con 0,5 ml de agua pura. La derivatización de la acrilamida se realizó en el extracto de agua. El derivado formado se inyectó en la LC-MS/MS sin ningún procedimiento extra de extracción o purificación. Con estas condiciones, los límites de detección y los límites de cuantificación fueron 0,04 y 0,14 µg kg⁻¹, respectivamente. La desviación estándar relativa fue menor al 8% en concentraciones de 20 y 100 µg/kg.

En otro estudio realizado por Banchemo M. (Banchemo M et al., 2013) se analizaron muestras de café Robusta en grano suministrado por Lavazza S.A de Italia. En este estudio primero se realizó un tratamiento previo a la torrefacción, es decir, un pre-tostado y posteriormente un proceso de extracción supercrítico con CO₂. La eficacia de eliminación de acrilamida se constató midiendo el contenido en los granos antes y después del tratamiento supercrítico. La primera parte consistió en realizar un tratamiento previo al tostado de los granos verdes de café para producir acrilamida en

las muestras que iban a ser tratadas con el solvente supercrítico. El tratamiento previo a la torrefacción se realizó en un tambor con una cámara de calefacción que se mantuvo a una temperatura constante hasta la formación de acrilamida. Se seleccionaron dos lotes diferentes y se sometieron a una extracción supercrítica. La extracción supercrítica se realizó en un aparato continuo que contenía 30 g de café pre-tostados donde se realizó a través de despresurización un precipitado del soluto que se recogió en una trampa de disolvente adecuado, CO₂ supercrítico contenido en un cilindro de gas. Se añadió también como disolvente etanol que cambió la polaridad del solvente y aumentó el rendimiento de extracción. El disolvente en la trampa se analizó con un espectrómetro de ultravioleta, donde se pudieron observar tres picos pero ninguno podía estar relacionado con el compuesto porque se superponían los picos de absorbancia UV de los componentes extraídos. El disolvente trampa se analizó por HPLC y mostró una cantidad muy pequeña de acrilamida para garantizar una medición cuantitativa precisa de la eficacia de la extracción. De todos modos al saber la masa del disolvente trampa y la absorbancia a 272nm, que era el pico más agudo, se utilizaron para estimar la cantidad acumulada del material total que fue extraído. El límite de detección fue 150 µg kg⁻¹ y la incertidumbre varió en el rango de 8-35% dependiendo de la concentración de acrilamida, con un nivel de confianza del 95%.

Otro estudio realizado por Stefanovic S (Stefanovi S et al.,2017) se analizaron muestras de patatas fritas y de café molido comprados en supermercados locales. Se tomó 1 g de patatas fritas y 2 g de café y la acrilamida se extrajo con agua y una mezcla acetonitrilo con NaCl y MgSO₄. La limpieza se realizó con MgSO₄ y PSA. Una vez realizado esto se analizó por LC-MS/MS dando unos resultados satisfactorios, la separación de la acrilamida fue bastante clara con un solo pico en el espectro de masas. El límite de cuantificación determinado experimentalmente fue de 35µg kg⁻¹ para el café y 20µg kg⁻¹ para las patatas fritas. Este método para la determinación de acrilamida en café y patatas fritas es apto para un autocontrol en la industria alimentaria. Las cualidades del rendimiento del método cumplen con los requisitos para la validación de métodos analíticos.

En otro estudio realizado por Wu J (Wu et al.,2014) se compraron muestras de patatas fritas, galletas y café en un supermercado local. Las altas cantidades de acrilamida que se forman en los alimentos térmicamente procesados y el riesgo que tiene para

la salud humana ha llevado a una demanda de métodos analíticos rápidos y simples como es el que se propone en este estudio. Se produjo un anticuerpo policlonal contra la acrilamida derivatizada con ácido 4-mercaptopiracético (4-MPA), que mostró una alta unión a la acrilamida derivatizada. Con este hecho, se desarrolló un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas indirecto competitivo (ciELISA) a través de una derivación de preanálisis. Este método dio un límite de detección de $0,036 \mu\text{g kg}^{-1}$. Los resultados de las pruebas de recuperación de preanálisis de muestras de alimentos que contenían acrilamida y el cribado de muestras de alimentos por ciELISA y HPLC-MS/MS indicaron una buena fiabilidad de ciELISA. Este método se ha considerado adecuado para muestras de identificación de detección de acrilamida de rutina a bajo costo.

Tabla 2. Técnicas de extracción y técnicas de análisis estándar de acrilamida. Nota; se presentan datos de LOD (límite de detección), LOQ (límite de cuantificación y %RSD (desviación estándar) (Elaboración propia)

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos de extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD(%)	Referencias
Patatas fritas (chips)	186,42-1828,75	MSPD con cartuchos de C_{18} . Clean- up con n-hexano después derivatización (bromación)	GC-MS	12,8	38,8	$\leq 5,5$	Fernandes J.O et al., 2007
Patatas fritas	1200-2200	SPME en soluciones de agua usando fibra recubierta de CW/DVB	GC-PCI-MS/MS	0,1	--	10,64	Lee M.R et al., 2007
Patatas fritas	164-2650	Derivatización (bromación), LLE con etilacetato. Clean-up con n-hexano	GC-ECD	0,1	3	<4	Zhang Y et al., 2006
Café	370-900	SFE con CO_2	LC-MS	--	150	8-35	Banchero M et al., 2013
Patatas fritas (chips)	1381	LLE con acetato de etilo. Clean-up con éter de petróleo. SPE con cartuchos OASIS HBL	HPLC-MS/MS	1	3	1,3-4,2	Zhang Y et al., 2007

Tabla 2 continuación

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos de extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD(%)	Referencias
Patatas fritas, café soluble y café tostado	1368	SPE cartuchos intercambiadores de cationes fuertes. Clean-up con reactivo de Carrez	LC-PED	1,4	--	9,6	Casella I.G et al.,2006
Patatas fritas (chips)	1306-2381	SPE Oasis HLB con metanol. Purificación con soluciones de Carrez	LC-DAD	4	2	$\leq 0,5$	Gökmen V et al., 2005
Patatas fritas	5-4215	SPE con cartuchos Strata-X-C elución con metanol:agua. Derivatización (ácido 2 mercaptobenzoico)	FASI-CE-MS/MS	8	20	$\leq 0,15$	Bermudo E et al.,2007
Café	79-715						
Patatas fritas	200-1200	SPE con cartuchos Strata-X-C con elución agua:metanol. Derivatización con ácido 2-mercaptopbenzoico)	CZE	0,07	5,8	$\leq 11,2$	Bermudo E et al., 2006
Patatas fritas	693-2510	Dilución con metanol. Clean-up con hexano	MEKC	0,1	0,33	$< 6,5$	Zhou X et al.,2007

Tabla 2 continuación

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos de extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD(%)	Referencias
Café tostado	50	QuECHERS extracción con mezcla de agua:acetonitrilo usando NaCl y MgSO_4 . Clean-up con MgSO_4 y PSA	LC-MS/MS	--	35	--	Stefanovi S et al.,2017
Patatas fritas	100				20		
Patatas fritas	68,04-94,17	UAE-DLLME con hexano. Clean-up con agua Derivatización xanthidrol	GC-MS	0,6	2	6,8	Zokaei M et al., 2017
Patatas fritas	750-752	dSPE como sorbente MTMOS-TEOS	GC-MS	9,1-12,8	27,8-38,9	<6,6	Omar M.M.A et al.,2014
Patatas fritas	--	SPE como sorbente NCSi	HPLC-UV	5	--	--	Zhang W et al ., 2014

Tabla 2 continuación

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos de extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD(%)	Referencias
Patatas fritas y café	1356	Detección fluorescente basado en polimerización	LC-MS/MS	3,5	--	--	Hu Q et al., 2014
Patatas fritas (chips)	--	MISPE elución con ácido acético, metanol y agua deuterada	HPLC-UV	72	--	4,7	Xu L et al., 2013
Patatas fritas	0,4-14,3	Derivatización (D-cisteína) con extractos de agua	LC-MS/MS	0,04	0,14	≤ 8	Lim H.H et al., 2014
Café	6,5-19,1						
Patatas fritas (chips)	--	SLE con agua. Derivatización con 2-naftalenotiol	HPLC equipado con detector de fluorescencia	129,2	388,4	--	Martínez E et al., 2017

Tabla 2 continuación

Matriz	Concentraciones encontradas (µg kg⁻¹)	Métodos de extracción	Métodos de análisis	LOD (µg kg⁻¹)	LOQ (µg kg⁻¹)	RSD(%)	Referencias
Patatas fritas	105-860	SPE con agua con cartuchos OASIS HLB	HPLC-QqQ-MS/MS	4	12	<20	Ferrer-Aguirre A et al., 2016
Patatas fritas	--	MIP sensor	HPLC	148	--	5,51	Liu X et al.,2016
Patatas fritas (chips)	120-1500	RP-MSEP. Clean-up usando Fe ₃ O ₄ -G-TEOS-MTMOS	GC-MS	0,243	0,813	1,5-3,9	Nodeh H.R et al.,2018
Patatas fritas	24,3-453,2	SLE con acido acético. Clean-up con hexano.	Medidas de fosforescencia	560	1850	0,6	Dermirhan B et al.,2017

Tabla 3. Métodos de extracción y métodos de análisis rápidos de acrilamida. Nota: Se presentan datos de LOD, LOQ y RSD%. (Elaboración propia)

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	Referencias
Patatas fritas	--	Extracción sólido-líquido con agua	Biosensores Electroquímicos	$8,5 \times 10^{-3}$	--	--	Stobiecka A et al., 2007
Puré de patata	--	Conjugación con glutaraldehído	ELISA	50	350	--	Fu Y et al., 2011
Patatas fritas	--	Conjugación con KLC	ELISA	18,6	60,6	--	Quan Y et al., 2011
Patatas fritas, galletas y café	--	Derivatización con ácido 4-mercaptopilacético	ELISA indirecta (ciELISA) HPLC-MS/MS	0,036	--	3,6-19,2	Wu J et al., 2014
Patatas fritas	50-2000	SPE con cartuchos OASIS HLB	Fluorescencia	15	--	--	Liu C et al., 2014

Tabla 3. continuación

Matriz	Concentraciones encontradas ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	Métodos extracción	Métodos de análisis	LOD ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g kg}^{-1}$)	RSD (%)	Referencias
Patatas y pan tostado	0,1	Derivatización con ácido 3-mercaptopbenzoico.	ELISA	0,1-5	--	--	Singh G et al.,2014

Abreviaturas MSPD: dispersión de matriz en fase solida; PCI: Ionización química positiva; ECD: Detección con electrón de captura; HPLC: cromatografía líquida de alta resolución; PED: Detección con electroquímica pulsada; DAD: Detección con diodo array FASI-CE-MS/MS: Inyección de muestra en campo ampliado con electroforesis capilar en tándem con espectrometría de masas. CZE: electroforesis capilar de zona; MEKC: cromatografía capilar con electrocinética miscelar; SPME: Micro extracción en fase solida de inmersión directa; HS-SPME: micro extracción en fase solida con espacio de cabeza; QuEChERS: Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged y Safe (Rápido, fácil, económico, eficaz, robusto y Seguro); CW/DBV: Carnowax/divinilbenceno; UAE-DLLME: Extracción asistida con ultrasonidos y Microextracción dispersiva líquido-líquido; UPLC-MS/MS: Cromatografía líquida de alto rendimiento acoplada a la espectrometría de masas en tándem por ionización por electrospray; HPLC-QqQ-MS/MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a triple cuádruplo en tándem con espectrometría de masas; Fe₃O₄-G-TEOS-MTMOS RP-MSPE: Grafeno modificado con magnetita y sol-gel hibridado con tetraetoxisilano-metiltrimetoxisilano; RP-MSPE: Extracción en fase solida magnética de fase invertida; SFE: Extracción con fluidos supercríticos; KLC: hemocianina de lapa californiana; MIP: Polímero impreso molecularmente; dSPE: Extracción en fase solida dispersiva; MTMOS-TEOS: Sorbente híbrido sol-gel metiltrimetoxisilano-tetraetoxisilano; NCSi: gel de sílice modificado con tetraazacalixarenetriazina; ELISA: ensayo inmuno-absorbente ligado a enzimas; MIPSE: Extracción en fase sólida con impresión; SLE: Extracción sólido-líquido

6. CONCLUSIONES

En este Trabajo Fin de Grado se ha realizado una revisión de los métodos de tratamiento de muestra y análisis que se utilizan en la actualidad para la determinación de acrilamida en alimentos térmicamente procesados, como son las patatas y el café, que son los alimentos donde se encuentran mayores concentraciones de acrilamida. De la evaluación de los niveles de concentración de acrilamida en alimentos térmicamente procesados se han obtenido una serie de conclusiones como las que se mencionan a continuación:

- La formación de acrilamida en alimentos se debe a las altas temperaturas que se utilizan a la hora de ser cocinadas .
- Los métodos de extracción empleadas con mayor frecuencia son SPE y LLE debido a que son métodos simples, baratos y con presión pero la LLE tiene un inconveniente que es un método lento.
- Los métodos mas empleados para la detección y cuantificación de acrilamida en alimentos son la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, además de otros métodos de determinación de acrilamida rápidos como son el método ELISA.
- De los trabajos revisados, las concentraciones de acrilamida entran dentro de los límites permitidos que establece la Unión Europea. Se llega a la conclusión que las patatas “chips” tienen concentraciones mayores de acrilamida que las patatas fritas que hacemos en casa.
- Los granos verdes de café no contienen acrilamida sino que esta se forma en el proceso de tostado, dependiendo la cantidad de acrilamida formada de la variedad de café que se utilice.

7. BIBLIOGRAFÍA

Agencia Española de Consumo, seguridad alimentaria y nutrición. AECOSAN (2018). http://www.aecosan.msssi.gob.es/AECOSAN/web/noticias_y_actualizaciones/noticias/2018/Acrilamida.htm

AINIA centro tecnológico.

<https://www.ainia.es/tecnoalimentalia/legislacion/comisioneeuropea-limites-acrilamida-alimentos/>)

Ahn, J., Castle, L., Clarke, D., Lloyd, A., Phil, M. & Speck, D. (2002). *Verification of the Findings of Acrylamide in Heated Foods*. Food Additives and Contaminants, 19: 1116-1124.

Amrein, T., Lukac, H., Andres, L., Perren, R., Escher, F., & Amado, R. (2005). *Acrylamide in roasted almonds and hazelnuts*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53:7819-7825

Anastassiades, M., Lehotay, S.J., Štajnbaher, D and Sheck, F.J.(2003). *Fast and Easy Multiresidue Method Employing Acetonitrile Extraction/Partitioning and "Dispersive Solid-Phase Extraction" for the Determination of Pesticide Residues in Produce*. Journal AOAC,86:412-431

Anese, M.,Suman, M.,Nicolini, M.C. (2010) .*Acrylamide removal from heated foods*. Food Chemistry,119: 791-794

Arribas, G. (2013). *Análisis, inhibición e ingesta de nuevos contaminantes químicos de procesado en alimentos*. Universidad Complutense de Madrid. Departamento de química analítica de la Facultad de Ciencias Químicas. Madrid. España.

Baardseth, P.,Blom, H., Skrede, G., Mydland, L.T., Skrede, A. (2006). *Lactic acid fermentation reduces acrylamide formation and other Maillard reactions in French fries*. Journal of Food Science,71:28-33.

Bagdonaite, K., Derler, K., & Murkovic, M. (2008). *Determination of acrylamide during roasting of coffee*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56:6081-6086.

Banchero, M., Pellegrino, G., Manna, L. (2013). *Supercritical fluid extraction as a potential mitigation strategy for the reduction of acrylamide level in coffee*. Journal Food Engineering, 115:292-297.

Becalski, A., Lau, B.P.Y., Lewis, D. & Seaman, S. (2003). *Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling*. Journal of Agricultural and Food Chemistry,51: 802-808.

- Bermudo, E., Nuñez, O., Puignou, L., and Galceran, MT. (2006). *Analysis of acrylamide in food samples by capillary zone electrophoresis*. Journal of Chromatography A, 1120: 199–204.
- Bermudo, E., Nuñez, O., Moyano, E., Puignou, L., and Galceran, M. (2007). *Field amplified sample injection-capillary electrophoresis-tandem mass spectrometry for the analysis of acrylamide in foodstuffs*. Journal of Chromatography A, 1159: 225–232.
- Biedermann, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A. & Grob, K. (2002). *Methods for determining the potential of acrylamide formation and its elimination in raw materials for food preparation, such as potatoes*. Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene, 93:653-667.
- Bortolomeazzi, R., Munari, M., Anese, M., & Verardo, G. (2012). *Rapid mixed mode solid phase extraction method for the determination of acrylamide in roasted coffee by HPLC-MS/MS*. Food Chemistry, 135:2687-2693.
- Cámara, C., Fernández, P., Martín-Esteban, A., Pérez-Conde, C., Vidal M. (2012). *Toma y Tratamiento de Muestras*. Ed. Síntesis, Madrid.
- Casella, I.G., Pierri, M., and Contursi, M. (2006). *Determination of acrylamide and acrylic acid by isocratic liquid chromatography with pulsed electrochemical detection*. Journal of Chromatography A, 1107:198–203.
- Cavalli, S., Polesello, S., and Saccani, G. (2004). *Determination of acrylamide in drinking water by large-volume direct injection and ion-exclusion chromatography-mass spectrometry*. Journal of Chromatography, (1039), 155-159.
- Chan, M. Y., Husseinsyah, S., & Sam, S. T. (2013). *Chitosan/corn cob biocomposite films by cross-linking with glutaraldehyde*. BioResources, 8:2910-2923.
- Cheng-Chih, W., Kao-Min, Y., Shih-Chih, D. Y., Chou-Shou, S., & Yeh, A. (2009). *Validation of an improved LC/MS/MS method for acrylamide analysis in foods*. Journal of Food and Drug Analysis, 17:190-197.
- Chen, F., Yuan, Y., Liu, J., Zhao, G., & Hu, X. (2008). *Survey of acrylamide levels in Chinese foods*. Food Additives and Contaminants: Part B, 1:85-92.
- Cheng, W., Hsiao, S., Chou, S., Hwang, L., Lu, T. & Yeh, A. (2006). *Determination of acrylamide in Chinese foods by GC-Ion trap MS using 2-Bromopropenamide and 2-Bromopropenamide-13C3*. Journal of Food and Drug Analysis, 14:207-214.

- Cortada-Cortés, C.(2012). *Nuevas Metodologías y Aplicaciones de las Técnicas de Microextracción Líquido-Líquido para la Determinación de Contaminantes Orgánicos*. Tesis Doctoral, Universidad de Alicante.
- David, RL.,James, RC., Richard, HS. (2012). *Acrylamide in foods: A review of the science and future considerations*. Annual Review Food Science Technology, 3:15-35.
- Delatour, T., Périsset, A., Goldmann, T., Riedeker, S. & Stadler, R. (2004). *Improved sample preparation to determine acrylamide in difficult matrixes such as chocolate powder, cocoa, and coffee by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52:4625-4631.
- Dermirhan, B., Buket, E. D., Nusret, E., Hayriye, E., Satana, K. (2017). *Rapid Detection of Acrylamide in Food Using Mn-Doped ZnS Quantum Dots as a Room Temperature Phosphorescent Probe*. Food analytical Methods, 11:1367-1373.
- Doroshenko, O., Fuhr, U., Kunz, D., Frank, D., Kinzig, M., Jetter, A., et al. (2009). *In vivo role of cytochrome P450 2E1 and glutathione-S-transferase activity for acrylamide toxicokinetics in humans*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 18:433-443.
- Duque, Z., Arango, L., and Arrubla, J. (2015). *Desarrollo de la técnica de cromatografía de gases (gc-fid) para la determinación de contaminantes emergentes tipo productos farmacéuticos*. Universidad Tecnológica de Pereira, Colombia.
- EFSA. (2011). *Results on acrylamide levels in food from monitoring years 2007- 2009 and exposure assessment*. In Scientific report of EFSA. <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2133.htm>.
- Elmore, JS., Koutsidis, G., Dodson, AT., Mottram, DS., et al. (2005). *Measurement of acrylamide and its precursors in potato, wheat, and rye model systems*. Journal Agricultural and Food Chemistry 53:1286-1293.
- Ellenberg, B. A. (2004). *General and fast methodology for the extraction and GC- MS analysis of acrylamide from carbohydrate-rich food samples*. Application Note 77. Germany: Varian.
- Erkekoglu, P., & Baydar, T. (2010). *Toxicity of acrylamide and evaluation of its exposure in baby foods*. Nutrition Research Reviews, 23:323-333.
- Fazendeiro, M. (2013). *DNA damage induced by acrylamide: Role of genetic polymorphisms in DNA damage levels*. <http://hdl.handle.net/10362/1000035>.

- Fernandes, J.O., and Soares, C. (2007). *Application of matrix solid-phase dispersion in the determination of acrylamide in potato chips*. Journal of Chromatography A, 1175: 1-6
- Fernandez, S., Kurppa, L., Hyvönen, L. (2003). *Content of acrylamide decreased in potato chips with addition of a proprietary flavonoid spice mix (Flavomare) in frying*. Innovations in Food Technology, 18: 24-26.
- Ferrer-Aguirre, A., Romero-González, R., Martínez-Vidal, J.L., 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.
- Fredriksson, H., Tallving, J., Rosen, J., Aman, P. (2004). *Fermentation reduces free asparagine in dough and acrylamide content in bread*. Cereal Chemistry, 81: 650- 653.
- Friedman, M. A., Dulak, L. H., & Stedham, M. A. (1995). *A lifetime oncogenicity study in rats with acrylamide*. Toxicological Sciences, 27: 95-105.
- Fu, Y., Li, Q., Chen, J., Wang, L., Li, R., Zhou, G., et al. (2011). *Rapid detection of acrylamide residue in heated food by enzyme linked immunosorbent assay*. China Brewing, 5: 23.
- Garrido, A., Plaza, P. & Martínez, J. (2008). *Comparison of tandem-in-space and tandem-in-time mass spectrometry in gas chromatography determination of pesticides: Application to simple and complex food samples*. Journal of Chromatography A, 1203:229-238.
- Gertz, C., Klostermann, S. (2002). *Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products*. European Journal of Lipid Science and Technology, 104:762–771.
- Gomis-Yagües, V. (2008). *Cromatografía De Líquidos De Alta Resolución. Técnicas Instrumentales en el Análisis Industrial*, 0-31.
- Gökmen, V. H., Senyuva, Z., Acar, J., and Sariöglu, K. (2005). *Determination of acrylamide in potato chips by high-performance liquid chromatography*. Journal of Chromatography A, 1088:193–199.
- Gökmen, V., Palazo, T., Fienyuva, H. (2006). *Relation between the acrylamide formation and time–temperature history of surface and core regions of French fries*. Journal of Food Engineering, 77:972–976.

Grob, K (2007). *Options for legal measures to reduce acrylamide contents in the most relevant foods*. Food Additives and Contaminants, 24: 71-81.

Hernández, J. M. (2007). *Cromatografía Líquida de Alta Eficacia. Enfermedades Hepáticas Autoinmunes*, 7:44-52.

Hoenicke, K., Gatermann, R. (2004). *Stability of acrylamide in food during storage*. Czech Journal of Food Science, 22:355-356.

Hoenicke, K., Gatermann, R., Harder, W., and Hartig, L. (2004). *Analysis of acrylamide in different food stuffs using liquid chromatography tandem mass spectrometry and gas chromatography tandem mass spectrometry*. Analytica Chimica Acta, 520:207-215.

Hogervorst, J. G. F., Baars, B. J., Schouten, L. J., Konings, E. J. M., Goldbohm, R. A., and Van den Brandt, P. A. (2010). *The carcinogenicity of dietary acrylamide intake: a comparative discussion of epidemiological and experimental animal research*. Critical Reviews in Toxicology, 40:485-512.

Hu, Q., Xu, X., Li, Z., Zhang, Y., Wang, J., Fu, Y., et al. (2014). *Detection of acrylamide in potato chips using a fluorescent sensing method based on acrylamide polymerization-induced distance increase between quantum dots*. Biosensors & Bioelectronics, 54:64–71.

Hu, Q., Xu, X., Fu, Y., Li, Y. (2015). *Rapid methods for detecting acrylamide in thermally processed foods: A review*. Food Control 56:135-146

Huang, Y., Wu, K., Liou, S., Uang, S., Chen, C., Shih, W., et al. (2011). *Biological monitoring for occupational acrylamide exposure from acrylamide production workers*. International Archives of Occupational and Environmental Health, 84:303-313.

IARC (1994). *Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*. International Agency for Research on Cancer.

JECFA. (2005). *Joint FAO/WHO expert committee on food additives: Sixty-fourth meeting*. <http://www.who.int/foodsafety/chem/en/>.

JECFA. (2011). *Evaluation of certain contaminants in food. In Seventy-second report of the joint FAO/WHO expert committee on food additives*. http://whqlibdoc.who.int/trs/who_trs_959_eng.Pdf.

Jung, MY., Choi, DS., Ju, JW. (2003). *A novel technique for limitation of acrylamide formation in fried and baked corn chips and in French fries*. Journal of Food and Science, 68:1287-1290.

- Knutsen, S.H., Dimitrijevic, S., Molteberg, E.L., Segtnan, V.H., Kaaber, L. y Wicklund, T. (2009). *The influence of variety, agronomical factors and storage on the potential for acrylamide formation in potatoes grown in Norway*. Journal Food Science and Technology, 42:550-556.
- Krajewska, A., Radecki, J., Radecka, H. (2009). *Sensors and Biosensors for Determination of Acrylamide and Acrylic Acid in Potato Food Products*. Food 3 (Special Issue 2). Global Science Books, 2:113-120.
- Krishnakumar, T., Visvanathan, R. (2014). *Acrylamide in Food Products: A Review*. Journal of Food Processing & Technology, 5:344.
- Lee, M.R., Chang, L.Y., and Dou, J. (2007). *Determination of acrylamide in food by solid-phase microextraction coupled to gas chromatography-positive chemical ionization tandem mass spectrometry*. Analytical Chimica Acta, 582:19–23.
- Liu, C., Luo, F., Chen, D., Tang, X., Ke, H., Chen, X. (2014). *Fluorescence determination of acrylamide heat-processed foods*. Talanta, 123:95-100.
- Liu, X., Mao, L.G., Wang, Y.L., Shi, X.B., Liu, Y., Yang, Y., He, Z. (2016). *Electrochemical Sensor based on Imprinted Sol-Gel Polymer on Au NPs-MWCNTs-CS Modified Electrode for the Determination of Acrylamide*. Food Analytical Methods, 9:114-121.
- Lim, H.H., and Shin, H.S. (2014). *A new derivatization approach with d-cysteine for the sensitive and simple analysis of acrylamide in foods by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1361:117–124.
- Matthaüs, B., Haase, N., Vosmann, K. (2004). *Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes*. European Journal of Lipid Science and Tecnology, 106:793–801.
- Martinez, E., Rodríguez, J.E., Bautista, M., Rangel-Vargas, E., Santos, M. (2017). *Use of 2-naphthalenethiol for derivatización and determination of acrylamide in potato chips by high-performance liquid chromatographic with fluorescence determination*. Food Analytical Methods, 11:1636-1644.
- Mottram, D.S., Wedzicha, B.L., Dodson, A.T. (2002). *Acrylamide is formed in the Maillard reaction*. Nature, 419:448–449.
- Nodeh, H.R., Ibrahim W.A.W., Kamboh, M.A., Sanagi, M.M. (2018). *Magnetic graphene sol-gel hybrid as clean-up adsorbent for acrylamide analysis in food samples prior to GC-MS*. Food Chemistry, 239:208–216.

- Olguín, L.P., and Rodríguez, H.M. (2004). *Métodos de biotecnología. Cromatografía de gases. México*. Universidad Nacional Autónoma de México, 6-15.
- Olsson, K., Svensson, R., Roslund, C. (2004). *Tuber components affecting acrylamide formation and colour in fried potato: variation by variety, year, storage temperature and storage time*. Journal of the Science of Food Agriculture 84:447–458.
- Omar, M.M.A., Ibrahim, W.A.W., and Elbashir, A.A. (2014). *Sol-gel hybrid methyltrimethoxysilane-tetraethoxysilane as a new dispersive solid-phase extraction material for acrylamide determination in food with direct gas chromatography-mass spectrometry analysis*. Food Chemistry, 158:302–309.
- Palermo, M., Gökmen, V., De Meulenaer, B., Ciesarová, Z., Zhang, Y., Pedreschi, F. y Fogliano, V. (2016). *Acrylamide mitigation strategies: critical appraisal of the Food Drink Europe toolbox*. Food & Function, 7: 2516-2525.
- Park, Y.W., Yang, H.W., Storkson, J.M., Albright, K.J., Liu, W. (2005). *Controlling acrylamide in French fry and potato chip models and a glucose model system by RP-HPLC-DAD*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 89: 674- 1681.
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K., Granby, K. (2005). *Color changes and acrylamide formation in fried potato slices*. Food Research International, 38:1-9.
- Pennisi, M., Malaguarnera, G., Puglisi, V., Vinciguerra, L., Vacante, M., and Malaguarnera, M. (2013). *Neurotoxicity of acrylamide in exposed workers*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 10:3843-3854.
- Petersson, E. V., Rosén, J., Turner, C., Danielsson, R. & Hellen, K. E. (2006). *Critical factors and pitfalls affecting the extraction of acrylamide from foods: an optimization study*. Analytica Chimica Acta, 557:287-295.
- QuEChERS, Phenomenex. (2012). *An Easier QuEChERS Solution for Multi-Residue Analysis from Food*.
- Quan, Y., Chen, M., Zhan, Y., & Zhang, G. (2011). *Development of an enhanced chemiluminescence ELISA for the rapid detection of acrylamide in food products*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59:6895-6899.
- Rosen & Hellenas, K. (2002). *Analysis of acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry*. Analyst, 127:880-882.
- Rydberg, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L. (2003). *Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51: 7012-7018.

Shalini, C., Bindu, C., Raja, R. and Arunachalam, D. (2010). *Remove from marked records; determination of acrylamide concentration in microbe free processed food products available in Indian market using GC-MS*. African. Journal of Microbiology Research, 4:1162-1170.

Singh, G., Brady, B., Koerner, T., Becalski, A., Zhao, T., Feng, S. (2014). *Development of a highly sensitive competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for detection of acrylamide in foods and water*. Food Analytical Methods, 7:1298–1304.

Sogorb & Vilanova, E. (2004). *Técnicas analíticas de contaminantes químicos*. España: Editorial Díaz de Santos. Cap. 9.

Stadler, R.H., Blank, I., Varga, N., Robert, F., Hau, J., Guy, P.A., Robert, M.C., Riediker, S. (2002). *Acrylamide from Maillard reaction products*. Nature, 419:449-450.

Stefanović, S., Đorđević, V., and Jelušić, V. (2017). *Rapid and reliable QuEChERS-based LC-MS/MS method for determination of acrylamide in potato chips and roasted coffee*. IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science, 85:012010

Stobiecka, A., Radecka, H., and Radecki, J. (2007). *Novel voltammetric biosensor for determining acrylamide in food samples*. Biosensor and Bioelectronics, 22: 2165-2170

Tardiff, R. G., Gargas, M. L., Kirman, C. R., Leigh Carson, M., & Sweeney, L. M. (2010). *Estimation of safe dietary intake levels of acrylamide for humans*. Food and Chemical Toxicology, 48:658-667.

Torres, M.D.A. and Parreño, W.C. (2009). *Thermal processing and quality optimization*. Advances in Potato Chemistry and Technology, 163-219.

Vattem, D.A., Shetty, K. (2005). *Composition of legume proteins and methods of use thereof for reducing acrylamide in cooked foods*. Patent US20050048172.

Vleeschouwer, K., Van der, P.I., Hendrickx, M.E. (2007). *Kinetics of Acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity*. Biotechnology Progress, 23: 722-728.

Valenzuela, R., Ronco, A.M. (2007). *Acrilamida en alimentos*. Revista chilena de nutrición, 34:1

Watzek, N., Boehm, N., Feld, J., Scherbl, D., Berger, F., Merz, K. H. (2012). *N 7-glycidamide-guanine DNA adduct formation by orally ingested acrylamide in rats: a doseeresponse study encompassing human diet-related exposure levels*. Chemical Research in Toxicology, 25:381-390.

- Wenzl, T., De la Calle, B. & Anklaam, E. (2003). *Analytical methods for the determination of acrylamide in food products*. Food Additives and Contaminants, 20:885-902.
- Wenzl, T., Lachenmeier, D. W., & Gökmen, V. (2007). *Analysis of heat-induced contaminants (acrylamide, chloropropanols and furan) in carbohydrate-rich food*. Analytical and bioanalytical chemistry, 389:119.
- Williams J. (2005). *Influence of variety and processing conditions on acrylamide levels in fried potato crisps*. Food Chemistry, 90:875–881
- Wu, J., Shen, Y.D., Lei, H.T., Sun, Y.M., Yang, J.Y., Xiao, Z.L. (2014). *Hapten synthesis and development of a competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay for acrylamide in food samples*. Journal of agricultural and Food Chemistry, 62:7078-7084
- Xu, L., Qiao, X., Ma, Y., Zhang, X., and Xu, Z. (2013). *Preparation of a hydrophilic molecularly imprinted polymer and its application in solid-phase extraction to determine of trace acrylamide in foods coupled with high-performance liquid chromatography*. Food Analytical Methods, 6:838–844.
- Zargar, B., Sahraie, N. R., and Khoshnam, F. (2009). *Catalytic square-wave voltammetric determination of acrylamide in potato chips*. Analytical Letters, 42: 1407-1417.
- Zeiger, E., Recio, L., Fennell, T. R., Haseman, J. K., Snyder, R. W., & Friedman, M. (2009). *Investigation of the low-dose response in the in vivo induction of micronuclei and adducts by acrylamide*. Toxicological Sciences, 107:247-257.
- Zhang, H., Gao, M., Zhang, X., & Liu, H. (2009). *Synthesis of acrylamide artificial antigen and preparation of anti-acrylamide polyclonal antibody [J]*. Chinese Agricultural Science Bulletin, 16:021.
- Zokaei, M., Abedi, A.S., Kamankesh, M., Shojaaee-Aliababadi, S., Mohammadi, A. (2017). *Ultrasonic-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as an efficient and sensitive method for determining of acrylamide in potato chips samples*. Food Chemistry, 234:55–61.
- Zhou, S., Zhang, C., Wang, D., & Zhao, M. (2008). *Antigen synthetic strategy and immunoassay development for detection of acrylamide in foods*. Analyst, 133:903-909.

- Zhang, Y., Ren, Y. & Zhang, Y. (2009). *New research developments on acrylamide: analytical chemistry, formation mechanism, and mitigation recipes*. Chemical Reviews, 109:4375-4397
- Zhang, Y., Zhang, G. & Zhang, Y. (2005). *Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods: review and recent developments*. Journal of Chromatography, 1:1-21.
- Zhang, Y., Dong, Y., Ren, Y., and Zhang, Y. (2006). *Rapid determination of acrylamide contaminant in conventional fried food by gas chromatography with electron capture detector*. Journal of Chromatography A, 1116:209–216.
- Zhang, Y., Jiao, J., Cai, Z., Zhang, Y., and Ren, Y. (2007). *An improved method validation for rapid determination of acrylamide in food by ultra-performance liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography A, 1142:194–198.
- Zhang, W., Deng, Z., Zhao, W., Guo, L., Tang, W., Du, H. (2014). *Determination of trace acrylamide in starchy foodstuffs by HPLC using a novel mixed-mode functionalized calixarene sorbent for solid-phase extraction clean-up*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 62:6100–6107.
- Zhou, X., Fan, L.Y., Zhang, W., and Cao, C.X. (2007). *Separation and determination of acrylamide in potato chips by micellar electrokinetic capillary chromatography*. Talanta, 71:1541–1545.