

UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA



**ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE PRETRATAMIENTO
SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA GENERACIÓN DE ACRILAMIDA
DURANTE LA FRITURA DE PATATAS EN ACEITE**

MÁSTER EN GESTIÓN Y SEGURIDAD ALIMENTARIA

Realizado por: Mariola Sansano Tomás

**Directoras:
Dra. Ana Belén Heredia Gutiérrez
Dra. Ana M^a Andrés Grau**

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo

ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DEL TIPO DE PRETRATAMIENTO SOBRE LA REDUCCIÓN DE LA GENERACIÓN DE ACRILAMIDA DURANTE LA FRITURA DE PATATAS EN ACEITE

Sansano, M.; Andrés, A.; Heredia, A.

Resumen: La acrilamida es una neurotoxina y un posible carcinógeno presente en una amplia gama de alimentos, y en especial en aquellos sometidos a un horneado o fritura. El objetivo de este trabajo fue analizar la influencia de la aplicación de un pretratamiento (congelación, escaldado (85 °C/ 5 min.), inmersión en disoluciones de NaCl, ácido cítrico, ácido nicotínico, lactato cálcico o glicina al 1 y 2%) sobre la generación de acrilamida durante la fritura en aceite de patatas. Además del análisis de acrilamida, se evaluó el efecto de los diferentes pretratamientos sobre el contenido en azúcares reductores de la patata al inicio de la fritura y sobre la evolución de las propiedades ópticas de la patata a lo largo de la operación. Los resultados obtenidos muestran que a excepción del escaldado y de la congelación, no existió un efecto significativo en ninguno de los pretratamientos aplicado sobre las coordenadas L*, a* y b*. Por otro lado, el contenido inicial en azúcares reductores de la materia prima condicionó el tiempo óptimo de fritura, sin embargo fue posible reducir dicho contenido mediante la aplicación de ciertos pretratamientos. Entre ellos, destaca el escaldado, el cual provoca una lixiviación de compuestos solubles, como son los azúcares reductores, al medio externo. Por último, los pretratamientos aplicados, mostraron una elevada efectividad en la reducción de acrilamida con respecto al contenido de este compuesto en la muestra sin pretratar, con una reducción media del 80% debida a los pretratamientos por inmersión en las disoluciones al 2%. La congelación, en cambio, conllevó un aumento del contenido de azúcares reductores en la patata y en consecuencia una elevada generación de acrilamida, no resultando por tanto, un tratamiento óptimo.

Palabras clave: acrilamida, color, azúcares reductores, pretratamiento.

Resum L'acrilamida és una neurotoxina i un possible carcinogen present en una àmplia gamma d'aliments, i en especial en aquells sotmesos a fornejat o fregit. L'objectiu d'aquest treball va ser analitzar la influència de l'aplicació d'un pretractament (congelació, escaldat (85 ° C / 5 min.), immersió en dissolucions de NaCl, àcid cítric, àcid nicotínic, lactat càlcic o glicina a l'1 i 2%) sobre la generació d'acrilamida durant el fregit en oli de creïlles. A més de l'anàlisi d'acrilamida, es va avaluar l'efecte dels diferents pretractaments sobre el contingut en sucres reductors de la creïlla a l'inici del fregit i sobre l'evolució de les propietats òptiques de la creïlla al llarg de l'operació. Els resultats obtinguts mostren que a excepció de l'escaldat i de la congelació, no va existir un efecte significatiu en cap dels pretractaments aplicats sobre les coordenades L *, a * i b *. D'altra banda, el contingut inicial en sucres reductors de la matèria primera va condicionar el temps òptim de fregit, però va ser possible reduir aquest contingut mitjançant l'aplicació de certs pretractaments. Entre ells, destaca l'escaldat, el qual provoca una lixiviació de compostos solubles, com són els sucres reductors, al medi extern. Finalment, els pretractaments aplicats, van

mostrar una elevada efectivitat en la reducció d'acrilamida pel que fa al contingut d'aquest compost en la mostra sense pretractament, amb una reducció mitjana del 80% deguda als pretractaments per immersió a les dissolucions al 2%. La congelació, en canvi, va comportar un augment del contingut de sucres reductors en la creïlla i a conseqüència, una elevada generació d'acrilamida, no resultant per tant, un tractament òptim.
Paraules clau: acrilamida, color, sucres reductors, pretractament

Abstract: Acrylamide is a neurotoxin and possible carcinogen which is present in a wide range of foods, especially those subjected to baking or frying. The aim of this study was to analyze the influence of the application of a pretreatment (freezing, blanching (85 °C / 5 min.), immersion in solutions of NaCl, citric acid, nicotinic acid, calcium lactate or glycine at 1 and 2%) on the generation of acrylamide during deep frying of potatoes. In addition to the analysis of acrylamide, the effect of different pretreatments on the reducing sugar content of the potato at the beginning of the frying and the evolution of the properties of the optical properties of the potato during the operation were evaluated. The results show that except blanching and freezing, there wasn't any significant effect on the pretreatments applied to the coordinates L^* , a^* b^* . On the other hand, the initial content of reducing sugars on the raw material determined the optimal time of frying, but it was possible to reduce the content through the application of certain pretreatments. Blanching was very effective because it causes lixiviation of soluble compounds, such as reducing sugars. Finally, the pretreatment applied showed a high effectiveness in reducing the content of acrylamide regarding the content of this compound in the samples without pretreatment, with an average reduction of 80% caused by pretreatments with immersion in solutions of 2%. Freezing, however, increases the content of reducing sugars in the potato and consequently, a high acrylamide generation. Because of this, freezing doesn't result an optimal treatment.

Key words: acrylamide, color, reducing sugars, pretreatment

INTRODUCCIÓN

En Junio de 2010 la Unión Europea publicó una serie de recomendaciones cuya finalidad era el control de los niveles de acrilamida en los alimentos, por parte de los estados miembros (2010/307/UE). Esta publicación surgió a partir del estudio de los niveles de acrilamida en determinados alimentos recopilados entre 2003 y 2006, los cuales resultaron excesivos. El estudio publicado demostraba la presencia acrilamida en alimentos ricos en carbohidratos sometidos a altas temperaturas, cuando hasta el momento se pensaba que la contaminación humana por acrilamida sólo procedía de la industria del plástico y otros materiales. Otro estudio realizado por el Área de Seguridad Alimentaria de la Conselleria de Sanitat indicaba que el contenido medio de acrilamida en patatas fritas de la Comunidad Valenciana es de 916 µg/Kg (Zubeldia y Gomar, 2007).

La acrilamida es un compuesto de bajo peso molecular altamente hidrosoluble con carácter tóxico de índole cancerígena. De ahí, la necesidad de controlar su incidencia en los alimentos y su formación durante el procesado.

Concretamente, la IARC (International Agency of Research on Cancer) clasifica la acrilamida en el grupo 2A, es decir, como un compuesto probablemente carcinogénico para los humanos.

Según ciertos estudios epidemiológicos, la toxicidad derivada del consumo de acrilamida se debe no sólo a la presencia de este compuesto sino además a su carácter precursor para la formación de otros compuestos como la glicidamida durante el metabolismo hepático, la cual puede formar fuertes enlaces con el ADN y las proteínas, así como lesiones de tipo nervioso en los humanos, en forma, generalmente, de neuropatía periférica (Blank, 2005).

La acriminada es un producto intermedio de la secuencia de reacciones químicas que dan lugar al pardeamiento no enzimático o reacciones de Maillard, como consecuencia de la reacción entre el aminoácido asparagina con los azúcares reductores (glucosa y fructosa). En concreto, el contenido en asparagina representa el 40 % del total de aminoácidos en la patata, lo que hace a esta matriz especialmente sensible (Yaylalan et al., 2003). Estas reacciones tienen lugar cuando el alimento es sometido a temperaturas superiores a 120 °C como ocurre en algunos procesos como la fritura u horneado. Por lo que la fritura de patatas es un proceso en el que la formación de acrilamida es especialmente importante debido a la predisposición del alimento para su formación y de las condiciones de fritura ($T^a > 120$ °C). La patata aporta los precursores en una concentración dependiente de la variedad, las condiciones del suelo y las condiciones de almacenamiento postcosecha (Kumar et al., 2004). Por otro lado, las variables del fritura que condicionan la generación de acrilamida son la temperatura del aceite, el tiempo de fritura, relación patata: aceite (Bråthen, & Knutsen, 2005; Ahrné et al., 2007; Gökmen, & Palazoglu, 2009) y ciertas propiedades de la patata como son el pH, actividad de agua, capilaridad y porosidad (Low et al., 2006). Las altas temperaturas combinadas con la baja humedad de la patata son las condiciones perfectas para la formación de acrilamida siguiendo la ruta de las reacciones de Maillard (Matthaus et al. 2004; Pedreschi et al. 2005). Por lo que, la cantidad formada aumenta conforme avanza la deshidratación del producto.

La aplicación de ciertos pretratamientos con el fin de reducir la generación de acrilamida parecen como el escaldado (Nuñez, 2001; Haase et al., 2003; Pedreschi et al., 2005) o la inmersión en disoluciones de ácidos orgánicos (Gertz et al., 2003; Jung et al., 2003; Rydberg et al., 2003; Stadler et al., 2004; Valenzuela y Ronco, 2007) han sido extensamente estudiados. Sin embargo, la aplicación de los mismos presenta ciertas limitaciones a nivel organoléptico en algunos casos. Por lo que, la búsqueda de nuevos pretratamientos que no afecten a la aceptación del producto por parte del consumidor, representa un reto científico reflejado en el aumento gradual del número publicaciones en los últimos 5 años (Jiménez et al., 2007). Es importante señalar que la mayoría de los estudios publicados al respecto se han desarrollado en sistemas modelo de almidón y no en alimentos reales, en los que la interacción de la estructura con los distintos precursores podría afectar la formación de acrilamida.

Las diferentes estrategias, ya sean convencionales o novedosas, orientadas a limitar la generación de acrilamida pueden agruparse en función del objetivo que persiguen:

- (a) disminuir el contenido de asparagina y azúcares reductores por lixiviación mediante la inmersión del producto en agua a temperatura ambiente o superior (escaldado)

- (b) bloquear químicamente la asparagina y por tanto su reactividad con los azúcares reductores
- (c) incluir en el producto aminoácidos que compitan con la asparagina en su unión con el grupo carbonilo de los azúcares reductores o,
- (d) actuar sobre algunas de las etapas intermedias de las Reacciones de Maillard.

La formación de acrilamida parece estar relacionada con los cambios en las propiedades ópticas en la superficie del producto reflejo de las reacciones de Maillard que tienen lugar durante la fritura. Un estudio llevado a cabo por Moyano y Río seco, 2001 concluyó que el aumento de la concentración de acrilamida y de la coordenada de color a^* , seguían una pauta cinética similar caracterizada por un aumento inicial hasta un valor máximo seguido de un descenso bastante acusado; por lo que, según este estudio, la coordenada a^* podía ser definida como un indicador del contenido de acrilamida en los alimentos sometidos a la fritura.

El objetivo principal de este trabajo ha sido por tanto, analizar la influencia del tipo de pretratamiento sobre la generación de acrilamida en un alimento real como es la patata frita por inmersión en aceite, y sobre la reducción del contenido en azúcares reductores de la materia prima. Adicionalmente, se ha evaluado el efecto del pretratamiento y del contenido inicial de azúcares reductores de la materia prima sobre la evolución del color de la patata a lo largo de la operación fritura.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materia prima

La variedad escogida para el desarrollo del estudio fue la *Frisia*, siendo ésta una variedad óptima para fritura. Se trata de una variedad semitemprana a semitardía, de piel amarilla y carne blanca-amarillenta y forma ovalada. Puesto que el trabajo experimental se prolongó durante 6 meses se trabajó con patata con un contenido bajo y alto de azúcares reductores.

Acondicionamiento de la materia prima

Las patatas se laminaron con ayuda de un cortafiambres hasta un espesor de 0,7 mm. Posteriormente, se obtuvieron cilindros de patata con un sacabocados, cuyo diámetro fue de 2,5 cm.

Metodología experimental

APLICACIÓN DE UN PRETRATAMIENTO

Los cilindros de patata se sometieron a los distintos tratamientos previamente a la fritura. Concretamente, las muestras se sometieron a una congelación a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 24h, un escaldado a $85\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 5 minutos o inmersión de las muestras en disoluciones de diferentes agentes químicos: ácido cítrico (Merck (Darmstadt, Germany), glicina (VWR, Fontenay-sous-Bois, France), lactato cálcico (Scharlan, Barcelona, Spain), cloruro sódico (sal fina de

mesa, Consum) o ácido nicotínico (Merck, Darmstadt, Germany) al 1 y 2% a temperatura ambiente durante 60 minutos. Así mismo, se realizó un control consistente en la inmersión de las muestras en agua a T^a ambiente durante 60 minutos. La relación muestra /disolución fue en todos los casos de 1/5 (p/v).

Una vez se extraen del pretratamiento correspondiente se retira el exceso de agua con papel absorbente durante 2 minutos para someter las muestras a continuación, a la etapa de fritura.

ETAPA DE FRITURA

La fritura se lleva a cabo a 180 °C en una freidora por inmersión en aceite de 2L de capacidad (marca Solac) (figura 1), volumen de aceite utilizado para la fritura. El aceite se calentará hasta la temperatura indicada por contacto de éste con el serpentín situado en el fondo. Una vez el aceite alcanzó la temperatura de fritura, lo cual vino indicado por el encendido de un dispositivo luminoso, se llevaron a cabo los experimentos de fritura en patatas fritas sometidos a los pretratamientos anteriormente descritos así como el patata sin pretratar. El aceite de fritura se cambió cada 2 experimentos.



FIGURA 1. Equipo de fritura por inmersión en aceite de 2L de capacidad (marca Solac)

La toma de muestras se llevó a cabo a diferentes tiempos de fritura en función de las determinaciones analíticas de color, contenido en azúcares reductores y acrilamida, y han sido especificados en cada uno de los apartados concernientes

SELECCIÓN DEL TIEMPO ÓPTIMO DE FRITURA

El tiempo óptimo de fritura se seleccionó únicamente en los experimentos llevados a cabo con las patatas que presentaban un contenido medio-alto de azúcares reductores, puesto que éstas fueron las utilizadas para realizar posteriormente las determinaciones de acrilamida y de azúcares reductores. La selección del tiempo óptimo se llevó a cabo en función de las características colorimétricas de las muestras a un tiempo dado de fritura. Se considera que las patatas fritas presentan una tonalidad óptima (color) cuando el parámetro a* presenta valores comprendidos entre 0 y -5 y b* superiores a 10 (Krokida et al., 2001). El tiempo seleccionado fue el mismo por tanto, para los experimentos llevados a cabo, con independencia del pretratamiento aplicado a las muestras, y poder así comparar los resultados.

Determinaciones analíticas

Tanto el contenido en azúcares reductores como en acrilamida se analizaron por triplicado en patata cruda y tras el pretratamiento. Además el contenido en acrilamida se determinó al tiempo óptimo de fritura (4 min.) y al doble del tiempo óptimo de fritura (8 min.) con el fin de analizar el efecto de un tiempo superior al óptimo.

PROPIEDADES ÓPTICAS

La determinación de las propiedades ópticas de los discos de patata en cada uno de los experimentos y a cada uno de los tiempos de fritura se realizó mediante un espectrocolorímetro (MINOLTA, mod. CM-3600d). Las coordenadas del espacio de color CIEL*a*b* se obtuvieron a partir del espectro de absorción proporcionado por el equipo entre 380 y 770 nm por reflectancia con un sistema de referencia: iluminante D₆₅ y observador 10°. Previamente, el equipo fue calibrado sobre fondo negro y blanco. Las medidas se realizaron sobre una de las caras con una lente de 7 mm, tomando a cada tiempo tres discos de patata para evitar errores.

La evolución del color durante la fritura se realizó en patata *Frisia* con dos concentraciones iniciales medios de azúcares reductores 0,1 y 0,35%.

La toma de muestras para las patatas con un contenido bajo de azúcares reductores fue cada dos minutos desde 0 a 16 minutos y a los 26 y 36 minutos de fritura. En cambio, para las patatas con un contenido medio-alto de azúcares reductores, la toma de muestras fue cada minuto hasta un total de 8 minutos. Los tiempos máximos acordados fueron aquellos que superaron visualmente el tiempo óptimo (elevado nivel de pardeamiento).

DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES

El estudio del contenido de azúcares reductores se determinó mediante un método espectrofotométrico (modelo V-630; Jasco Inc., Tokyo (Japan)). Esta técnica de oxido-reducción se basa en la capacidad de estos azúcares en reducir el ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS) bajo determinadas condiciones. La reducción del DNS produce una coloración más intensa cuanto mayor es la concentración de azúcares reductores. La coloración se evidencia con la medida de la absorbancia en el espectrofotómetro.

El protocolo analítico seguido fue obtenido a partir de un procedimiento específico de azúcares reductores (Ruiz y Ortiz, 2008):

- Preparación de la disolución de ácido dinitrosalicílico: Dilución de 4,8 g de NaOH (Scharlan, Barcelona, Spain) en 60 mL de agua destilada. Se adicionan 3 g de ácido dinitrosalicílico (Panreac, Barcelona, Spain) y 150 mL de agua destilada. Se diluye y añade 90 g de Sal de Rochelle (L(+)) Tartrato de potasio-sodio tetrahidrato, VWR, Fontenay-sous-Bois, France) y se enrasa a 300 mL.
- Desestructuración de la muestras de patata (cruda, pretratada o frita). Se pesan 0,3 g en un tubo de ensayo y diluye con 1 mL de agua destilada. Se adicionan 2 mL de la disolución de ácido dinitrosalicílico. También se prepara el blanco al cual contiene 1mL de agua destilada y 2 mL de la disolución de ácido dinitrosalicílico.

- Se someten las muestras y el blanco al baño maría durante 5 minutos.
- Se enfrían bajo agua fría durante 2 minutos agitando y 10 minutos en reposo.
- Se diluyen las muestras y el blanco cogiendo 1mL y diluyendo en 5mL de agua destilada.
- Se mide la longitud de onda a 546 nm.

La cuantificación de azúcares reductores se calcula partir de la fórmula siguiente (ecuación 1):

$$\% \text{Azúcares reductores} = (\text{Absorbancia} - 0.00385) \times 1.07893 \quad (1)$$

DETERMINACIÓN DE ACRILAMIDA

La determinación del contenido en acrilamida se llevó a cabo usando el método de extracción en fase sólida dispersiva denominado *QuEChERS* según una nota de aplicación de Agilent Technologies (Al-Tasher, F., 2011) con algunas modificaciones. Este método consiste en 2 fases, una primera dispersiva cuya composición es: 4 g de MgSO₄ y 0.5g de NaCl (Queehers1), seguida de una fase de limpieza y purificación de la muestra: 50 mg de PSA y 150 mg de MgSO₄ (Queehers2).

Reactivos y Solución Estándar

El estándar de acrilamida (≥99%) se obtuvo en Merck (Darmstadt, Germany). El cloruro de sodio PA se adquirió en Scharlab (Barcelona, Spain). Acetonitrilo (calidad HPLC), ácido fórmico (pureza de 99-100%) y sulfato de magnesio (MgSO₄) seco PA, fueron adquiridos en VWR (Fontenay-sous-Bois, France). El hexano (calidad UV-IR-HPLC) fue de Panreac (Barcelona, Spain). El PSA se obtuvo en Supelco (Bellefonte, PA). El agua bidestilada se preparó para su uso cromatográfico (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA).

Para la preparación de la solución de stock se pesaron 100 mg de acrilamida y se disolvieron en acetonitrilo hasta un volumen final de 100 mL. A partir de ésta se elaboraron disoluciones de trabajo de 1 y 10 µg/mL. Toda ellas fueron almacenadas a 4°C.

Extracción de la muestra

El proceso que se aplicó para la extracción de la acrilamida fue el siguiente: se pesaron 2 g de patata en un tubo Falcon de 50mL, se le añadieron, con la finalidad de eliminar la grasa de la muestra, 5 mL de n-hexano y se agitó en el vortex durante 30 segundos. A continuación, se añadieron 10 mL de agua bidestilada, 10 mL de acetonitrilo y el contenido del *QuEChERS* 1. Se agitó de nuevo en el vortex durante un minuto. Después se centrifugó el tubo a 3500 rpm durante 5 minutos, la fase de hexano (fase superior) se descartó y se recogió una alícuota de 1mL de la fase de acetonitrilo, donde queda retenida la acrilamida. Ésta se transfirió a un eppendorf de 2 mL que contenía el *QuEChERS* 2 y se agitó durante 30 segundos. Posteriormente se centrifugó a 5000 rpm durante 1 minuto y finalmente, 500µL del sobrenadante se transfirió a un vial para su posterior análisis por LC/MS/MS.

Análisis HPLC/MS-MS

El análisis cromatográfico se realizó utilizando un cromatógrafo 1200 Series (Agilent Technologies, Inc., CA; USA) acoplado a un espectrómetro de masas 6410 TripleQuad LC/MS de Agilent (Agilent Technologies Inc., CA; USA), con fuente de ionización tipo Electrospray, en modo positivo. La columna usada en el presente estudio fue una Zorbax Eclipse XDB C-18 (2.1mmx50mm, 1.8µm). El gradiente de elución fue el siguiente: inicialmente la composición fue de 0% de fase B (disolución de ácido fórmico al 0,1%) y 100% de fase A (agua bidestilada), hasta el minuto 4. A partir del minuto 4.10 un 30% de fase B hasta el minuto 6 y en el minuto 6:10 se ajusta al valor inicial: 0% de fase B. La temperatura del horno de columna se mantuvo constante a 30 °C. El flujo empleado fue de 0.2mL/minuto, y un volumen de inyección de 10 µL. Las condiciones usadas en la fuente de ionización fueron: T^a del gas de secado (N₂) de 350°C a 12L/min, presión del nebulizador de 40 psi y voltaje del capilar de 4000 voltios. El ión monitorizado fue el m/z 72, y los iones producto fueron 55.2 (cuantitativo) y el 26.7 (cualitativo).

Validación del método

Tal como exige la Directiva 96/23/CE, en cuanto al funcionamiento de los métodos analíticos, se realizó una validación del método con el fin de garantizar la fiabilidad a los resultados. Los parámetros que se tuvieron en cuenta para la validación fueron: linealidad, exactitud y precisión.

La linealidad del método (R²) se estudió mediante la fortificación de la matriz, cruda y frita (patata escaldada 85°C, 5min y posteriormente frita en aceite durante 4 min), estudiando 4 niveles (0, 10, 20 y 50 µg/kg) para la matriz cruda y 6 niveles (0, 10, 20, 50, 100 y 200 µg/kg) en el caso de la matriz frita. En la matriz frita se estudió un mayor rango de concentraciones, puesto que cabía esperar un mayor contenido de acrilamida en ésta. Para la construcción de las curvas de linealidad se representó el área obtenida del pico cromatográfico (ión producto de m/z 55.2) frente a la concentración de estándar de acrilamida adicionada.

La exactitud o recuperación, se calculó por el método de adiciones con tres niveles para la matriz cruda (10, 20 y 50 ppb) y cinco para la frita (10, 20, 50, 100 y 200ppb). La recuperación se evaluó a partir de tres curvas de cruda y tres de frita realizadas en tres días diferentes. Se calculó a partir de la fórmula siguiente (ecuación 2):

$$\% R = (C_{\text{obtenida}} / C_{\text{añadida}}) \times 100 \quad (2)$$

Siendo C_{añadida}, la concentración de estándar añadida (de referencia) y C_{obtenida}, la concentración calculada a partir de la respuesta (área) obtenida del cromatógrafo. Según la Directiva 96/23/CE en masas comprendidas entre 10-100 µg/Kg se admite una tolerancia de un DSR (desviación estándar relativa) del 20%, de lo que se deduce que la recuperación de nuestro método deberá estar comprendido entre un 80-120%.

La precisión, la cual se define a partir de la repetibilidad y reproducibilidad, se calculó en base a los resultados de recuperación. Con los resultados obtenidos en el primer día, para cada nivel estudiado, se obtuvieron los estudios de repetibilidad. Para ello se extrajeron las medias (\bar{X}) y desviaciones (SD) para cada nivel, a partir de los cuales se calcularon los coeficientes de

variación ($SD/ X \cdot 100$). Los cálculos de reproducibilidad se obtuvieron a partir de los resultados de recuperación tanto del día 1, como del día 2 y 3, para cada nivel.

Los criterios de aceptación o tolerancias de repetibilidad y reproducibilidad se basaron en la ecuación de Hortwitz (ecuación 3):

$$\text{Hortwitz \%CV} = 2^{(1-0,5\log C)} \quad (3)$$

Siendo C la concentración esperada. Para los valores de reproducibilidad, se consideraron aceptables los valores de coeficiente de variación (CV_R) menores o iguales al valor predicho por Horwitz. El CV_r (repetibilidad) se admite como válido hasta 0,66 veces el valor de la reproducibilidad.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto del tipo de pretratamiento sobre el contenido en azúcares reductores y acrilamida se evaluó mediante un análisis simple de la varianza (ANOVA simple), llevado a cabo con el programa de análisis estadístico Statgraphics Centurion con un nivel de confianza del 95% ($p\text{-valor} \leq 0.05$).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Efecto del contenido en azúcares reductores de la patata cruda y del pretratamiento sobre la evolución del color durante la fritura

En la figura 2 se muestra la evolución del parámetro de color a^* frente al tiempo de fritura para un contenido medio bajo (0,1%) y un contenido alto (0,35%) de azúcares reductores en patata fresca.

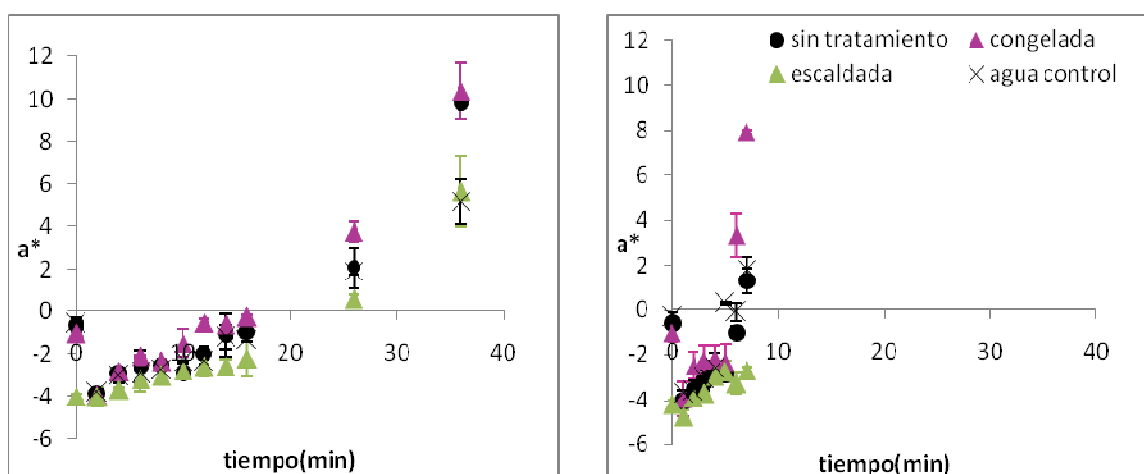


FIGURA 2. Evolución del parámetro a^* durante la fritura en aceite de muestras de patata sometidas a diferentes pretratamientos y con un contenido medio inicial de azúcares reductores de 0,1% (izquierda) y de 0,35% (derecha).

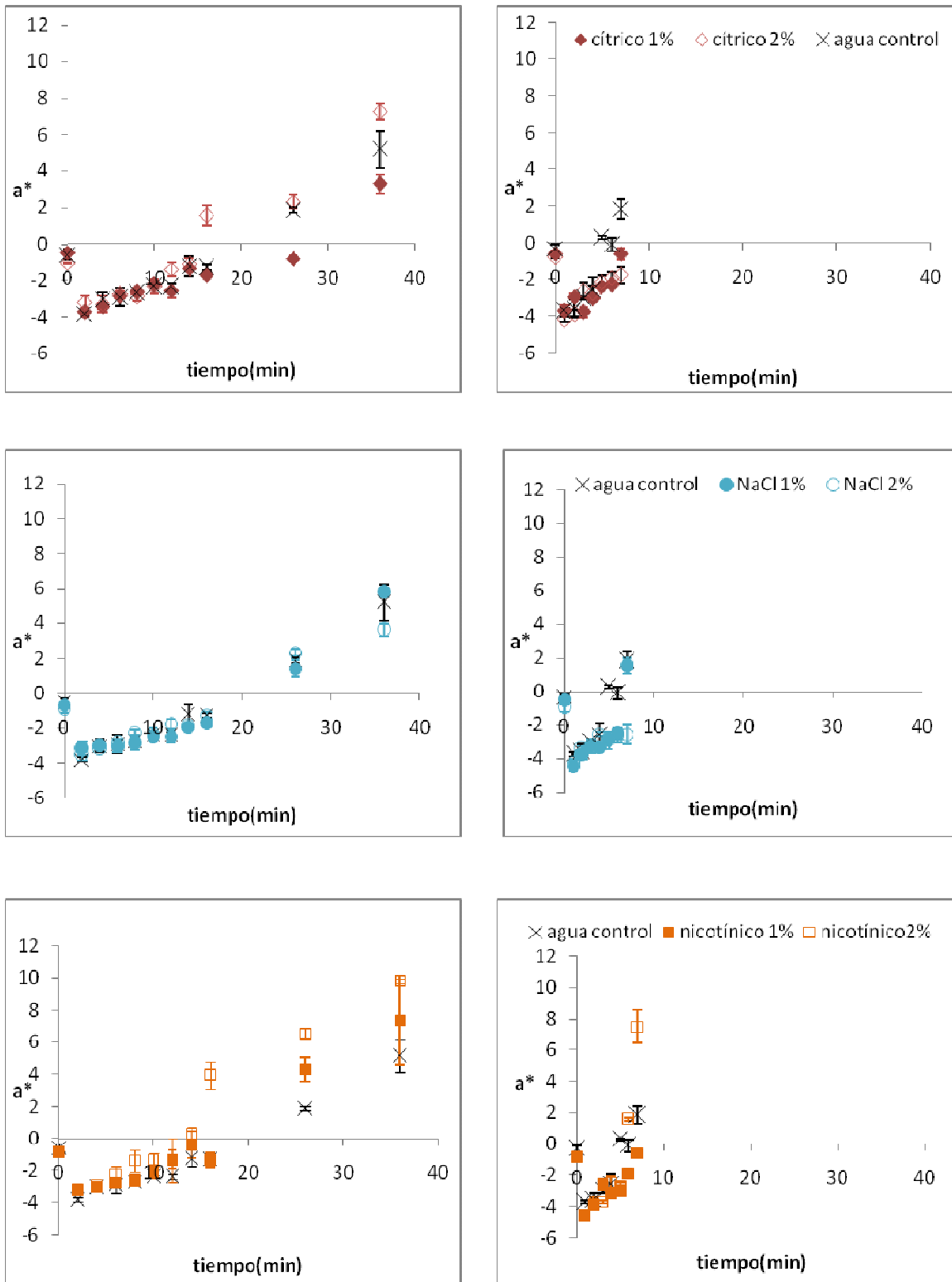


FIGURA 2. Evolución del parámetro a^* durante la fritura en aceite de muestras de patata sometidas a diferentes pretratamientos y con un contenido medio inicial de azúcares reductores de 0,1% (izquierda) y de 0,35% (derecha).
CONTINUACIÓN

La figura 3 muestra la evolución del parámetro a^* en las muestras pretratadas con lactato cálcico o glicina al 1 y 2% y con un contenido medio en azúcares reductores de 0.35% en la patata fresca, ya que cuando se realizaron

dichos experimentos no se disponía de patata fresca con un contenido inferior en azúcares reductores.

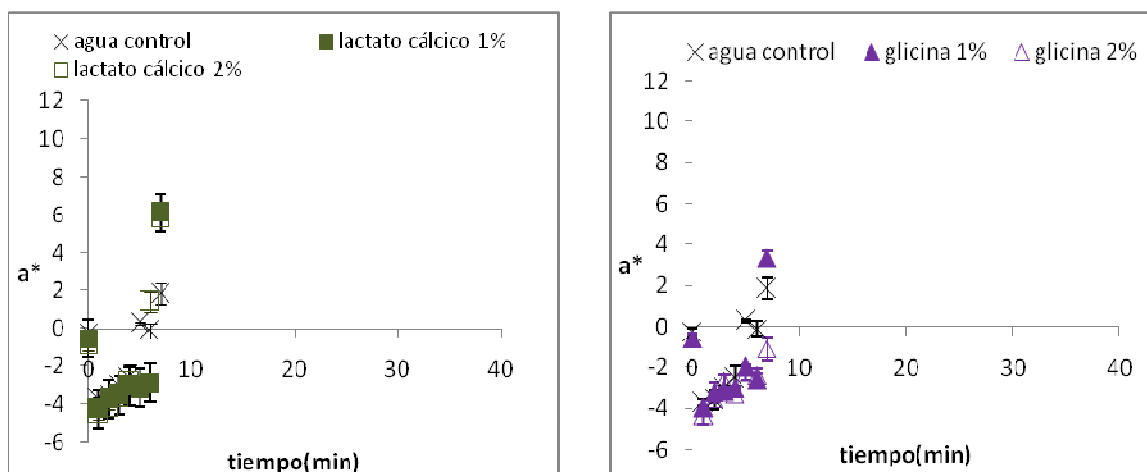


FIGURA 3. Evolución del parámetro a^* durante la fritura en aceite de muestras de patata pretratadas con lactato cálcico o glicina al 1 y 2% y un contenido medio inicial de azúcares reductores de 0,35%.

Como se puede observar, el contenido inicial de azúcares reductores en la patata, condicionó la cinética de evolución de la coordenada colorimétrica a^* (figura 3), así como de L^* y b^* (anexo). De forma que, cuanto mayor fue el contenido en azúcares reductores, más rápidamente evolucionó el parámetro a^* hacia valores positivos, como consecuencia de las reacciones de pardeamiento no enzimático que tienen lugar. Cabe destacar que la evolución de este parámetro fue similar en todos los casos, con un descenso inicial desde el tono presentado a tiempo 0 y el primer tiempo de toma de datos y un aumento posterior gradual hacia valores positivos en los primeros instantes de la fritura y drástico al final de la misma, llamando especialmente la atención los valores tan elevados de a^* de las muestras pretratadas mediante una congelación. Teniendo en cuenta que el tiempo óptimo es aquel para el cual las muestras presentan valores de a^* comprendidos entre 0 y -5 y de b^* superiores a 10 (Krokida et al., 2001), el tiempo óptimo para en el caso de las muestras con un contenido inicial en azúcares reductores de 0,35% fue de 4 minutos en todos los casos.

En cuanto al efecto del pretratamiento, el escaldado provocó un descenso inicial del parámetro a^* dando lugar a valores de a^* inferiores a lo largo de la fritura con respecto a las muestras sin pretratamiento o control. Con respecto al resto de pretratamientos, no existió un efecto significativo del tipo del pretratamiento aplicado ni de la concentración del agente utilizado (ácido cítrico, NaCl, lactato cálcico, ácido nicotínico o glicina), lo cual ofrece la posibilidad de obtener patatas fritas con un menor contenido en acrilamida (objetivo de la aplicación de un pretratamiento) y similares características organolépticas, al menos en cuanto al color se refiere, que las patatas sin pretratar.

En cuanto a la luminosidad de la muestra (L^*), las reacciones de Maillard dieron como resultado una disminución de la luminosidad de las muestras, siendo esta disminución significativa para el tiempo de fritura en el que a^* alcanzó valores positivos. El parámetro b^* presentó valores de entre 10 y 15, a

excepción de la patata escaldada en el que fue de cerca de 5 al inicio de la fritura, experimentando un aumento gradual hasta alcanzar valores máximos de entre 30 y 35 en todos los casos, a excepción de las muestras escaldadas (inferiores a 15).

El análisis de acrilamida se realizó al tiempo óptimo de fritura y al doble del tiempo óptimo, momento en el que el pardeamiento no enzimático estuvo avanzado.

Influencia del pretratamiento y del tiempo de fritura sobre el contenido de azúcares reductores de la patata

La tabla 1 muestra el contenido de azúcares reductores en patata sometida a los diferentes pretratamientos. El contenido en azúcares reductores ha sido expresado con respecto a 100 g de patata fresca con el fin de poder comparar los valores obtenidos entre sí. Para ello, se ha tenido en cuenta la variación de masa total experimentada por las muestras durante el pretratamiento. Tal y como es posible observar, la aplicación del pretratamiento conllevó, en general, una reducción del contenido en azúcares reductores con respecto a las muestras sin pretratar a excepción de las muestras pretratadas con una disolución de NaCl al 1%, lo cual está relacionado básicamente con la lixiviación de estos compuestos solubles durante la inmersión en agua (control) o en las distintas disoluciones empleadas. Por un lado, los resultados reflejan la ventaja de aplicar una inmersión en agua durante tiempos cortos-elevada temperatura (escaldado) frente a tiempos largos y temperaturas moderadas (control). Pedreschi (2004) obtuvo una reducción del contenido de azúcares reductores en patata de la variedad *Tivoli* del mismo orden (32%) a la obtenida en este trabajo. Además de la lixiviación de azúcares durante la inmersión en agua también se estaría promoviendo la pérdida de otros compuestos de elevada solubilidad como es el caso de la asparagina, segundo precursor de la generación de acrilamida (Granvogl et al., 2004).

La congelación, por su parte, dio como resultado un aumento drástico del contenido en azúcares reductores del 0,65(0,16) % consecuencia probablemente del estrés por frío experimentado por la materia prima al ser sometida a bajas temperaturas (-18 °C) en condiciones domésticas de congelación. El empleo de temperaturas inferiores combinado con una velocidad de congelación rápida (*fast-freezing*), limitarían satisfactoriamente este fenómeno (Fernández, 2008).

TABLA 1. Contenido en azúcares reductores (g/100g patata fresca) en patata pretratada.

PRETRATAMIENTO	Contenido en azúcares reductores (g/100g patata fresca)	Variación relativa %*
SIN TRATAMIENTO	0,35(0,05) de	-
ESCALDADO (85 °C/ 5 min.)	0,28(0,04) bcd	-20,9(10,6)
CONGELADO	0,65(0,16) f	100(20)
CONTROL (T ^a amb/ 60 min.)	0,316(0,004) cd	-10,7(0,7)
A.CÍTRICO 1%	0,23(0,02) ab	-38(6)
A.CÍTRICO 2%	0,205(0,019) ab	-42(5)
LACTATO CÁLCICO 1%	0,2183(0,0014) ab	-38,3(0,3)

LACTATO CÁLCICO 2%	0,219(0,006) ab	-38(2)
A.NICOTÍNICO 1%	0,25(0,03) abc	-29(7)
A.NICOTÍNICO 2%	0,259(0,016) bc	-27(4)
GLICINA 1%	0,205(0,018) ab	-42(5)
GLICINA 2%	0,18(0,04) a	-49(11)
NaCl 1%	0,370(0,003) e	-26(6)
NaCl 2%	0,177(0,017) a	-50(5)

abcdef Diferencias significativas debidas al pretratamiento (p-valor < 0.05)

* Respecto a las muestras sin tratamiento

El análisis estadístico simple de la varianza (ANOVA simple) mostró que los pretratamientos de control y NaCl al 1% no fueron efectivos a la hora de reducir el contenido inicial en azúcares reductores al pertenecer al mismo grupo homogéneo que los valores presentados por las muestras sin pretratar. Mientras que los pretratamientos por inmersión en ácido nicotínico (vitamina B3), lactato cálcico, ácido cítrico, glicina y NaCl al 2% dieron lugar a una reducción estadísticamente significativa con respecto a la no aplicación de un pretratamiento. Entre ellos, los pretratamientos más efectivos fueron la inmersión en glicina o NaCl al 2% (Figura 4).

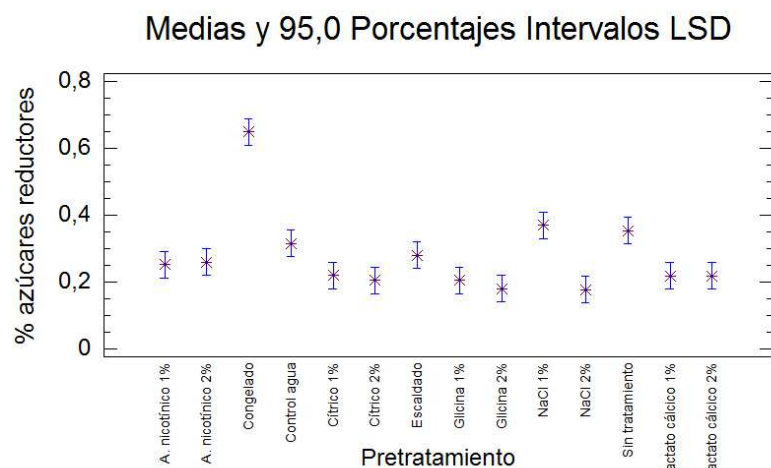


FIGURA 4. Gráfico de medias e intervalos LSD del contenido en azúcares reductores de la patata pretratada en función del tipo de pretratamiento.

Influencia del pretratamiento y del tiempo de fritura sobre la generación de acrilamida en patata

Para poder cuantificar la acrilamida contenida en las patatas fritas tras los distintos pretratamientos se hizo previamente una validación del método cromatográfico.

VALIDACIÓN DEL MÉTODO CROMATOGRÁFICO

Tal como se indica en materiales y métodos se estudió la linealidad, la precisión y la exactitud del método. A continuación se detalla los resultados para cada parámetro estudiado.

Linealidad

La linealidad se estudió con dos métodos: el primero con patrones puros y el segundo por el método de adiciones, fortificando patata cruda y frita. A partir de este estudio se concluyó que existe efecto matriz, ya que la pendiente de estándares en disolución era de 37,75, mientras que las fortificaciones en patata cruda y frita era de 3,3 y 2,4 respectivamente. Es por esto que se decidió utilizar para la cuantificación, curvas de matriz frita para las muestras de patata frita y cruda para las patatas tras los pretratamientos.

En la tabla 2 se resumen los valores de R^2 obtenidos.

TABLA 2. Linealidad del método, valores R^2 .

Parámetro	Tolerancia	Resultados	
		Cruda	Frita
R^2	>0.99	0,998	0,992
		0,999	0,993
		0,990	0,980

Los valores de R^2 fueron superiores a 0,99 en las 3 curvas de patata cruda, sin embargo en la frita fue superior a 0,98 en una de las curvas, por lo que es necesario seguir trabajando para mejorar la linealidad en esta matriz.

Exactitud (% recuperación)

Los resultados obtenidos de recuperación se muestran en las tablas 3 y 4 junto con su coeficiente de variación (CV) y su tolerancia.

TABLA 3. Resultados de recuperación para los distintos niveles y su tolerancia en patata fortificada cruda.

Nivel	Tolerancia		% Recuperación	CV
	% Recuperación	CV		
1			102	10
2	80-120	20%	99	7,2
3			95	6,2

TABLA 4. Resultados de recuperación para los distintos niveles y su tolerancia en patata fortificada frita.

Nivel	Tolerancia		% Recuperación	CV
	% Recuperación	CV		
1			99	10,0
2			82	5,9
3	80-120	20%	109	9,9
4			102	8,3
5			101	4,9

Tanto los valores en patata cruda como frita se encuentran dentro de los límites de tolerancia que indica la Directiva 96/23/CE para masas comprendidas entre 10-100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$.

Precisión (repetibilidad y reproducibilidad)

Las Tablas 5 y 6 muestran los valores de tolerancia calculados en cada nivel de fortificación para la repetibilidad y la reproducibilidad, así como los

resultados obtenidos del coeficiente de variación para ambos parámetros. Como se ha comentado anteriormente, los valores predichos por Hotwitz son las tolerancias de la reproducibilidad mientras que los valores de la repetibilidad se admiten como válidos hasta 0,66 veces el valor de la reproducibilidad. La tabla 5 corresponde a resultados sobre la matriz cruda y la tabla 6 sobre la frita.

TABLA 5. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad con sus respectivas tolerancias para cada nivel en patata cruda fortificada.

Nivel	Tolerancia		Resultados de la validación	
	Ecuación	$0.66 \times CV_R$	Repetibilidad	Reproducibilidad
	Hortwitz		% CV_r	% CV_R
1	32,00	6,30	6,5	9,5
2	28,83	5,35	3,5	8,1
3	25,12	4,35	0,6	6,6

En la matriz cruda, se observa que para el Nivel 1 (fortificación de 10 $\mu\text{g/Kg}$) no se cumplen las especificaciones exigidas en cuanto a la repetibilidad, por lo que se debería repetir el experimento a ese nivel y recalcular los datos con los nuevos resultados. Con estos nuevos cálculos, en caso de cumplir con lo exigido, se daría por válido el método, pero en caso contrario, se debería modificar o bien elegir otro método de análisis con el fin de que se cumplan las tolerancias exigidas.

TABLA 6. Resultados de repetibilidad y reproducibilidad con sus respectivas tolerancias para cada nivel en patata frita fortificada.

Nivel	Tolerancia		Resultados de la validación	
	Ecuación	$0.66 \times CV_R$	Repetibilidad	Reproducibilidad
	Hortwitz		% CV_r	% CV_R
1	32,00	32,2	10,0	48,8
2	28,83	26,2	29,2	39,7
3	25,12	5,5	8,3	8,3
4	22,63	5,4	11,3	8,3
5	20,39	2,7	2,6	4,1

Para la matriz frita no se cumplen las especificaciones exigidas en cuanto a reproducibilidad para los niveles 1 y 2 (10 y 20 $\mu\text{g/Kg}$ respectivamente), ya que presentan valores más altos que la tolerancia requerida en la ecuación de Hortwitz. En cuanto a la repetibilidad tampoco se cumpliría para los niveles 2, 3 y 4 (20, 50 y 100 $\mu\text{g/Kg}$). Es por esto que debería repetirse el estudio de estos niveles.

Por tanto con relación a las experiencias realizadas para la validación del método analítico de la acrilamida, se concluye que el método es exacto, sin embargo es necesario seguir trabajando para mejorar la linealidad de la matriz frida y la repetibilidad y reproducibilidad en ambas matrices. A pesar de ello, puesto que el objetivo del estudio es comparar los resultados entre los pretratamientos no se necesita que los valores puntuales sean totalmente precisos.

Las muestras fueron inyectadas en el cromatógrafo HPLC/MS/MS junto a las fortificaciones correspondientes para extraer la curva y poder interpolar las áreas pertenecientes a las muestras y obtener el contenido en acrilamida.

CONTENIDO EN ACRILAMIDA EN PATATA FRITA

Como era de esperar, tanto la patata fresca como tras el pretratamiento presentaron ausencia de acrilamida, confirmándose así la formación de este compuesto durante la fritura. La tabla 7 muestra el contenido medio y desviación estándar de acrilamida en patata frita durante 4 min (tiempo óptimo) y 8 min de fritura.

TABLA 7. Contenido en acrilamida ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ patata frita) al tiempo óptimo y 8 minutos de fritura y las respectivas variaciones relativas.

PRETRATAMIENTO	4 min fritura (t óptimo) (ppb)	Variación relativa (%)*	8 min fritura (ppb)	Variación relativa (%)**
SIN TRATAMIENTO	127(9) f	-	257(19) f	110(10)
ESCALDADO	13(2) a	-89,7(1,7)	186(8) e	1276(103)
CONGELADO	294(4) g	132(3)	794(11) h	179(4)
CONTROL (agua 60min)	124,0(1,4) f	-2,21(1,13)	354(83) g	186(67)
A.CÍTRICO 1%	32(5) bc	-75(4)	63,5(0,2) abcd	97,3(0,7)
A.CÍTRICO 2%	14,0(1,8) a	-88,9(1,4)	34(4) a	143(25)
LACTATO CÁLCICO 1%	103(5) e	-18(4)	345(3) g	233(3)
LACTATO CÁLCICO 2%	26(3) b	-79(2)	237(31) f	810(129)
A.NICOTÍNICO 1%	34(2) c	-73,0(1,8)	93(2) d	173(7)
A.NICOTÍNICO 2%	17,1(0,9) a	-86,5(0,7)	68(3) bcd	300(19)
GLICINA 1%	28(3) b	-78(2)	56(3) abc	104(11)
GLICINA 2%	60(3) d	-53(3)	52,8(1,3) ab	12(2)
NaCl 1%	107(14) e	-16(11)	184(13) e	71,5(12)
NaCl 2%	30,6(0,7) bc	-75,9(0,6)	86(2)cd	181(8)

^{abcdefg} Diferencias significativas debidas al pretratamiento (p-valor < 0.05)

*respecto a las muestras sin tratamiento tras 4 min. de fritura

**respecto a los valores de tiempo 4 minutos para el mismo pretratamiento

Los resultados obtenidos muestran un claro efecto del tipo de pretratamiento aplicado. En el tiempo óptimo de fritura se observa como los pretratamientos más efectivos para reducir el contenido en acrilamida son el escaldado, la inmersión de ácido cítrico o ácido nicotínico, seguidos del lactato cálcico, glicina y del NaCl, siendo mayor esta reducción conforme aumenta la concentración de la disolución de pretratamiento empleada, a excepción de la glicina. Por otro lado, la congelación favoreció la formación de acrilamida, generando incluso más del doble que en muestras sin pretratar, como consecuencia del aumento del contenido de azúcares reductores generado por el estrés por frío. La reducción de acrilamida a la inmersión de la muestra en ácido cítrico estaría relacionada con la protonización del grupo amino ($-\text{NH}_2$) de la asparagina limitando su unión con el grupo carbonilo de los azúcares (Rydberg et al., 2003; Stadler et al., 2004). Además, de que un pH alcalino.

actuaría como catalizador del pardeamiento no enzimático por lo que la disminución del pH de la patata limitaría dichas reacciones (Gertz et al., 2003). Aunque no se ha realizado un análisis sensorial en este estudio, Jung *et al.* (2003), indicaron que a una concentración del 2% en ácido cítrico se generan alteraciones sensoriales, leve gusto amargo y textura más dura, por lo que este pretratamiento podría no ser apto por sus consecuencias organolépticas.

En cuanto al efecto de los pretratamientos por inmersión en disoluciones con cationes tales como el NaCl o lactato, estaría relacionado con la reacción de sus correspondientes cationes (Na^+ y Ca^{2+}) con la el grupo carbonilo de la glucosa o fructosa evitando así la reacción del grupo amino de la asparagina y por tanto la formación la base de Schiff (Gökmen et al., 2007; Pedreschi et al., 2007). Es importante destacar que ambos cationes condujeron reducciones de acrilamida similares para los dos niveles de concentraciones estudiados. La adición de ácido nicotínico (vitamina B3), por su parte, también ha resultado un una elevada efectividad en cuanto a la reducción de este compuesto aunque se desconoce a qué nivel de las reacciones de Maillard interviene para bloquear las mismas (Zeng et al. 2009). Por último, la glicina al tratarse de un aminoácido estaría compitiendo con la asparagina, limitando de nuevo la generación de acrilamida (Rydberg et al. 2003, Low et al., 2006).

En cuanto al efecto del tiempo de fritura sobre el contenido en acrilamida, el aumento del mismo dio como resultado un notable aumento respecto al tiempo óptimo en todos los casos, a excepción de la glicina al 2%, que presenta un resultado muy similar a la fritura durante el tiempo óptimo.

El análisis estadístico simple de la varianza (ANOVA simple) mostró que el control no fue efectivo para reducir el contenido en acrilamida, perteneciendo al mismo grupo homogéneo que las muestras sin pretratar. Este hecho confirmaría de nuevo que la reducción de acrilamida se debió no a la inmersión de la muestra en agua, y a una posible lixiviación de los azúcares, sino a la presencia de un agente químico. La congelación generó más del doble que la muestra sin pretratar, observándose aislada del resto de pretratamientos (figura 5). Los pretratamientos que supusieron una reducción significativa respecto a sin pretratamiento fueron el escaldado y las disoluciones en agentes químicos, especialmente los que presentan concentraciones del 2%(excepto la glicina 2%). Los más efectivos fueron pues, el escaldado, la inmersión ácido cítrico y nicotínico al 2%, pertenecientes al mismo grupo homogéneo.

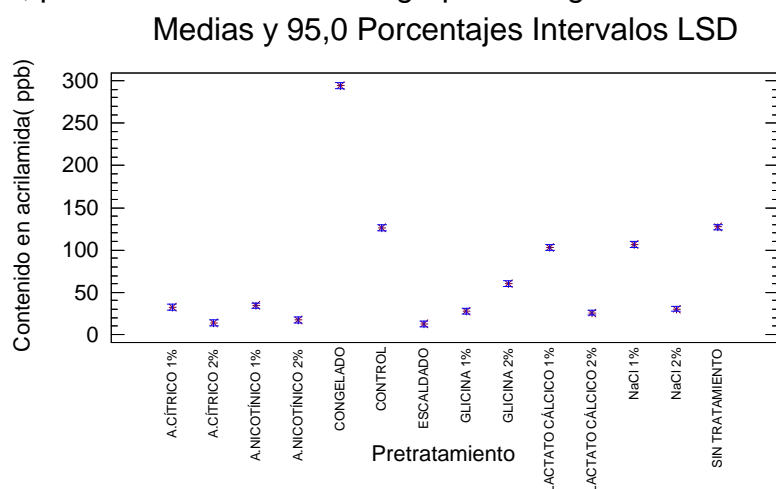


FIGURA 5. Gráfico de medias e intervalos LSD del contenido en acrilamida de la patata en el tiempo óptimo de fritura en función del tipo de pretratamiento.

Se ha consultado recopilaciones de valores de acrilamida elaborados por distintos organismos con tal de compararlos con los valores que hemos obtenido. En un estudio efectuado por la EFSA (European Food Safety Authority, 2010) se recogen los contenidos de acrilamida en distintos alimentos de la mayoría de los países miembros de varios países. Así, los niveles de acrilamida en patatas fritas tipo *French Fries* fueron de 355(2) y 283 (2) $\mu\text{g}/\text{kg}$, y en patatas de bolsa (potato crisps) de 575(1) y 628(2) $\mu\text{g}/\text{Kg}$ en 2007 y 2008, respectivamente. Por lo que, los niveles de acrilamida en este estudio, incluso en patata sin pretratar, estuvieron muy por debajo de los niveles de los productos comercializados en la Unión Europea.

Relación entre el contenido en azúcares reductores al inicio de la fritura y generación de acrilamida

La figura 6 muestra la relación entre el contenido en acrilamida al tiempo óptimo de fritura y el contenido en azúcares reductores de las muestras al inicio del mismo. Teóricamente, cabe esperar que cuanto menor sea el contenido de glucosa y fructosa, menor será la posterior formación de acrilamida. Sin embargo, únicamente se observó esta relación cuando las muestras presentaron un nivel medio en azúcares reductores superior a 0.3%. Este hecho indicaría que la limitación de generación de acrilamida está más relacionada con el efecto de los diferentes agentes químicos utilizados y en sus mecanismos para bloquear las reacciones de Maillard, que con la concentración de azúcares reductores en el producto al inicio de la fritura.

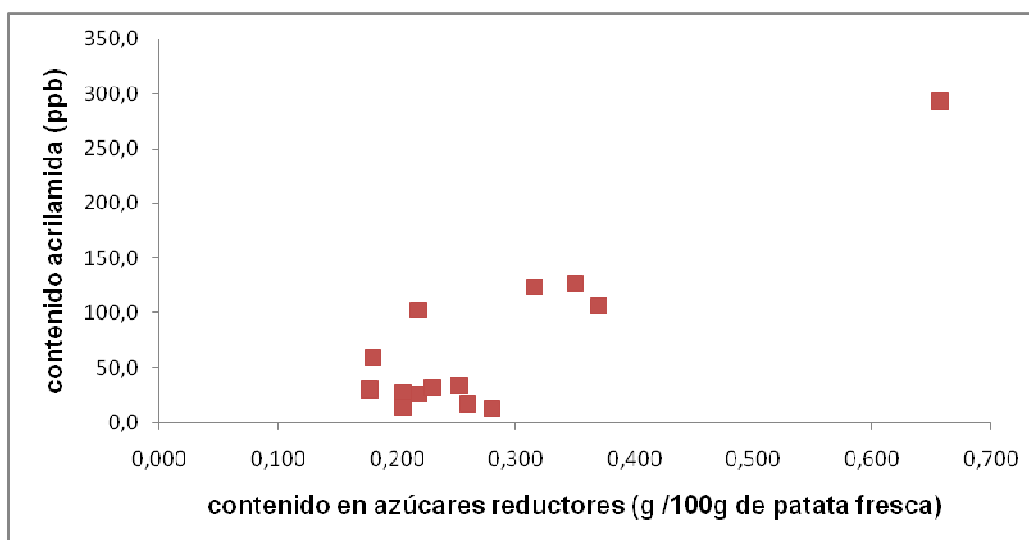


FIGURA 6. Relación entre el contenido en acrilamida en la fritura durante el tiempo óptimo y contenido en azúcares reductores presentes en patata tras el pretratamiento.

CONCLUSIONES

El contenido en azúcares reductores en la patata fresca condicionó el tiempo óptimo ya que a menor contenido inicial mayor tiempo transcurre hasta alcanzar valores del parámetro de color a^* superiores a 0. El efecto del pretratamiento sobre el color no fue significativo, a excepción del escaldado y de la congelación, para los últimos tiempos. Los pretratamientos aplicados

dieron como resultado una disminución del contenido inicial de azúcares reductores de la patata fresca, siendo el escaldado el pretratamiento más efectivo. Por otro lado, el contenido en azúcares reductores inicial de la materia prima condicionó el tiempo óptimo de fritura, aunque sin embargo es posible reducir dicho contenido mediante la aplicación de ciertos pretratamientos entre los que destaca el escaldado, el cual provoca una lixiviación de compuestos solubles, entre ellos los azúcares reductores, al medio externo.

Respecto a la reducción de acrilamida, los resultados ponen de manifiesto que es posible reducir su contenido mediante la aplicación de diferentes pretratamientos, siendo los más efectivos, de entre los evaluados, la inmersión de la patata en disoluciones de ácido cítrico o nicotínico al 2%. Además, la aplicación de una elevada temperatura y poco tiempo (condiciones de escaldado) también resultó más efectiva frente a la aplicación de temperaturas moderadas y tiempos prolongados de inmersión (control). Por último, es importante tener en cuenta que el pretratamiento óptimo no será aquel que más limite la generación de acrilamida durante la fritura sino también el que no modifique las características organolépticas del alimento frito tales como color, textura, aroma y sabor. Por lo que sería necesario llevar a cabo un análisis sensorial de las muestras para evaluar la percepción de estos atributos por parte del consumidor.

REFERENCIAS

- Ahrné, L., Andersson, C. G., Floberg, P., Rosén, J., Lingnert, H. (2007). Effect of crust temperature and water content on acrylamide formation during baking of white bread: Steam and falling temperature baking. *LWT - Food Science and Technology*, 40(10), 1708-1715.
- Al-Tasher, F. (2011). Analysis of Acrylamide in French Fries using Agilent sampliQ QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS. Agilent Technologies.
<http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5990-5940EN.pdf>
- Blank, A., (2005) Current status of acrylamide research in food: Measurement, safety assessment, and formation. *Ann NY Acad Sci* 1043:30-40
- Bråthen, E. & Knutsen, S. H. (2005). Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chemistry*, 92(4), 693-700.
- Diario Oficial de la Unión Europea (2010). Recomendación de la comisión de 2 de junio de 2010 relativa al control de los niveles de acrilamida en los alimentos (2010/307/UE).
- EFSA, (2008). Results on acrylamide levels in food from monitoring year 2008. *EFSA Journal* 2010; 8(5):1599
- Fernández, C. (2008) Caracterización reológica y optimización de la textura de purés de patata frescos y congelados. Efectos del proceso y adición de crioprotectores. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid.
- Gertz, C., Klostermann, S. & Kochhar, P. (2003). Deep frying: the role of water from food being fried and acrylamide formation. *Oléagineux Corps Gras Lipides*, 10(4), 297-303.
- Gökmen, V. & Senyuva, H.Z. (2007). Acrylamide formation is prevented by divalent cations during the Maillard reaction. *Food Chemistry* 103 (2007) 196–203.
- Gökmen, V. & Palazoglu, T.k. (2009). Measurement of evaporated acrylamide during frying of potatoes: Effect of frying conditions and surface area-to-volume ratio. *Journal of Food Engineering*, 93, 172-176.
- Granvogl M., Koehler, P., Latzer, L., and Schieberle, P. (2008). Development of a Stable Isotope Dilution Assay for the Quantitation of Glycidamide and Its Application to Foods and Model Systems. *J. Agric. Food Chem.*, 56, 6087–6092
- Haase, U.N., Matthaus, B. & Vosmann, K. (2003). Acrylamide formation in foodstuffs - Minimising strategies for potato crisps. *Deutsche Lebensm. Rund*, 99(3), 87-90.

- Jiménez, S., Morales Navas, F.J., Arribas-Lorenzo, G. & Martí López, E. (2007). Formación de acrilamida durante el procesado y cocinado de alimentos. Instituto del Frío - CSIC.
- Jung, M.Y., Choi, J. & Ju, J.W. (2003). A novel technique for limitation of acrylamide formation in fries and baked corn crisps and in French fries. *Journal food science*, 68(4), 1287-1290.
- Krokida, M.K., Oreopolou, V., Maroulis, Z.B. & Marinos-Kouris, D. (2001). Deep fat frying of potato-strips-quality issues *Drying Technology*, 19, 879-935.
- Kumar, D., Singh, B. P. & Kumar. P. (2004). An overview of the factors affecting sugar contents of potatoes. *Ann. Appl. Biol*, 145, 247-256.
- Low, M.Y., Koutsidis, G. Parker, J.K. et al. (2006). Effect of citric acid and glycine addition on acrylamide and flavour in a potato model system. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 5976–5983.
- Matthaus B, Haase N, Vosmann K. 2004. Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 106, 793–801.
- Moyano, P. y Ríoseco, V. (2001) Kinetics of crust color changes during deep-fat frying of impregnated french fries. *Journal of Food Engineering*. Volume 54, Issue 3, 249-255
- Nuñez H. 2001. Calidad en la producción de papas fritas. En: Hurtado ML. Presente y perspectivas de la industria de snacks en Chile. *Publicaciones Miscelaneas Agrícolas No 50*. Santiago, Chile. 41-48.
- Pedreschi, F., Kaack, K. & Granby, K. (2004). Reduction of acrylamide formation in potato slices during frying. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie*, vol: 37, issue 6, 679-685
- Pedreschi, F., Moyano, P., Kaack, K. & Granby, K. (2005). Colour changes and acrylamide formation in fried potato slices. *Food Research International*, 38, 1-9.
- Pedrischi F., Bustos, O., Mery, D. et al. (2007). Colour kinetics and acrylamide formation in NaCl soaked potato chips. *Journal of Food Engineering*, 79, 989–997.
- Rosen, J. & Hellenäs, K.E. (2002). Analysis in acrylamide in cooked foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analyst*, 127, 880-882.
- Ruiz de Galarreta, JI. y Ortiz, A. (2008). Procedimiento específico de azúcares reductores. NeikerTecnalia. 4pags
<http://www.neiker.net/neiker/papata/documentos/Procedimientos/NEIKER/DETERMINACION%20DE%20AZUCARES%20REDUCTORES.pdf>
- Rydberg, P., S. Eriksson, E. Tareke et al. (2003). Investigations of factors that influence the acrylamide content of heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 7012–7018.
- Stadler, R.H. & Scholz, G. (2004). Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanisms of formation, and potential strategies of control. *Nutrition Reviews*, 62, 449–467
- Valenzuela R., Ronco A.M. (2007). Acrilamida en los alimentos. *Revista Chilena de los Alimentos*, Vol. 34, N°1, Marzo 2007
- Yaylayan, V.A., Winorowski, A. & Perez Locas, C. (2003). Why asparagine needs carbohydrates to generate acrylamide. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1753-1757.
- Zeng X., Ka-Wing Cheng, K. W., Jiang, Y., Lin Z. X., Shi J. J., Oud, S., Chen, F. & Wang. M. (2009). Inhibition of acrylamide formation by vitamins in model reactions and fried potato strips. *Food Chemistry Journal*, 116, 34-39.
- Zubeldia Lauzurica, L. y Gomar Fayos, J. (2007). Acrilamida en patatas fritas y productos de aperitivo elaborados en la Comunidad Valenciana. *Gaceta Sanitaria* 2007;21(4):334-7.