

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## *EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ACRILAMIDA DURANTE EL PROCESO DIGESTIVO DE DISTINTOS ALIMENTOS*

TRABAJO FIN DE MÁSTER UNIVERSITARIO EN CIENCIA E  
INGENIERÍA DE LOS ALIMENTOS

ALUMNA: Isabel Romero Sánchez

TUTORA ACADÉMICA: Ana M<sup>a</sup> Andrés Grau

COTUTORA: Ana Heredia Gutiérrez

DIRECTORA EXPERIMENTAL: Mariola Sansano Tomás

*Curso Académico: 2015/2016*

VALENCIA, 1 de julio de 2016

# EVOLUCIÓN DEL CONTENIDO EN ACRILAMIDA DURANTE EL PROCESO DIGESTIVO DE DISTINTOS ALIMENTOS

Isabel Romero Sánchez, Mariola Sansano Tomás, Ana Belén Heredia Gutiérrez<sup>1</sup>, Ana M<sup>a</sup> Andrés Grau<sup>1</sup>

## RESUMEN

La acrilamida es un compuesto potencialmente cancerígeno, con carácter neurotóxico y genotóxico. Está presente en un gran número de alimentos, especialmente en aquellos de origen vegetal que han sido sometidos a procesos de fritura u horneado. Existen varios estudios acerca de cómo se distribuye, metaboliza y excreta. Sin embargo, los cambios experimentados por este compuesto durante el proceso digestivo no han sido ampliamente investigados. El objetivo de este trabajo fue estudiar la variación del contenido de acrilamida después de la digestión gástrica en diferentes alimentos, así como la cinética de variación del contenido en acrilamida durante la digestión gastro-intestinal en patatas fritas tipo *French fries*. Los resultados mostraron que la digestión gástrica puede alterar considerablemente el contenido en acrilamida dependiendo del alimento. En algunas matrices alimentarias tales como patatas tipo *Chips*, *French fries* y *nuggets* se observó un aumento en el contenido de acrilamida en esta etapa, mientras que en el café soluble, aros de cebolla, galletas dulces y saladas y cereales de desayuno este incremento se observó en el inicio de la fase gástrica como consecuencia de la bajada de pH. Estos resultados indican la influencia del pH ácido en los cambios que se producen. En cuanto al estudio cinético realizado en patatas fritas, durante la simulación del proceso gastro-intestinal mostró un incremento significativo al final de la fase gástrica del 44±6 % del contenido en acrilamida. Posteriormente, durante la fase duodenal se observó un descenso del contenido de acrilamida, hasta valores similares al contenido inicial presente en el alimento.

**PALABRAS CLAVE:** acrilamida, digestión gástrica, digestión duodenal, cinéticas

## RESUM

L'acrilamida és un compost potencialment cancerigen, amb caràcter neurotòxic i genotòxic. Està present en un gran nombre d'aliments, especialment en aquells d'origen vegetal que han sigut sotmesos a processos de fregit-el·la o enforat. Hi ha diversos estudis en quant a com es

---

<sup>1</sup> Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para el Desarrollo (IUIAD-UPV).  
Universidad Politécnica de Valencia Camino de Vera s/n, 46022, Valencia, España

distribuïx, metabolitza i excreta. No obstant això, els canvis experimentats per aquest compost durant el procés digestiu no han sigut àmpliament investigats. L'objectiu d'aquest treball va ser estudiar la variació del contingut d'acrilamida després de la digestió gàstrica en diferents aliments, així com la cinètica de variació del contingut en acrilamida durant la digestió gastrointestinal en creïlles fregides tipus *French fries*. Els resultats van mostrar que la digestió gàstrica pot alterar considerablement el contingut en acrilamida depenent de l'aliment. En algunes matrius alimentàries com ara creïlles tipus *Chips*, *French fries* i *nuggets* es va observar un augment en el contingut d'acrilamida en aquesta etapa, mentres que en el café soluble, anelles de ceba, galetes dolces i salades i cereals de desdijuni este increment es va observar en l'inici de la fase gàstrica com a conseqüència de la baixada de pH. Aquests resultats indiquen la influència del pH àcid en els canvis que es produïxen. En quant a l'estudi cinètic realitzat en creïlles fregides, durant la simulació del procés gastrointestinal va mostrar un increment significatiu a la fi de la fase gàstrica del  $44 \pm 6$  % del contingut en acrilamida. Posteriorment, durant la fase duodenal es va observar un descens del contingut d'acrilamida, fins valors semblants al contingut inicial present en l'aliment.

PARAULES CLAU: acrilamida, digestió gàstrica, digestió duodenal, cinètiques

## ABSTRACT

Acrylamide is a potentially carcinogenic compound with neurotoxic and genotoxic character. It is present in many foods, especially those of vegetable origin which have been subjected to processes such as frying or baking. There are several studies related to how it is distributed, metabolized and excreted. However, the changes in this compound during the digestive process have not been extensively investigated. The aim of this work was to study the variation of the content of acrylamide after gastric digestion in different foods, as well as the kinetics of acrylamide content variation during gastrointestinal digestion of French fries. The results showed that gastric digestion can greatly alters Acrylamide depending on the food. In some food matrices such as potatoes type *Chips*, *French fries* and *nuggets* increased acrylamide content at this stage was observed, while in soluble coffee, onion rings, cookies, crackers and breakfast cereals this increase was observed at the start of the gastric phase as a result of the lowered pH. These results indicate the influence of acid pH changes that occur. As for the kinetic study chips, gastro-intestinal during the process simulation showed significant end of the gastric phase of  $44 \pm 6$  % acrylamide content increases. During the duodenal phase a decrease of the acrylamide content was observed, obtaining in the end, similar values to this initial content in the food.

KEY WORDS: acrylamide, gastric digestion, duodenal digestion, kinetics

## INTRODUCCIÓN

En 2010, el Comité de Expertos en Aditivos Alimentarios de la OMS/FAO concluye que la presencia de acrilamida en ciertos grupos de alimentos y su presencia en el organismos a través de la ingesta de estos alimentos representa "un problema para la salud humana" (Recommendations & Nutrition, 2013). A raíz de esta conclusión, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) clasifica a la acrilamida en el Grupo 2A como "probablemente cancerígeno para los seres humanos" (IARC, 1994; Lineback, Coughlin, & Stadler, 2012) y es considerada sustancia tóxica con carácter neurotóxico, genotóxico y que puede afectar al sistema reproductivo (Friedman, 2003). Asimismo, la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria publica, en 2015, el primer diagnóstico completo sobre los riesgos derivados de la presencia de acrilamida en la dieta, confirmando un incremento en la probabilidad de desarrollar ciertos tipos de cáncer en consumidores habituales de productos procesados ricos en acrilamida (EFSA, 2015). Como consecuencia de todas las acciones citadas, la asociación *FoodDrinkEurope* elabora la "Caja de herramientas de la acrilamida" (del inglés *Acrylamide Toolbox*), documento en constante actualización que proporciona información adaptada a la industria alimentaria para implantar medidas de control y reducción de acrilamida agrupando dichas medidas según el tipo de producto. Así pues, existen medidas dirigidas a disminuir la presencia de acrilamida en snacks a base de patata, patatas fritas (*French fries* y *Chips*), productos a base de cereales, café y sucedáneo y alimentos de consumo infantil (FoodDrink Europe, 2013). La legislación europea actual recomienda no sobrepasar unos límites máximos de acrilamida en diferentes alimentos de riesgo, aunque no existen valores de acrilamida exigibles (Recomendación 2013/647/UE, de la Comisión).

La acrilamida es un compuesto hidrosoluble y de bajo peso molecular (71g/ mol) que no se encuentra de forma nativa en los alimentos sino que se forma durante el procesado como producto intermedio de las reacciones de Maillard, principalmente a través de la reacción entre el aminoácido asparagina y los azúcares reductores (glucosa y fructosa). Los principales procesos de transformación en los que se puede generar acrilamida son la fritura y horneado dado que se requieren de temperaturas por encima de 120 °C, además de la presencia de los precursores de la reacción (asparagina y azúcares reductores) (European Food Safety Authority, 2010; Matthäus, Haase, & Vosmann, 2004; Tareke, Rydberg, Karlsson, Eriksson, & Törnqvist, 2002). Por ello, la formación de acrilamida se produce principalmente en alimentos vegetales ricos en glúcidos, y particularmente en productos de patata por tratarse de una matriz con elevado contenido en asparagina, alimentos a base de granos de cereales tales como productos de panadería, cereales de desayuno y café.

Existen numerosos estudios sobre su distribución, metabolismo y excreción, en animales de experimentación y humanos. Los estudios de distribución de acrilamida han demostrado que se distribuye rápidamente a todos los tejidos sin evidencias de acumulación, e incluso se puede encontrar en fetos de animales gestantes y en la leche materna. Se

metaboliza principalmente a través de la acción del citocromo P450 2E1 que cataliza la formación de un metabolito epóxido reactivo llamado glicidamida, la cual es responsable de sus efectos genotóxicos (Lineback et al., 2012). Sin embargo, se ha investigado en menor medida los cambios experimentados por este compuesto durante el proceso digestivo, y en consecuencia cuánto puede ser susceptible de absorberse, atravesar la barrera intestinal y llegar al torrente sanguíneo. Como cualquier contaminante, la cantidad total presente en los alimentos ingeridos no siempre refleja la cantidad bioaccesible para el organismo. Tras la ingesta de cualquier producto alimenticio, se puede producir una alteración de su estructura y composición química condicionada por múltiples factores mecánicos y fisicoquímicos, como la masticación, la dilución, la variación del pH y la acción de las diferentes enzimas presentes en la boca, el estómago y el intestino, entre otros. De esta forma, los macro y micronutrientes, así como posibles contaminantes, se liberan paulatinamente y atraviesan la pared intestinal hasta llegar al torrente sanguíneo. El efecto de las diferentes etapas digestivas sobre los compuestos presentes en los alimentos varía de forma notable entre individuos. De ahí, que lo ideal sea llevar a cabo estudios *in vivo*. Sin embargo, los estudios *in vivo* son invasivos, el diseño experimental es crucial y presentan restricciones éticas y financieras. En base a estas limitaciones, los modelos *in vitro* se presentan como una alternativa científicamente validada para analizar la influencia de la digestión sobre diferentes compuestos. Algunas de las ventajas que ofrecen los modelos *in vitro* son la rápida obtención de resultados, el menor coste, la ausencia de restricciones éticas, así como la reproducibilidad, selección de condiciones controladas o el facilitar la toma de muestras a diferentes tiempos del proceso (Minekus et al., 2014).

Tras la ingesta de un alimento con acrilamida, se desconocen las posibles interacciones químicas con otros componentes que pueden tener lugar durante el proceso de digestión. Hamzalıoğlu y Gökmen, (2015) investigaron la evolución del contenido en acrilamida tras la digestión de galletas dulces y saladas y patatas fritas *French fries* y *Chips*, siendo este el único estudio a este respecto. Estos autores observaron un incremento importante del contenido de acrilamida en patatas fritas tras la etapa gástrica, fenómeno que no ocurrió en otras matrices. Estos resultados reflejan la necesidad de realizar este estudio también en otros alimentos de riesgo, dado que los cambios durante el proceso digestivo experimentados por la acrilamida parecen ser muy dependientes de la naturaleza de la matriz alimento y tipo de procesado. En este contexto, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar la variación en el contenido de acrilamida tras la digestión gástrica en diferentes matrices recogidas en la “Toolbox: Caja de Herramientas de Acrilamida”, así como las cinéticas de formación/reducción de acrilamida durante la fase gástrica y duodenal en patatas fritas tipo *French fries*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Materia prima

Se han seleccionado para el estudio un total de nueve matrices representativas de los distintos grupos alimentarios de riesgo en cuanto a la presencia de acrilamida se refiere (Toolbox: Caja de Herramientas de Acrilamida). Concretamente se trata de: patatas fritas tipo *French Fries*, *nuggets* de pollo y aros de cebolla fritos adquiridos en un establecimiento de comida rápida, patatas fritas tipo *Chips*, cereales de desayuno (de arroz, trigo y cebada), galletas dulces tipo María, galletas saladas tipo “crackers”, café soluble y sustituto de café a base de cereales. En todos los casos, excepto en el café y sustituto de café, se realizó una selección visual descartando aquellas muestras excesivamente pardeadas dado la relación directa entre el grado de pardeamiento no enzimático y el contenido de acrilamida.

### Metodología experimental

#### REACTIVOS Y SOLUCIONES ESTÁNDAR

El cloruro de potasio, cloruro de sodio, cloruro de magnesio, hexano y metanol fueron de Panreac (Barcelona, España). El bicarbonato de amonio, dihidrógeno fosfato de potasio, pepsina de origen porcino (3200-4500 U/mg), pancreatina (8 x USP) a partir de páncreas porcino y el extracto de bilis bovina, se adquirieron de Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Alemania). El estándar de acrilamida ( $\geq 99\%$ ) se obtuvo en Merck (Darmstadt, Alemania) y la metacrilamida de Dr. Ehrenstorfer GmbH (Augsburg, Alemania). El hidrógeno carbonato de sodio se adquirió en Scharlau (Barcelona, España). El acetonitrilo, ácido fórmico (pureza de 99-100%) y sulfato de magnesio fueron adquiridos en VWR (Fontenay-sous-Bois, Francia). El PSA (Primary Secondary Amine) se obtuvo en Supelco (Bellefonte, PA). El agua bidestilada se preparó para su uso cromatográfico (Milli-Q, Millipore Corp., Bedford, MA). Se prepararon diariamente disoluciones de metacrilamida y acrilamida (ambas de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) a partir de disoluciones stock de 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en acetonitrilo de cada uno de los compuestos. Todas ellas fueron almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Todos los disolventes utilizados para la determinación de acrilamida fueron de grado HPLC y el resto de grado analítico.

#### SIMULACIÓN DE LA DIGESTIÓN IN VITRO GASTROINTESTINAL

Se siguió el protocolo consensuado a nivel internacional y publicado por Minekus et al., (2014) para simular el proceso digestivo (fases oral, gástrica y duodenal) a escala de laboratorio (*in vitro*) con ligeras modificaciones. Para ello, se prepararon el fluido salival simulado (FSS), el fluido gástrico simulado (FGS) y el fluido duodenal simulado (FDS) diariamente a partir de disoluciones stock preparadas semanalmente. Las composiciones electrolíticas de las disoluciones stock y de los fluidos simulados fueron exactamente las recogidas en Minekus et al., (2014). Dicha información se

recoge también en el Anexo. A la mezcla electrolítica de la FGS se le adicionó pepsina (4000 U/g) y al FDS, pancreatina (252 FCC/g muestra) y sales biliares (10 mM).

#### *Análisis de la influencia de la digestión gástrica sobre el contenido de acrilamida en las matrices de estudio*

Para evaluar el efecto de la digestión gástrica sobre el contenido en acrilamida en las matrices de estudio se simuló las fases oral y gástrica. Para ello, se tomaron 5 g del alimento y se transfirieron a un tubo Falcon, se adicionaron 5 mL de FSS correspondiendo a una relación alimento: FSS de 1:1 (p/v), se trituró con ayuda de una batidora (Ufesa, 600 W, Eslovenia) la mezcla para simular la masticación y se mezcló durante 5 minutos para simular la fase oral. A continuación, se adicionaron 10 mL de FGS (20000 U de pepsina) correspondiendo a una relación digerido oral: FGS de 1:1 (v/v) y se ajustó el pH hasta 3 con HCl 1 M y la ayuda de un pH-metro (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza). Posteriormente, la mezcla se introdujo en una cámara termostataada (Selecta, España) a 37 °C y acoplada a un agitador (Intelli-Mixer RM 2, Elmi Ltd., Países Bálticos y Rusia) a una velocidad de 55 rpm y con movimientos circulares en dirección de las agujas del reloj. La duración total de esta fase fue de 120 min, si bien cada 30 min se midió y reajustó el pH a 3. Transcurrido este tiempo, se procedió a detener la reacción enzimática sumergiendo los tubos en agua fría y congelando las muestras a -40 °C en un congelador (modelo CVN-40/105, Matex, Barcelona) para su posterior liofilización (-40 °C y 1.25 mbar, Telstar, Terrassa, España). Se realizó toma de muestras al inicio (30 s después de haber adicionado el FGS) y final de la fase gástrica. Las muestras fueron siempre tubos independientes.

#### *Estudio cinético de cambio del contenido de acrilamida durante la digestión gastrointestinal de patatas fritas tipo French fries*

Concretamente se estudió la evolución del contenido en acrilamida a lo largo de la digestión gástrica (0, 15, 30, 60 y 120 min) y duodenal (15, 30, 60 y 120 min) de patatas fritas *French fries*. Se eligió esta matriz en base a los resultados obtenidos (presentados y discutidos más adelante) del estudio en fase gástrica.

Para llevar a cabo la simulación de las fases oral y gástrica, se procedió como el apartado anterior, con la diferencia de que se paró la reacción enzimática de la fase gástrica a cada uno de los tiempos indicados (un tubo por tiempo). Para simular la fase duodenal, se adicionó FDS (20 mL) en una relación digerido gástrico: FDS de 1:1 (v/v) y se ajustó el pH a 7 con NaOH 1M, transcurridas las dos horas de fase gástrica. La concentración de sales biliares fue de 10 mM y la de pancreatina de 1260U en cada tubo. Se detuvo la reacción enzimática a cada tiempo indicado de toma de muestras de la fase duodenal (un tubo por tiempo) en agua fría y se congelaron las muestras a -40 °C y se liofilizaron en los mismos equipos y condiciones indicadas en el apartado anterior.

Se llevaron a cabo una digestión in vitro para cada matriz de estudio con triplicados (tres tubos independientes) a cada tiempo.

## Determinaciones analíticas

### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN HUMEDAD

El contenido en humedad se analizó en todas las matrices: patatas *Chips*, café soluble, sucedáneo de café, galletas dulces y saladas, cereales de desayuno, aros de cebolla, *nuggets* y patatas fritas tipo *French fries*. Se determinó mediante secado al vacío a 60 °C hasta peso constante (AOAC, 1980).

### DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN ACRILAMIDA

La extracción y determinación del contenido en acrilamida se realizó mediante un método validado por Sansano, Juan-Borrás, Escriche, Andrés, & Heredia, (2015) con ligeras modificaciones. Uno de los principales cambios fue la introducción de patrón interno (metacrilamida) para la cuantificación. Este método emplea la extracción en fase sólida dispersiva llamado QuEChERS que consiste en dos fases, la primera de ellas dispersiva, cuya composición es 4 g de MgSO<sub>4</sub> y 0.5 g de NaCl (Quechers 1) y la segunda consiste en una fase de limpieza y purificación de la muestra: 50 mg de PSA y 150 mg de MgSO<sub>4</sub>.

#### *Extracción de acrilamida*

La extracción de acrilamida fue diferente en las matrices alimento sin digerir y digeridas. En el caso de las muestras sin digerir, se tomaron 1 g de patatas fritas *French fries*, patatas fritas *Chips*, café soluble y sustituto de café, y 2 g de *nuggets* de pollo, aros de cebolla, cereales de desayuno, galletas tipo María y galletas tipo crackers y se introdujeron en un tubo falcon para proseguir con la extracción. En el caso de las muestras digeridas, se realizó la extracción sobre 1 g de liofilizado. La extracción consistió en la adición de 0.5 mL de patrón interno (1µg/L) metacrilamida en acetonitrilo) y de 5 mL de n-hexano a la muestra y de la agitación del conjunto en un vórtex (Heidolph, Alemania) durante 30 segundos. Este reactivo tiene como objetivo eliminar la grasa contenida en la muestra. Posteriormente, se añadieron 10 mL de agua bidestilada, 10 mL de acetonitrilo y el contenido de sales del QuEChERS 1. Se agitó la mezcla en el vórtex durante 1 min y se centrifugó a 3500 rpm durante 5 min. Se tomó una alícuota de 1 mL de la fase de acetonitrilo en la cual queda retenida la acrilamida y se introdujo en un eppendorf de 2 mL el cual contenía las sales correspondientes al QuEChERS 2 y se agitó durante 30 segundos en el vórtex. Finalmente, se centrifugó a 5000 rpm durante 1 min y el sobrenadante 500 µL se filtró (0.45 µm) y se transfirió a un vial para su análisis por HPLC/MS/MS.

#### *Análisis HPLC/MS-MS*

El análisis del contenido en acrilamida se realizó utilizando un cromatógrafo 1200 Series (Agilent Technologies, Inc., CA; USA) unido a un espectrómetro de masas 6410 TripleQuad LC/MS de Agilent (Agilent Technologies Inc., CA; EEUU), con fuente de ionización tipo Electrospray, en modo positivo. La columna empleada fue una Zorbax Eclipse XDB C-18 (2.1

mmx50 mm, 1.8  $\mu$ m). 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 0.2 mL/minuto, y un volumen de inyección de 10  $\mu$ L. Las condiciones usadas en la fuente de ionización fueron: T<sup>a</sup> del gas de secado (N<sub>2</sub>) de 350 °C a 12 L/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) (Sansano et al., 2015) y para el patrón interno m/z 75.0- >58.2. Para la cuantificación se elaboró una curva a partir del método de patrón interno (con metacrilamida) a diferentes concentraciones de acrilamida (10, 50, 100 ng/mL (ppb)).

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La influencia de la etapa gástrica (al inicio y final) sobre el contenido de acrilamida en los alimentos de estudio se analizó mediante un ANOVA simple. De la misma forma, el efecto del tiempo de digestión gástrica y duodenal sobre el contenido en acrilamida en patatas fritas tipo *French fries*, se evaluó mediante un análisis simple de varianza utilizando el programa de análisis estadístico Statgraphics Centurion, con un nivel de confianza del 95% (p-valor  $\leq$  0.05).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización de las matrices alimentarias estudiadas

La Tabla 1 recoge los valores del contenido de humedad (%) y de acrilamida ( $\mu$ g/Kg alimento) de las diferentes muestras analizadas.

**TABLA 1.** Contenido medio en humedad (%) y acrilamida ( $\mu$ g/Kg alimento) y desviaciones de las matrices alimento de estudio (n=3).

<b>Matriz alimentaria</b>	<b>Humedad (%)</b>	<b>Acrilamida (<math>\mu</math>g/Kg)</b>
Patatas fritas <i>Chips</i>	1.04 $\pm$ 0.02 <sup>ab</sup>	237 $\pm$ 9 <sup>d</sup>
Café soluble	2.69 $\pm$ 0.07 <sup>bc</sup>	417 $\pm$ 51 <sup>f</sup>
Sucedáneo de café	2.72 $\pm$ 0.06 <sup>bc</sup>	340 $\pm$ 20 <sup>e</sup>
Galletas María	0.2 $\pm$ 0.02 <sup>a</sup>	30 $\pm$ 8 <sup>a</sup>
Galletas Saladas	0.2 $\pm$ 0.03 <sup>a</sup>	89 $\pm$ 7 <sup>bc</sup>
Cereales de desayuno	3.2 $\pm$ 0.3 <sup>c</sup>	131 $\pm$ 3 <sup>c</sup>
Aros de cebolla	40 $\pm$ 3 <sup>d</sup>	46 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>
<i>Nuggets</i>	51 $\pm$ 1 <sup>g</sup>	55 $\pm$ 2 <sup>ab</sup>
P. fritas <i>French fries</i> *	43.7 $\pm$ 0.9 <sup>e</sup>	206 $\pm$ 12 <sup>d</sup>
P. fritas <i>French fries</i> **	48 $\pm$ 1 <sup>f</sup>	298 $\pm$ 19 <sup>e</sup>

Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas entre grupos homogéneos. P.fritas *French fries*\*, muestra utilizada en el primer estudio (simulación de la fase gástrica) y P. fritas *French fries*\*\* , muestra utilizada para el estudio de las cinéticas (fase gástrica y/o intestinal).

Como se puede observar en la Tabla 1 existen valores de acrilamida iniciales para cada alimento muy dispares, presentando el café y sucedáneo de café los valores más altos seguidos de las patatas, cereales de desayuno, aros de cebolla, *nuggets*, galletas saladas y galletas maría. Estas diferencias entre alimentos se deben fundamentalmente a su composición y al procesado térmico al que son sometidos.

La acrilamida se genera principalmente en productos a base de patata, ya que ésta presenta en su composición un contenido alto de los precursores de su formación, asparagina y azúcares reductores, comparado con otros productos vegetales (Kumar, Singh, & Kumar, 2004). Las diferencias entre las tres muestras analizadas (*Chips*, y las dos muestras de *French fries*) son debidas a diferentes factores que pueden englobarse principalmente en dos, el agronómico y el procesado. En cuanto al primer factor, la variedad de patatas resulta fundamental, así como, dentro de una misma variedad, el contenido en precursores (asparagina y azúcares reductores), que varía desde la recolección hasta su procesado, debiendo tener en cuenta las condiciones de almacenamiento óptimas para no incrementar el contenido en azúcares reductores (Ahrné, Andersson, Floberg, Rosén, & Lingnert, 2007; Bråthen & Knutsen, 2005). Las patatas tipo *Chips*, presentan una geometría característica (láminas de 1mm de espesor), por lo que la gran superficie de contacto con el aceite caliente durante la fritura favorece una rápida evaporación del agua y desarrollo de la textura crujiente, resultando un producto con muy bajo contenido en humedad (<2%) (Gökmen & Palazoglu, 2009). Las patatas de tipo *French fries* que encontramos en los restaurantes de comida rápida presentan una geometría diferente, en forma de bastones, con una relación superficie: masa muy inferior a la de las tipo *Chips*. Este hecho unido a la aplicación de pretratamientos de escaldado y/o inmersión en disoluciones de sal, justifica el menor contenido en acrilamida de este tipo de patatas frente a las tipo *Chips* (Singh & Kaur, 2016).

Si bien el café soluble y el sucedáneo de café presentan un contenido elevado de acrilamida, la cantidad que se consume finalmente es reducida, ya que se reconstituye con agua (o leche) en una relación de 1- 2 g/ 100mL. Estos elevados niveles observados en el café, están probablemente relacionados con la temperatura a la que se lleva a cabo el tostado (220 a 250 °C) y con la baja humedad final a la que se lleva el producto. Además de las condiciones de tostado, son numerosos los factores que condicionan la formación de acrilamida en este producto: la variedad de café (con diferentes contenidos en asparagina y azúcares reductores), los tratamientos postcosecha (lavado, secado, fermentación de los granos), y las posteriores condiciones de almacenamiento (Goodman & Yeretian, 2014). Adicionalmente al tostado, el café soluble y el sucedáneo de café se obtienen mediante procesos de extracción y deshidratación; de ahí que los resultados obtenidos concuerden con los obtenidos por la EFSA (EFSA,

2015), que indican que el café soluble y el sucedáneo de café presentan valores superiores de acrilamida que el café molido. El sucedáneo de café, elaborado a base de cereales y achicoria, los valores superiores del contenido en acrilamida se atribuyen a los niveles de asparagina presentes en las raíces de achicoria (40-230mg/Kg) (FoodDrink Europe, 2013) y a los niveles de nitrógeno aplicados durante la fertilización afectan ya que éstos afectan a la cantidad libre de asparagina (Gökmen & Anese, 2016).

En el caso de los alimentos rebozados, *nuggets* y aros de cebolla, se obtuvieron contenidos medio-bajos de acrilamida y similares entre sí, debido probablemente a que la acrilamida se forma en el rebozado de estos productos (de similar composición). Asimismo, cabe resaltar que el nivel medio-bajo de acrilamida en estos productos está relacionado con la proporción que representa el rebozado con respecto al producto final, que puede oscilar entre el 20-50 % dependiendo del producto.

Finalmente y en otro grupo, encontramos los productos de panadería cuya base composicional son cereales están sujetos a procesos de horneado (elevadas temperaturas y tiempos largos), condiciones que favorecen la formación de acrilamida. En este tipo de alimentos influyen además otros factores como por ejemplo: la actividad de agua, el pH y las condiciones tecnológicas durante el horneado (Gökmen, Mesias, & Morales, 2016). Los cereales y las galletas (dulces y saladas) analizadas en el contexto de este trabajo, presentaron un nivel de acrilamida similar a los alimentos rebozados. Ambos grupos de alimentos tienen en común que el principal ingrediente de su composición, harina principalmente de trigo, aporta cantidades significativas de asparagina.

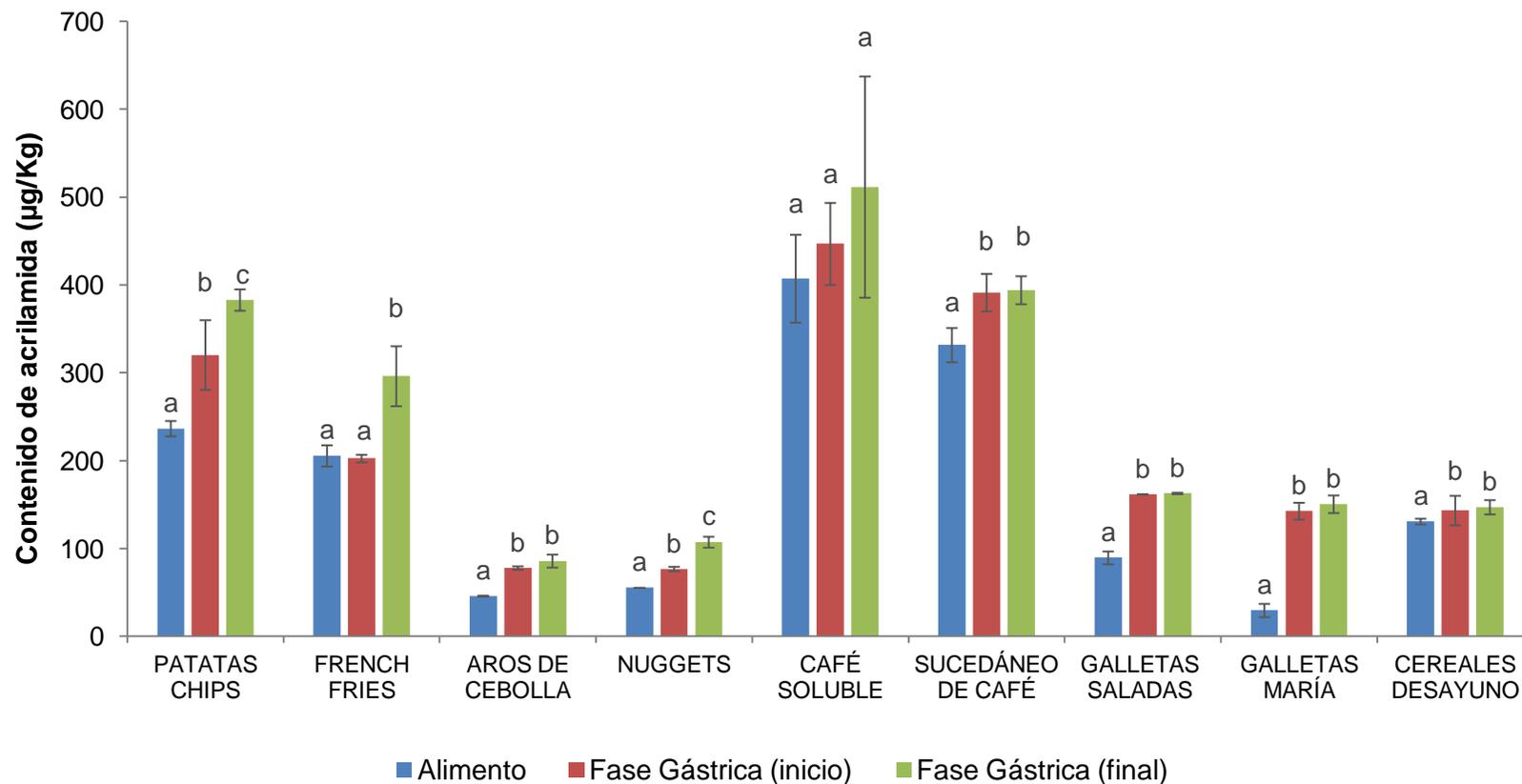
### **Cambios en el contenido de acrilamida en diferentes alimentos tras el proceso de digestión gástrica**

En la Figura 1 se ha representado el contenido de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ ) en el alimento sin digerir y al inicio y final de la fase gástrica para los distintos alimentos analizados. Se puede observar cómo el contenido en acrilamida presentó un aumento significativo tras la fase gástrica a excepción del café soluble. Además, ciertas matrices presentaron el aumento del contenido en acrilamida en el inicio de la fase gástrica, mientras que otras aumentaron el contenido tras los 120 minutos de fase gástrica. Puesto que se trata de matrices muy diferentes en cuanto a composición y al tipo de procesado al que se someten, éstas se analizaron por grupos.

Los productos derivados de la patata, las patatas fritas tipo *Chips* y *French fries*, presentaron un comportamiento distinto entre sí. Las *Chips* mostraron un incremento en el inicio de la fase gástrica y tras los 120 minutos de digestión gástrica del  $34\pm 17$  y  $62\pm 5$  %, respectivamente. En cambio, las *French fries*, no aumentaron la formación de acrilamida en el inicio pero si tras la fase gástrica. Esta diferencia puede deberse a varios factores, principalmente a la variedad de patata empleada, y a la fritura, ya que presentan una geometría distinta que determina el acondicionamiento de la materia prima y el tiempo de fritura al que se deben someter, como se comentó en el apartado anterior.

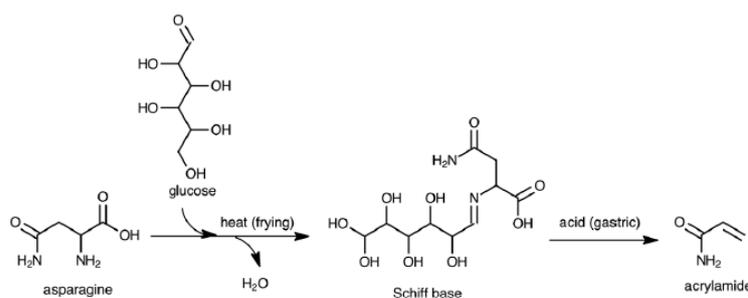
Los *nuggets* y aros de cebolla aumentaron el contenido de acrilamida en el inicio de la fase gástrica. Sin embargo, sólo las patatas (*Chips* y *French fries*) y los *nuggets* mostraron un incremento significativo del contenido en acrilamida desde el inicio hasta el final de la fase gástrica.

En cuanto a los productos procesados mediante otros tratamientos como el tostado (café soluble y sucedáneo de café), horneado (galletas dulces y saldas) y extrusionado (cereales), se observó cómo se incrementó de forma significativa el contenido en acrilamida, del alimento al inicio de la fase gástrica pero no al final de esta etapa. El café soluble experimentó un incremento entre el inicio y final de la fase gástrica, aunque no significativo debido a la gran desviación entre las réplicas. Este aumento podría deberse a que durante la digestión gástrica se rompen las uniones formadas entre las melanoidinas y acrilamida durante el procesado del café. Pastoriza, Rufián-Henares, & Morales, (2012) propusieron el mecanismo de reacción de los grupos amino nucleófilos de aminoácidos de la cadena principal proteica de las melanoidinas con la acrilamida, a través de la denominada reacción de adición de Michael.



**FIGURA 1.** Contenido de acrilamida ( $\mu\text{g}/\text{kg}$  de alimento) en las matrices alimentarias, antes de la digestión, al inicio y al final de la fase gástrica. Letras diferentes indican, para cada alimento, diferencias estadísticamente significativas en el contenido de acrilamida antes de la digestión y al inicio y final de la fase gástrica.

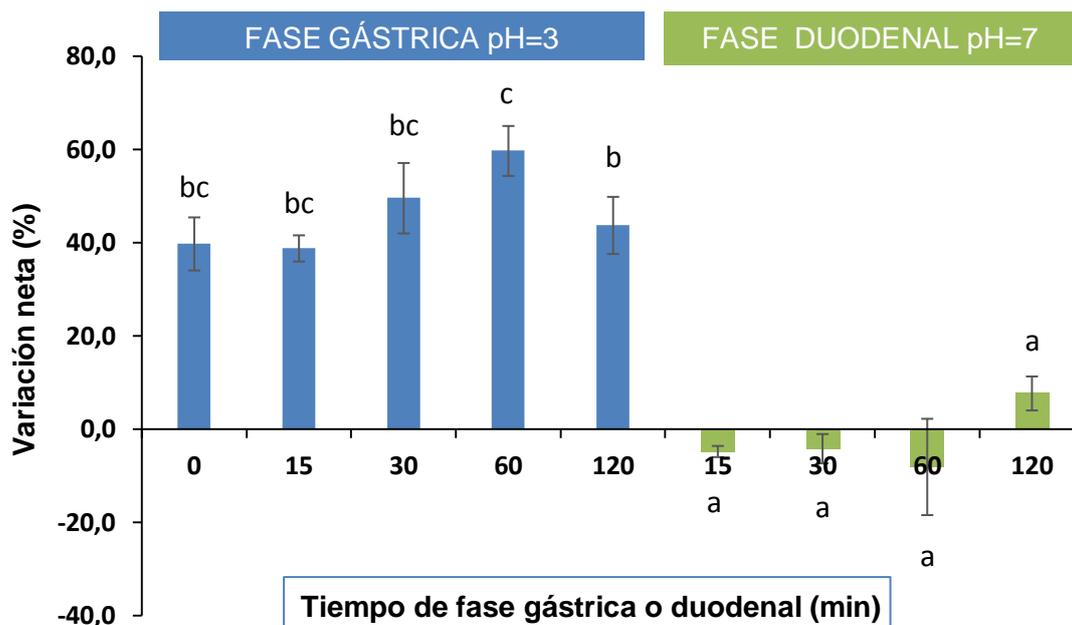
El aumento del contenido en acrilamida tras la fase gástrica puede ser debido a una influencia de los diferentes parámetros del proceso de digestión gástrica como el pH ácido del estómago, el efecto del tiempo y/o la acción de la pepsina que podrían favorecer la liberación de acrilamida en estos alimentos. Hamzalıođlu y Gökmen, (2015) analizaron la variación del contenido de acrilamida tras las fases gástrica y duodenal en matrices similares (patatas fritas tipo *French fries*, patatas *Chips*, galletas dulces y galletas saladas). El efecto de la digestión sobre este compuesto fue claramente dependiente del tipo de alimento. El contenido de acrilamida en las patatas fritas *French fries* y *Chips* se incrementó tras la fase gástrica. Los autores propusieron un mecanismo que está relacionado con la presencia de compuestos intermedios de las reacciones de Maillard (Base de Schiff) en el alimento, que a causa del pH ácido del estómago, favorecen la liberación de acrilamida. Esto sugiere que productos intermedios formados a partir de la reacción entre la asparagina y los azúcares reductores durante el tratamiento térmico, sean precursores potenciales de la acrilamida en las condiciones gástricas (Figura 2). En los alimentos estudiados se observó que la liberación de acrilamida se producía en unas matrices rápidamente (al inicio de la fase gástrica) y en otras más lentamente (patatas tipo *chips*, *French fries* y *nuggets*).



**FIGURA 2.** Propuesta del mecanismo de formación de acrilamida durante la digestión gástrica *in vitro* a partir de los precursores: asparagina y glucosa (Hamzalıođlu & Gökmen, 2015)

### **Cinética de cambio de concentración de acrilamida en patatas fritas durante las etapas de digestión gástrica y duodenal**

En la Figura 3 se ha representado la variación neta del contenido de acrilamida (%) en patatas fritas antes de su ingesta y a distintos tiempos de la digestión gástrica y duodenal. El contenido de acrilamida (ppb, en base húmeda) correspondiente a cada tiempo y fase digestiva se muestra en la Tabla 2.



**FIGURA 3.** Variaciones netas del contenido de acrilamida (%) durante la fase gástrica y duodenal en patatas fritas. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas en el contenido de acrilamida a lo largo de la digestión gástrica y duodenal.

**TABLA 2.** Contenido de acrilamida (ppb) en patatas fritas sometidas a distintos tiempos de digestión gástrica y duodenal

	Tiempo (min)	Contenido acrilamida y SD (ppb en b.h.)
Alimento	-	298 ± 19
Fase gástrica	0	386 ± 16
	15	383 ± 7
	30	413 ± 21
	60	441 ± 15
	120	397 ± 17
Fase duodenal	15	263 ± 9
	30	265 ± 29
	60	254 ± 10
	120	297 ± 10

En la Figura 3, las barras de color azul y verde corresponden a las variaciones netas de acrilamida a distintos tiempos de digestión gástrica y duodenal, respectivamente. Durante la digestión gástrica se observa un aumento del contenido de acrilamida si bien no se observan diferencias significativas a los distintos tiempos. Estos resultados ponen de manifiesto que los cambios relacionados con el proceso de digestión gástrica se producen durante los primeros minutos. El cambio de pH que tiene lugar en esta etapa podría ser el factor responsable de los cambios observados. Además, el análisis de una muestra control (sin pepsina, en agitación, 120 minutos, a 37°C, a pH<3) mostró niveles de acrilamida similares a la muestra digerida durante el

mismo tiempo con pepsina, lo que confirma que es el pH el factor de los cambios en el contenido de acrilamida en esta fase. El estudio realizado por Hamzalıođlu y Gökmen (2015), donde estudiaban el contenido en acrilamida presente tras cada etapa gastrointestinal, publican un aumento del 295% tras la fase gástrica respecto al contenido inicial en las patatas fritas. El aumento observado en el presente estudio fue del 50 % al final de la fase gástrica, lo que podría estar relacionado con las diferencias del pH utilizados en la simulación de esta etapa de digestión (pH 3 en el presente trabajo, frente a pH 2 en Hamzalıođlu y Gökmen, 2015). Tras ver esta gran diferencia y para confirmar la influencia de esta variable de proceso, se llevaron a cabo digestiones gástricas a pH 2 y se analizó posteriormente el contenido en acrilamida. Si bien, no se observaron aumentos tan notables como el estudio de referencia, los incrementos en el contenido en acrilamida obtenidos en las nuevas condiciones fueron del 93.4, 176.4 y 101.5 % a tiempo 0, 60 y 120 minutos respectivamente, confirmando la influencia del pH.

Durante la simulación de la digestión duodenal, al contrario que en la fase gástrica, los niveles de acrilamida disminuyeron significativamente desde los primeros 15 minutos y se mantuvieron constantes hasta el final de esta fase. Esta reducción podría estar relacionada con la formación de aductos por la adición de Michael, un mecanismo utilizado en algunos trabajos como una estrategia potencial para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos (Hamzalıođlu & Gökmen, 2015; Hidalgo, Delgado, & Zamora, 2010; Zamora, Delgado, & Hidalgo, 2010). Durante el proceso de digestión gástrica, la pepsina provoca la liberación de aminoácidos, algunos de ellos, como la cisteína o la lisina, con carácter nucleofílico (grupos  $-SH$  y  $-NH_2$ ), capaces de interactuar con la acrilamida, formando aductos y provocando por tanto una reducción aparente de su biodisponibilidad.

Hamzalıođlu y Gökmen, (2015) llevaron a cabo un estudio de confirmación de este mecanismo, utilizando tres sistemas modelo: acrilamida, acrilamidalisina, y acrilamida-cisteína. Como resultado, obtuvieron una ligera reducción del contenido de acrilamida en los sistemas con lisina y cisteína después de simular una digestión gástrica. Posteriormente, en las fases duodenal y colónica se mantuvieron los niveles de acrilamida en el sistema con lisina, mientras que se observó una disminución en el sistema con cisteína. Los autores explican estos resultados en base a la estructura molecular de la cisteína, capaz de reaccionar con la acrilamida en dos puntos (o incluso con dos moléculas a la vez), ya que presenta además del grupo tiol ( $-SH$ ), un grupo amino libre ( $-NH_2$ ). En otros estudios, Hidalgo, Delgado, & Zamora, (2010) y Zamora, Delgado, & Hidalgo (2010) se reporta una rápida disminución del contenido en acrilamida después de un proceso de calentamiento en presencia de N-acetil-cisteína o lisina, como consecuencia de la adición de Michael, entre los grupos nucleófilos de estos aminoácidos ( $-SH$  y  $-NH_2$ ) y el doble enlace ( $C=C$ ) de acrilamida. Los resultados obtenidos en este trabajo son por tanto coherentes con los encontrados en la literatura, confirmando el efecto que tienen los aminoácidos procedentes de la actividad proteolítica de las enzimas en el tracto gastrointestinal sobre el contenido en acrilamida durante la digestión (Hamzalıođlu & Gökmen, 2015). Podría decirse que el mecanismo de formación de aductos durante la fase duodenal, constituye un proceso de compensación del incremento del contenido de acrilamida observado durante la

fase gástrica, de manera que el resultado neto es que al final de la digestión se obtienen valores de acrilamida similares a los de las patatas sin digerir.

## CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos se deduce que, dependiendo del tipo de matriz alimentaria, el proceso de digestión puede alterar significativamente la cantidad de acrilamida bioaccesible. En este trabajo se observó que la digestión gástrica incrementó significativamente los niveles de acrilamida respecto al alimento en todos los productos analizados a excepción del café soluble. Ciertos alimentos incrementaron la cantidad de acrilamida a los 120 minutos de la simulación de la digestión gástrica (patatas tipo *Chips*, French fries y *nuggets*). En cambio, el sucedáneo de café, los aros de cebolla, las galletas dulces y saladas y los cereales de desayuno incrementaron el contenido de acrilamida en el inicio de la fase gástrica y éste permaneció constante al final de esta etapa. Estos resultados revelan la gran influencia del pH ácido sobre la liberación de acrilamida durante la digestión gástrica.

El estudio de las cinéticas de formación/reducción de acrilamida durante las fases gástrica y duodenal de patatas fritas mostró un incremento significativo del contenido en acrilamida ( $44 \pm 6$  % a los 120 minutos), siendo máximo el aumento a los 60 minutos. Tras la fase gástrica y con el inicio de la fase duodenal se observó un descenso del contenido de acrilamida que se mantuvo en el mismo nivel hasta los 120 minutos, obteniendo valores similares al contenido inicial presente en el alimento.

En base a los resultados de este estudio, se considera de interés profundizar en este tema y poder conocer y explicar qué ocurre con la ingesta combinada de este tipo de alimentos con otros con los que se establecen interacciones y que por tanto pueden modificar el resultado final. Estos estudios deberían por tanto orientarse a desarrollar estrategias que permitan modular la cantidad de acrilamida bioaccesible para el organismo.

## 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. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.01.010>
- AOAC. (1980). *AOAC: Official Methods of Analysis, 1980* (Vol. 552).
- 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. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2004.08.030>
- EFSA. (2015). Scientific Opinion on acrylamide in food. *EFSA Journal*, 13(6), 4104 (321). <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2015.4104>
- Europea, C. (2013). Recomendación de la comisión. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 56(10), 56–57. <http://doi.org/10.2903/j.ef>
- European Food Safety Authority. (2010). Scientific Opinion on Arsenic in Food. *EFSA Journal*, 7(10), 1351. <http://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1351>.
- FoodDrink Europe. (2013). Acrylamide Toolbox, 1–58.
- Friedman, M. (2003). Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(16), 4504–4526. <http://doi.org/10.1021/jf030204+>

- Gökmen, V., & Anese, M. (2016). Chapter 9 – Acrylamide in Coffee and Coffee Substitutes. In *Acrylamide in Food* (pp. 181–195). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00009-7>
- Gökmen, V., Mesias, M., & Morales, F. J. (2016). Chapter 7 – Acrylamide in Bakery Products. In *Acrylamide in Food* (pp. 131–157). <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00007-3>
- 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(2), 172–176. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.01.011>
- Goodman, B. A., & Yeretizian, C. (2014). *Acrylamide in Coffee: Influence of Processing, Processing and Impact on Active Components in Food*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-404699-3.00068-8>
- Hamzalıoğlu, A., & Gökmen, V. (2015). Investigation of the reactions of acrylamide during in vitro multistep enzymatic digestion of thermally processed foods. *Food & Function*, 6(1), 109–114. <http://doi.org/10.1039/c4fo00884g>
- Hidalgo, F. J., Delgado, R. M., & Zamora, R. (2010). Role of mercaptans on acrylamide elimination. *Food Chemistry*, 122(3), 596–601. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.016>
- IARC. (1994). Acrylamide. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Volume 60 Some Industrial Chemicals*, 389–433.
- Kumar, D., Singh, B. P., & Kumar, P. (2004). An overview of the factors affecting sugar content of potatoes. *Annals of Applied Biology*, 145(3), 247–256. <http://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2004.tb00380.x>
- Lineback, D. R., Coughlin, J. R., & Stadler, R. H. (2012). Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual Review of Food Science and Technology*, 3(November), 15–35. <http://doi.org/10.1146/annurev-food-022811-101114>
- Matthäus, B., Haase, N. U., & Vosmann, K. (2004). Factors affecting the concentration of acrylamide during deep-fat frying of potatoes. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 106(11), 793–801. <http://doi.org/10.1002/ejlt.200400992>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., ... Brodkorb, A. (2014). A standardised static in vitro digestion method suitable for food – an international consensus. *Food Funct. Food Funct*, 5(5), 1113–1124. <http://doi.org/10.1039/c3fo60702j>
- Pastoriza, S., Rufián-Henares, J. Á., & Morales, F. J. (2012). Reactivity of acrylamide with coffee melanoidins in model systems. *LWT - Food Science and Technology*, 45(2), 198–203. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2011.08.004>
- Recommendations, C. N., & Nutrition, A. (2013). Guidance for Industry Acrylamide in Foods Table of Contents, (March 2016).
- Sansano, M., Juan-Borrás, M., Escriche, I., Andrés, A., & Heredia, A. (2015). Effect of pretreatments and air-frying, a novel technology, on acrylamide generation in fried potatoes. *Journal of Food Science*, 80(5), T1120–T1128. <http://doi.org/10.1111/1750-3841.12843>
- Singh, J., & Kaur, L. (2016). *Advances in potato chemistry and technology*. Academic press.
- Tareke, E., Rydberg, P., Karlsson, P., Eriksson, S., & Törnqvist, M. (2002). Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(17), 4998–5006. <http://doi.org/10.1021/jf020302f>
- Zamora, R., Delgado, R. M., & Hidalgo, F. J. (2010). Model reactions of acrylamide with selected amino compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58(3), 1708–1713. <http://doi.org/10.1021/jf903378x>

## **ANEXO**

Resumen de la composición de las disoluciones Stock y Fluidos Simulados utilizados en la digestión *in vitro*

### COMPOSICIÓN DE LAS SOLUCIONES STOCK

Constituyente	Concentración Stock		SSS (500 mL)		SSG (1000 mL)		SSD (1000 mL)	
			pH=7		pH=3		pH=7	
			Vol. stock	Conc. SSF	Vol. stock	Conc. SSF	Vol. stock	Conc. SSF
	g·L <sup>-1</sup>	mol·L <sup>-1</sup>	mL	mmol·L <sup>-1</sup>	mL	mmol·L <sup>-1</sup>	mL	mmol·L <sup>-1</sup>
KCl	37.3	0.5	15.1	15.1	6.9	6.9	6.8	6.8
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	68	0.5	3.7	3.7	0.9	0.9	0.8	0.8
NaHCO <sub>3</sub>	84	1	6.8	13.6	12.5	25	42.5	85
NaCl	117	2	-	-	11.8	47.2	9.6	38.4
MgCl <sub>2</sub> (H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub>	30.5	0.15	0.5	0.15	0.4	0.1	1.1	0.33
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	48	0.5	0.06	0.06	0.5	0.5	-	-

SSS: Solución Stock Salival; SSG: Solución Stock Gástrica; SSD: Solución Stock Duodenal.

### COMPOSICIÓN DE LOS FLUIDOS SIMULADOS

Constituyente	FGS (500 mL)	FDS (500 mL)
SSG (mL)	445.32	-
SSD (mL)	-	452.08
CaCl <sub>2</sub> (mL)	0.29	0.83
Pepsina (mg)	48.85	-
Bilis (g)	-	4.40
Pancreatina (mg)	-	625

FGS: Fluido Gástrico Simulado; FDS: Fluido Duodenal Simulado.

El pH de los fluidos simulados se ajustó a 3 ó 7 dependiendo de la fase (gástrica o intestinal) con HCl (1 N) y NaOH (1 N) y se ajustaron con agua hasta un volumen final de 500 mL.