

**Influencia de las condiciones de proceso para la reducción de acrilamida con la adición de compuestos naturales o sintéticos a un producto de panificación frito (donas). Un aporte a la disminución de un riesgo para la salud humana.**

**Trabajo de grado para optar por el título de Magíster en Innovación Alimentaria y Nutrición**

**Vanessa Bedoya Mejía**

**Asesor**

**Julián Alberto Londoño Londoño**

**Ph.D. en Ciencias Químicas**

**Corporación Universitaria Lasallista**

**Facultad de Ingenierías**

**Maestría en Innovación Alimentaria y Nutrición**

**Caldas, Antioquia**

**2017**

"Nada te turbe, nada te espante; todo se pasa, Dios no se muda; la paciencia todo lo alcanza. Quien a Dios tiene, nada le falta. Sólo Dios basta". Santa Teresa de Jesús.

A mi madre, Nubia Stella Mejía Cortés, mi orgullo más inmenso.

A mi hermano, Mateo Bedoya Mejía, mi amor más grande.

A Andrés Julián Acevedo Manco, mi cómplice incondicional.

A todas las personas que aportaron a mi proceso de formación.

## Tabla de contenido

Resumen.....	8
Introducción.....	10
Justificación.....	12
Objetivos .....	14
Marco teórico .....	15
Donas.....	15
Generalidades económicas en Colombia. ....	15
Generalidades técnicas. ....	16
Fritura.....	21
Descripción de la operación unitaria. ....	21
Aceites utilizados en la industria alimentaria.....	23
Acrilamida. ....	30
¿Qué es la acrilamida (AA)? .....	30
Mecanismos de formación y metabolismo de la Acrilamida.....	32
Reacción de Maillard.....	32
Rutas de formación de Acrilamida en alimentos. ....	35
Metabolismo de la acrilamida en el organismo.....	39
Efectos tóxicos y epidemiológicos. ....	41
Límite permitido del contenido de acrilamida en alimentos. ....	42
Determinación de acrilamida.....	43
Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe). ....	44
Alimentos que presentan formación de acrilamida. ....	48

Mitigación de acrilamida en los procesos. ....	54
Asparaginasa.....	56
Antioxidantes .....	58
Ácido Cítrico.....	59
Metodología .....	61
Estandarización la formulación de las donas .....	61
Objetivo 1: Estandarizar el método analítico para la cuantificación cromatográfica de acrilamida en productos fritos (donas). ....	65
Determinación del método de extracción.....	65
Extracción de acrilamida en las diferentes formulaciones de las donas.....	67
Identificación y cuantificación de la acrilamida. ....	68
Objetivo 2: Reformular la matriz de panificación con el uso de extractos o aditivos para la reducción en la formación de acrilamida. ....	71
Determinación de la acrilamida.....	71
Caracterización bromatológica.....	72
Análisis de perfil de textura TPA. ....	74
Análisis sensorial. ....	75
Objetivo 3: Determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de la acrilamida en las reformulaciones seleccionadas. ....	77
Determinación de la acrilamida.....	77
Medición de color. ....	79
Resultados .....	81
Objetivo 1: Estandarizar el método analítico para la cuantificación cromatográfica de acrilamida en productos fritos (donas). ....	81
Determinación del método de extracción. ....	81
Extracción de acrilamida en las diferentes formulaciones de las donas.....	81

Identificación y cuantificación de la acrilamida. ....	82
Objetivo 2: Reformular la matriz de panificación con el uso de extractos y/o aditivos para la reducción en la formación de acrilamida. ....	83
Medidas de producción de las donas. ....	83
Caracterización bromatológica.....	86
Determinación de la acrilamida.....	87
Análisis de perfil de textura TPA. ....	89
Análisis sensorial.....	91
Objetivo 3: Determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de la acrilamida en las reformulaciones seleccionadas. ....	94
Determinación de la acrilamida.....	94
Medición de color. ....	98
Conclusiones.....	102
Recomendaciones.....	104
Referencias .....	105

## Lista de tablas

Tabla 1. Comparación de las fórmulas donas vs pan blanco. _____	17
Tabla 2. Cox value para los aceites de uso industrial. _____	25
Tabla 3. Orden del cox value para los aceites evaluados. _____	26
Tabla 4. Comparación del Compuestos polares y la literatura. _____	26
Tabla 5. Principales aplicaciones del aceite de palma. _____	28
Tabla 6. Concentraciones de acrilamida medidas en Alimentos en Europa de 2007 a 2012 (EFSA 2015a, b) y los niveles indicativos fijados por Comisión Europea (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria 2011). _____	51
Tabla 7. Formulación de la dona para 1000 g de harina. _____	61
Tabla 8. Listado de sales de extracción y limpieza. _____	65
Tabla 9. Condiciones del método masas para la acrilamida. _____	68
Tabla 10. Distribución de las corridas para el diseño de superficie de respuesta. ____	78
Tabla 11. Promedios de las unidades y masas de las donas crudas. _____	83
Tabla 12. Promedios de los parámetros físicos de las donas fritas. _____	84
Tabla 13. Porcentaje de reducción de la acrilamida en las formulaciones. _____	87
Tabla 14. Análisis de perfil de textura TPA para las formulaciones de donas. _____	91
Tabla 15. Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño factorial. _____	94
Tabla 16: Condiciones de optimización para la minimización de acrilamida. _____	95
Tabla 17. Relación entre las condiciones del proceso con la reducción de acrilamida.97	
Tabla 18. Variaciones en la diferencia total de color ( $\Delta E$ ), según las condiciones de elaboración de las donas. _____	100

## Lista de figuras

Figura 1. Proceso de elaboración de donas. _____	20
Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de fritura. _____	22
Figura 3. Esquema general con las principales reacciones de Maillard. _____	34
Figura 4. (A) Reacción de la formación de acrilamida a partir de asparagina (B) Reacción simplificada para la formación de acrilamida a partir de asparagina y glucosa / fructosa	35
Figura 5. Rutas alternas de formación de acrilamida. _____	38
Figura 6. Esquema del funcionamiento del equipo HPLC. _____	47
Figura 7. Contenido de acrilamida de acuerdo al tratamiento térmico. 1: comida seca; 2: comida frita; 3: extruidos (granos); 4: comida asada; 5: comida salteada; 6: comida tostada. _____	48
Figura 8. Seguimiento a los niveles de acrilamida en alimentos del mercado sueco durante el período 2005-2013. _____	49
Figura 9. Formación de acrilamida vs tipo de aceite utilizado en pasteles de carne con vegetales. _____	52
Figura 10. Niveles de acrilamida en alimentos convencionales colombianos. _____	54
Figura 11. Niveles de acrilamida en alimentos tradicionales colombianos. _____	54
Figura 12. Diagrama de las etapas de elaboración de las donas. _____	63
Figura 13. Gráfico de medias e intervalos de diferencia mínimo significativa (LSD) del contenido de acrilamida (mg/Kg) en las formulaciones. _____	88
Figura 14. Resultados sensoriales, gráficos radial e histograma. _____	92
Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta estimada. _____	96
Figura 16. Fotografía del cambio de color entre tratamientos vs la muestra patrón. _	98

## Resumen

Este trabajo tuvo la finalidad de proponer una herramienta para contribuir en la disminución de la formación de acrilamida en donas, se estableció el proceso de elaboración del producto con base en formulaciones tradicionales a nivel piloto, desarrollando la estandarización del método de determinación de acrilamida utilizando cromatografía líquida acoplado a espectrometría masas masas (UPLC-MS/MS) en productos de panificación fritos. Las transiciones específicas  $m/z$  71.7498→43.8367 y  $m/z$  71.7498→54.8488 fueron usadas para la detección y cuantificación, respectivamente, 5 min como tiempo de retención a un flujo de 0.3 mL/min, el volumen de inyección en el equipo fue de 5  $\mu$ L para el análisis cromatográfico.

Se prepararon cuatro formulaciones de donas, -bajo las mismas condiciones de proceso a una temperatura de  $190\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ , por un tiempo de 45 s-, una patrón y otras tres con los aditivos reductores, a las cuales se les adicionó proporciones recomendadas que minimizaran dicha sustancia: la enzima, asparaginasa a 430 ppm; un gramo de antioxidante Nativanox® y un gramo ácido cítrico, como sustancia sintética, obteniendo un resultado de disminución de acrilamida en las donas, en el siguiente orden: ácido cítrico, asparaginasa y antioxidante.

Finalmente, se evaluó el efecto de las variables tiempo, temperatura y dosificación de la enzima en diferentes rangos, 45 s - 65 s;  $170\text{ }^{\circ}\text{C}$  -  $190\text{ }^{\circ}\text{C}$  y 572 ppm - 715 ppm, respectivamente, como el aditivo apropiado debido a que demostró la mayor disminución de formación de acrilamida en la dona y no tuvo diferencias estadísticamente significativas con respecto al ácido cítrico. Este último aditivo, al igual

que el antioxidante resaltaron sabores no deseables en el análisis sensorial, aunque, en la prueba de textura, el parámetro dureza fue superior con la asparaginasa en comparación con las otras formulaciones. Logrando establecer que la única variable que afectó el desarrollo de acrilamida fue la temperatura, según el modelo propuesto, con un valor óptimo de  $166\text{ °C} \pm 2$  independiente del tiempo y concentración de la enzima. De manera semejante, el color solo se alteró por el factor temperatura, el cual propició cambios en las tonalidades propias para este tipo de producto.

**Palabras clave:** Acrilamida, dona, enzima, antioxidante, ácido cítrico.

## Introducción

En la tecnología de panificación, específicamente productos como las donas están incrementando sus volúmenes de ventas al generar auge en su consumo en nuestro país, lo que implica que es un mercado con alto potencial; abarcando también otras líneas de producción del sector, al cual se debe controlar aspectos nutricionales y de inocuidad para el cliente final.

Las donas son sometidas a un proceso de fritura en su operación unitaria lo que causa una alerta potencial en la salud humana, al anunciarse la presencia de acrilamida en aquellos alimentos que pasan por un proceso térmico de horneado o de fritura.

En tal sentido, se ha identificado que a partir del año 2002, la formación de la acrilamida tiene lugar por la reacción del aminoácido asparagina como precursor con sustratos limitantes como azúcares reductores, sometidos a temperaturas superiores a 120 °C en la reacción de Maillard o también llamada “oscurecimiento no enzimático”, en los procesos térmicos de fritura y horneado, mencionados anteriormente, además de asados y tostados, alcanzando límites cercanos a los niveles máximos permitidos, originando diversas estrategias desde los entes gubernamentales hacia los industriales para mitigar la formación de esta “sustancia probablemente cancerígena en humanos”, como resultado de algunos estudios adelantados donde demuestran alteraciones carcinogénicas y mutagénicas en mamíferos y líneas celulares humanas.

La pertinencia de esta investigación evidencia la necesidad de evaluar dicho compuesto en el campo de la química de los alimentos, para este caso en matrices

fritas de panificación, con la intención de minimizar en una forma eficiente las concentraciones producidas de acrilamida, debido a que este tipo de snack (dona) se considera “ready to eat” como un producto en posicionamiento, máxime cuando el día a día muestra la entrada de nuevas franquicias y lanzamientos; así mismo, al ser un mercado tradicional y rentable se crean comercios informales o establecimientos denominados “retail”, propiciando herramientas al sector para que se enteren de los resultados a nivel piloto y puedan tomar acciones para mejoramiento de los procesos a los que son sometidos los productos de panificación.

El objetivo de la investigación fue estandarizar la técnica analítica de determinación de acrilamida usando cromatografía líquida acoplada a espectrometría masas masas (UPLC-MS/MS) en alimentos fritos; cuantificando e identificando la concentración de acrilamida formada en cuatro formulaciones: dona patrón y las donas con enzima, antioxidante y ácido cítrico para seleccionar el aditivo que menor cantidad de esta sustancia desarrolle, sin alterar las características sensoriales del producto; por último, al identificar la formulación con el aditivo reductor de este compuesto, se evaluó el proceso de elaboración de la dona variando las condiciones tiempo y temperatura de fritura, así como dos dosificaciones mayores del aditivo con el fin de determinar si es posible continuar disminuyendo la formación de acrilamida; lo anterior soportado estadísticamente bajo un diseño unifactorial y de superficie de respuesta y por un concertado rigor científico en las metodologías de laboratorio.

## Justificación

A la fecha, en Colombia no se cuenta con una regulación sanitaria que establezca los valores de referencia de acrilamida en alimentos, y si bien se percibe que hay desconocimiento en el tema, basado en que algunas empresas se les dificulta actualizarse en temas de inocuidad de los alimentos; originando una brecha entre el sector académico e industrial, que en su lugar solo siguen evaluando características fisicoquímicas, bromatológicas o microbiológicas, que se rigen en la normatividad.

Entidades internacionales han publicado reportes con el seguimiento de la presencia de acrilamida en productos básicos de la canasta familiar como los cereales para bebés, café, papitas fritas y pan, valores que superaron los niveles indicativos establecidos por la Unión Europea. Teniendo en cuenta esta posición, es viable que la salubridad alimentaria en Colombia también este siendo afectada, con la desventaja que a nivel nacional hay escasos estudios sobre el tema de acrilamida en la matriz en mención.

El sector de panificación y pastelería es uno de los más versátiles del mercado, donde la reinención del muffin y donas aumenta el portafolio de productos tanto en panaderías artesanales, como en empresas industriales; basándose en aprovechar las ilimitadas presentaciones, en cuanto a características sensoriales de sabor, olor, color, apariencia, textura y diseño, siendo atractivo para la población infantil y juvenil. Con la premisa de estar los consumidores ávidos por productos con agregados de componentes que generen un impacto positivo en la salud.

De otro lado, son pocos los laboratorios en nuestro país, que prestan el servicio de determinación de acrilamida, por lo cual, es una oportunidad para la Corporación Universitaria Lasallista de incentivar la investigación en otros productos alimentarios y ofertar el análisis en el mercado, luego de una adquisición de equipos robustos y el montaje del laboratorio de Trazabilidad, generando capacidad de respuesta a futuros requisitos exigidos por el Instituto Nacional de Vigilancia de Medicamentos y Alimentos – INVIMA, entidad que viene desarrollando el “Plan nacional subsectorial de vigilancia y control de acrilamida en alimentos procesados para el año 2016” priorizando los siguientes productos: papas fritas de paquete, pan (blando y tostado), galletas, café (tostado e instantáneo) y panela.

## Objetivos

### Objetivo general:

Determinar la influencia de las condiciones de proceso para la reducción de acrilamida con la adición de compuestos naturales o sintéticos a un producto de panificación frito (donas), como un aporte a la disminución de un riesgo para la salud humana.

### Objetivos específicos:

1. Estandarizar el método analítico para la cuantificación cromatográfica de acrilamida en productos fritos (donas).
2. Reformular la matriz de panificación con el uso de extractos o aditivos para la reducción en la formación de acrilamida.
3. Determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de la acrilamida en las reformulaciones.

## Marco teórico

### Donas.

#### Generalidades económicas en Colombia.

En un artículo publicado en la revista La Republica, la autora Pérez, V. (2014) determina que Donucol con la franquicia Dunkin' Donuts Colombia, es un mercado líder en la región por los años que lleva operando y por el número de tiendas que funcionan en la actualidad (175 puntos), la clave es el potencial para seguir creciendo (Armenia, Barranquilla, Santa Marta y Cartagena), es el país donde hay más puntos de venta de la región latinoamericana, donde se venden 1,8 millones de donas al mes, la franquicia cuenta con 11.000 locales en todo el mundo y aproximadamente 400 en América Latina.

Los puntos que más venden en el país son aquellos que tienen un alto tráfico de personas, es decir, en aeropuertos y las terminales de buses. En otro texto, Sierra, JF. (2014) refiere que en ese año tuvieron ventas en el país por 14 millones de dólares; por esta creciente tendencia El Grupo VA!, el mismo de Hamburguesas El Corral estuvo detrás de la penetración del mercado con la marca Krispy Kreme, una firma que trae sus propias máquinas desde Estados Unidos para vender donas recién hechas. El 26 de diciembre de 2014, La Superintendencia de Industria y Comercio informó que el GRUPO NUTRESA obtendrá el 100 % de las acciones de la compañía matriz titular de las diferentes sociedades que conforman el GRUPO EL CORRAL entre ellos Krispy Kreme, que finalmente ya está operando en diferentes puntos de venta en el país.

De manera paralela, El GRUPO BIMBO® y Productos RAMO han incursionado en 2015 y 2016 con la presentación de estos productos en empaques por varias unidades o de manera individual, espolvoreadas o recubiertas con chocolate, el primero ofrece el producto en los principales supermercados del país, para la segunda, por ahora se encuentra en las tiendas de Bogotá y Tunja.

Así como, las panaderías ubicadas en los barrios -que en menor cantidad también ofrecen donas-, tal como lo indica el censo de Infocomercio 2011 realizado por Servinformación, reportado por la Asociación Nacional de Panaderos (Adepan) y publicado en Portafolio, donde enumeran que en Bogotá hay 6.974 panaderías, y es la ciudad con el mayor número de estos establecimientos, seguida de Cali, con 2.165, Medellín 1.532, Barranquilla 565 y en Bucaramanga con 466 panaderías.

### **Generalidades técnicas.**

Las donas (pasteles fritos) tienen origen desde el siglo V en el norte europeo, solo hasta mediados de 1860's fueron preparadas y comercializadas en Estados Unidos y para 1920 apareció la primera máquina de producción de donas, con la cual se hizo visible en las panaderías. Existen dos tipos de donas, tipo pastel (leudado químico) y de levadura (leudado con levadura). Ambas, se elaboran con ingredientes similares y mediante fritura profunda. Su textura y contenido de aceite son diferentes; las donas de levadura tienen textura y miga parecida al pan, con un contenido de aceite de 25% (b.h.), mientras que las donas tipo pastel tienen una estructura celular fina y una miga blanda, parecida al pastel, con un contenido de aceite alrededor de 20% (b.h.). Las donas pastel se hacen con masa endulzada y leudada con polvo de

panadería, se fríen en 90 s -45 s cada lado- en un rango de temperatura de 190 °C a 198 °C. Las donas de levadura se hacen de masa dulce fermentada con la levadura, se fríen de 182 °C a 190 °C por 75 s cada lado (Gómez-Daza J.C, 2014, 88), (AIB International, 2015, 1-2).

Hay dos opciones para moldear las donas, el método de lámina y corte y el método de extrusión. Las donas tipo pastel se manejan en equipos de extrusión y el método de lámina y corte se usa en general para donas de levadura. La harina de trigo es única entre los productos de cereal que se puede transformar en masas con características y elásticas al mezclarlas con agua bajo condiciones apropiadas (Gómez-Daza J.C, 2014, 89).

La tabla 1 enumera los ingredientes principales para la elaboración de las donas, comparándola con la formulación de un pan blanco.

Tabla 1. Comparación de las fórmulas donas vs pan blanco.

<b>Ingrediente</b>	<b>Donas levadura (%)</b>	<b>Pan blanco (%)</b>	<b>Funciones principales</b>
Harina	100	100	Aporta viscosidad, adhesión estructura, formación del gluten y contiene azúcares reductores.
Azúcar	8	4 – 10	Alimento para la levadura, color, retención de humedad, sabor.
Shortening	10	3	Textura: suavidad, palatabilidad; lubricación, barrera de humedad. Son emulsificantes e inhibidores

<b>Ingrediente</b>	<b>Donas levadura (%)</b>	<b>Pan blanco (%)</b>	<b>Funciones principales</b>
			del envejecimiento.
Sal	2	2	Sabor, fortalecimiento de las proteínas.
Leche	2	2	Contiene lactosa (azúcar reductor), ayuda en el color de la corteza, sabor, retención de humedad y adhesión.
Huevos	4		La lecitina de la yema actúa como emulsificante y las proteínas de la clara mejoran la adhesión. Contribuye a la estructura, elasticidad, sabor y color de la corteza.
Agua	56	62	Hidratación de la proteína, dispersión de los ingredientes menores, consistencia y control de temperatura de la masa.
Levadura	4	3	Es proporcionar gas -CO <sub>2</sub> -, para la aireación y la expansión de la masa durante la mezcla y la fritura.

Fuente (AIB International, 2015, 1-4), (Grażyna B & Nebesny E, Oracz J, 2013, 150).



El proceso de la elaboración de las donas en general, se muestra en la figura 1.

Figura 1. Proceso de elaboración de donas.

Mezclado	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Se mezclan todos los ingredientes a velocidad baja (primera velocidad) por un minuto. Luego se aumenta la velocidad (segunda velocidad) y se mezcla por dos minutos. Finalmente, se continua mezclando a tercera velocidad durante 10 minutos, en esta etapa es donde comienza el desarrollo del gluten, la masa debe ser suave y con la elasticidad adecuada, temperatura final entre 26 °C a 28 °C.</li> </ul>
Fermentación 1	<ul style="list-style-type: none"> <li>•En este paso es cuando la levadura comienza a actuar degradando el azúcar de la mezcla. El tiempo de reposo depende de la temperatura final de la masa. Si esta temperatura es más alta el tiempo se reduce y viceversa. El tiempo de reposo para lograr las características deseadas es de aproximadamente 35 a 45 minutos.</li> </ul>
Moldeado, laminado y cortado	<ul style="list-style-type: none"> <li>•La levadura luego del reposo ha producido CO<sub>2</sub>, por lo tanto, es necesario airear nuevamente la masa presionándola homogéneamente hasta extraer el CO<sub>2</sub>. Luego es laminada para obtener el espesor requerido, los cortadores son moldes que se presionan sobre la masa de acuerdo al peso y tamaño acostumbrado.</li> </ul>
Fermentación 2	<ul style="list-style-type: none"> <li>•La cámara de fermentación controla el calor y la humedad necesaria para que la levadura actúe. Con una humedad relativa en un rango de 40 a 75 % HR y una temperatura de 35°C a 40 °C, se inyecta calor húmedo que le da la expansión del producto durante 30 a 45 minutos.</li> </ul>
Freído	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Las donas son fritas a 190 °C por 45 s cada lado, se dejan escurrir y se enfrían.</li> </ul>

Fuente (Morales V, 2001, 1-2), (AIB International, 2015, 9-16).

A la fecha, no hay suficientes datos que contengan información sobre el contenido de acrilamida en donas, así como el método para su reducción. En 2013 se realizó un estudio con el objetivo de establecer la influencia de los aditivos (extractos de té verde y de café verde) sobre las propiedades nutricionales, el grado de degradación de los antioxidantes añadidos, la actividad antioxidante del producto frito y finalmente el contenido de formación de acrilamida (Grażyna B & Nebesny E, Oracz J, 2013, 150).

Sin embargo, la recomendación más afín es que en la fermentación con levadura de las masas de trigo para elaborar pan reduce el contenido de asparagina libre (CODEX ALIMENTARIUS, 2009, 11), un tiempo de fermentación de una hora sería suficiente para reducir el contenido de acrilamida en panes industriales (Lupano, 2013, 48).

## **Fritura.**

### **Descripción de la operación unitaria.**

La fritura es una operación unitaria que corresponde a un complejo proceso de deshidratación en el cual ocurren interacciones simultáneas de transferencia de calor y de masa; el calor se transfiere del aceite caliente al producto, y el aceite se absorbe. El propósito de freír alimentos es otorgarle a éstos características especiales de textura, color, gusto, sabor y olor (Castellanos, G, Francisco, J, *et al.*, 2012, 198).

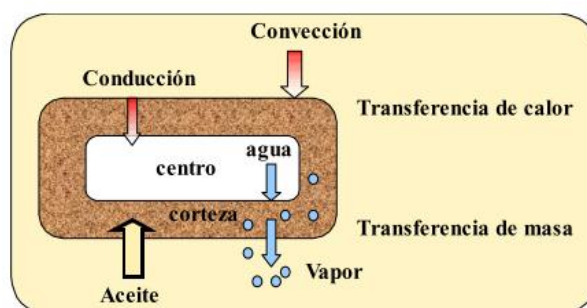
La cantidad de aceite absorbido por un alimento depende, en gran medida, de su humedad, porosidad y superficie expuesta al aceite de fritura (Rodríguez, G, *et al.*, 2013, 125). El tiempo y la temperatura de fritura, tamaño, forma y composición química del alimento, la tensión interfacial inicial, la costra formada durante el proceso, los pretratamientos aplicados al producto y en menor grado, la cantidad y composición del aceite (Murillio, M, 2010, 25).

Las temperaturas altas (130 °C – 190 °C) utilizadas en el proceso de fritura, producen en el alimento evaporación de agua que se transfiere al aceite, y

simultáneamente el alimento absorbe aceite para remplazar en parte el agua eliminada del producto (Rodríguez, G, Zuluaga, C L, *et al.*, 2013, 125).

En la figura 2, se muestra un diagrama esquemático del proceso: cómo se transfiere el calor por convección desde el aceite caliente a la superficie del producto y luego por conducción desde la superficie hacia el interior. La transferencia de masa se caracteriza por la pérdida de agua (humedad superficial) del alimento en forma de vapor de agua y por el paso de aceite al interior del alimento (Murillo, M, 2010, 23).

Figura 2. Diagrama esquemático del proceso de fritura.



Fuente (Brennan, 2008, 273).

Los criterios principales para seleccionar aceites de fritura son: prolongada estabilidad en la fritura, fluidez, aroma suave, baja tendencia a formar espuma o humo, gomas (polímeros), estabilidad oxidativa en los alimentos durante el almacenamiento, proporcionar a los productos una superficie café-dorada, que genere excelente textura y el precio sea razonable (Murillo, M, 2010, 24, 26).

### **Aceites utilizados en la industria alimentaria.**

Los cuatro (4) aceites principales que se comercializan a gran escala son el aceite de soya, el de palma, el de canola y el de girasol, representando alrededor del 80 % de la producción mundial.

El proceso generalmente utilizado es la hidrogenación, la cual se utiliza para solidificar grasas que, a temperatura ambiente, son líquidas con el objetivo de poderlas utilizar en los procesos de manufactura, así como aumentar la estabilidad del producto frente a la oxidación y mejorar sus características organolépticas. La hidrogenación genera altos contenidos de ácidos grasos trans, que pueden alcanzar hasta 50% de las grasas totales, fenómeno que también ocurre durante el proceso térmico de la elaboración de los alimentos (Manzur, F, *et al.*, 2009, 106).

La principal fuente alimenticia de ácidos grasos trans, resultan ser aquellos alimentos procesados que contienen aceites vegetales hidrogenados, tales como margarinas, frituras comerciales, productos de panificación y repostería (Uauy, R, Torrejón, C, 2011, 928). Galletas dulces y saladas, tortas, pasteles horneados, panes industrializados en rebanadas, tanto blancos como integrales, golosinas, barras de cereal, glaseados de repostería, cereales pre-cocidos para niños, alimentos con grasas recalentadas, mantequilla, quesos, leche, carne y derivados, entre otros (Ruiz, A, 2009, 366); ( Griguol, V, Camacho, ML, *et al.*, 2007, 89, 90, 91).

Existen diferencias en el contenido de ácidos grasos trans en snacks y alimentos precocinados. Es común, que se mezclen distintos tipos de grasas y aceites, por ejemplo aceites vegetales parcialmente hidrogenados y no hidrogenados como el

aceite de coco y el aceite de palma para la preparación de alimentos, lo que determina el contenido en ácidos grasos trans del producto (Thomas, J, Crawford, M, *et al.*, FAO, 2012, 155).

En consecuencia, el autor Valenzuela, A, 2008, 166 asegura que prácticamente todos los aceites de consumo doméstico contienen pequeñas cantidades de ácidos grasos con isomería TRANS -AGT- (0,1 - 1 %). La fritura, tanto industrial como doméstica, que involucra temperaturas hasta 180 °C por tiempos prolongados constituye otra fuente de formación de AGT, cuando los aceites que se utilizan son relativamente polinsaturados. El 95 % y 99 % de los AGT de nuestra ingesta son de origen tecnológico.

Puesto que la calidad del aceite que se utiliza para freír tiene un alto impacto en la absorción de grasas, es recomendable utilizar aceite fresco en la medida de lo posible. El aceite de freír está formado prácticamente sólo por triglicéridos, pero su estructura química se altera con el uso repetido. Los cambios fisicoquímicos dependen de numerosos factores, incluyendo el tipo y volumen del aceite utilizado, el producto alimentario que se fríe, la cantidad de alimentos que se están friendo, la temperatura a la que funciona la freidora, la presencia de oligoelementos y el grado de exposición atmosférica (Thomas, J, Crawford, M, *et al.*, FAO, 2012, 164).

En el estudio realizado por Moreno, S, Ruiz, B, *et al.*, 2014, 182, 184 cuantificó el contenido de grasas trans en alimentos españoles de consumo habitual entre los niños y adolescentes, dando como resultado que únicamente en 30 de los 170 productos diferentes analizados se ha detectado la presencia de AGT por encima del límite de detección de la técnica (0,1 g / 100 g de ácidos grasos). En el caso de algunos alimentos analizados en Canadá se alcanzaban contenidos medios de AGT en

relación con la grasa total superiores al 40 %, en galletas saladas, o próximas al 30 % en rosca tipo donas, papas fritas o margarinas.

En Colombia no existen datos ni políticas específicas respecto al tema del consumo de AGT, sin embargo, se ha comenzado un estudio liderado por el Instituto de Bienestar Familiar cuyo objetivo, entre otros, es conocer el perfil alimentario y nutricional de la población colombiana y los riesgos que representa (Manzur, F, Alvear, C, *et al.*, 2009, 107).

### Dos parámetros de calidad para la selección del aceite de fritura.

- 1. Cox Value:** Es el índice de oxidabilidad de los aceites y se calcula con base en el porcentaje de ácidos grasos C18 insaturados, aplicando la fórmula propuesta por Fatemi y Hammond (1980) (Farhoosh, Einafshar, & Sharayei, 2009, 934).

En la tabla 2 y 3 se relacionan los cox value para los aceites y su respectivo orden de selección.

$$\text{Cox Value} = [1 (\text{C18:1\%}) + 10.3 (\text{C18:2\%}) + 21.6 (\text{C18:3\%})]/100$$

Tabla 2. Cox value para los aceites de uso industrial.

FA	GIRASOL	HOSO	OLIVA	CANOLA	OLEÍNA	SOYA	MAÍZ	COCO	M.CACAO	MANÍ	M.CERDO	CHÍA	LINAZA	ALGODÓN	HASS
C4:0															
C6:0															
C8:0								8							
C10:0								6							
C12:0								47							
C14:0						0,1		18			2	0,02			
C16:0	7	4	13	4	36	11	13	9	26	11	26	7,04	5,3	27	16
C18:0	4	5	3	2	4	4	2	3	34	2	14	3,11	3,3	2	0,4
C20:0			1						1	2		0,27			
C22:0										3		0,04			
C16:1											3	0,04			9
C18:1	20	81	71	62	46	22	32	6	34	52	47	7,12	17,9	18	64
C20:1										2		0,13			
C22:1										2					
C18:2	68	8	10	22	12	53	52	2	3	30	10	20,04	14,7	51	10
C18:3	1			10		7	1					62,1	58,7		0,6
C20:5															
C22:6															
Cox Value	7,42	1,63	1,74	5,05	1,70	7,19	5,89	0,27	0,65	3,61	1,50	15,55	14,37	5,43	1,80

Fuente (Restrepo, 2015)

Tabla 3. Orden del cox value para los aceites evaluados.

CHÍA	LINAZA	GIRASOL	SOYA	MAÍZ	ALGODÓN	CANOLA	MANÍ	HASS	OLIVA	OLEÍNA	HOSO	M.CERDO	M.CACAO	COCO
15,55	14,37	7,42	7,19	5,89	5,43	5,05	3,61	1,80	1,74	1,70	1,63	1,50	0,65	0,27

Fuente (Restrepo, 2015)

Considerando que entre más alto es el valor cox value, el aceite presenta mayor índice de oxidabilidad, lo cual afecta la calidad del mismo, ya que se degrada fácilmente y no es apto para el consumo. De acuerdo a lo anterior, se descarta el uso del aceite girasol y soya por tener valores mayores a 5, que es parámetro máximo permitido.

**2. Compuestos polares totales (TPC):** Indica el grado de deterioro alcanzado por un aceite durante la fritura. Cuanto mayor sea el nivel de TPC, menor será la calidad. El desarrollo de la metodología para la determinación del TPC fue un avance analítico que contribuyó a la aplicación de la normativa vigente. Este método fue adoptado por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada IUPAC (Juárez, Osawa, Acuña, Sammán, & Gonçalves, Guaraldo, 2011, 1920). Muchos países han establecido el límite máximo de 25 a 27% de TPC (Gil, Cho, & Yoon, 2004,568). En la tabla 4 se comparan la cantidad de compuestos polares.

Tabla 4. Comparación del Compuestos polares y la literatura.

Compuestos polares	Valor reportado (%)	Referencia
Palma	13.5	(Mba, Dumont, & Ngadi, 2015)

Soya	6.81 ±0.00	(Farhoosh et al., 2009)
Soya desodorizada	6.06 ± 0.51	
Canola	4.12 ± 0.00	(Farhoosh et al., 2009)
Canola desodorizada	5.33 ± 0.19	

Ramírez B, Gómez, B D, *et al.*, 2012, 61, 63 en un estudio realizado en la Facultad de Nutrición de la Universidad de Antioquia con el objetivo de determinar el contenido de compuestos polares –TPC– (se le atribuyen características como la formación de espuma y el rápido oscurecimiento por su acción oxidante), como parámetro de calidad no exigido en la normas colombianas, sobre cuatro marcas de aceites: girasol, oliva, canola y mezclas vegetales: soya u oleína de palma o algodón o maíz o girasol, las cuales son de alto consumo en la ciudad de Medellín; como resultado de investigación de mezclas de aceites vegetales presentaron una mayor cantidad en el TPC y el menor resultado fue para canola y girasol, respectivamente.

Comparando el resultado de ambos parámetros de calidad, se evidencia que es ideal trabajar con canola. A pesar que todos los valores de TPC de los aceites medidos cumplen al ser menores a 24%, siendo el aceite de canola con el menor valor, pero según fuentes secundarias consultadas no es recomendado para utilizar en la industria por el costo y por la matriz del presente trabajo. En su lugar, se propone evaluar la oleína de palma y afines al cumplir con ambos parámetros.

**Aceite de palma**, ha llegado a ser uno de los aceites vegetales más empleados en diversas aplicaciones debido a sus buenas cualidades y propiedades. A partir de su fraccionamiento se obtienen dos fracciones: una líquida (Oleína) y una dura

(Estearina). La oleína es la fracción más utilizada, es completamente líquida a temperatura ambiente en climas templados. Su versatilidad es bastante conocida, algunos ejemplos lo constituyen, las margarinas, “Shortenigs” (mezcla de grasas empleadas en proceso de fritura), y su gran uso como aceite para freír. En este sentido, podemos distinguir el proceso de fritura en profundidad (Marcano, La Rosa, & Salinas, 2010, 24).

Aparte de las cualidades intrínsecas del aceite de palma, como su alto contenido de antioxidantes naturales y oxidación mínima, las industrias de refinación de aceites y grasas buscan otras, como bajo contenido de ácidos grasos libres (AGL) y de humedad e impurezas, y buena blanqueabilidad. La razón es que un aceite con tales características permite obtener productos inodoros e incoloros bajo condiciones moderadas de operación (Rincón, SM.; Martínez, 2009, 15).

Tabla 5. Principales aplicaciones del aceite de palma.

Productos	Aceite de palma	Oleínas	Estearinas (suaves)	Estearinas (duras)	Aceite de palma endurecido	Doble fracc. de oleínas de palma	Fracc. Interm. de palma	Aceite de palmiste
Mantecas/ <i>shortenings</i>	AA	AA	AA	A	AA	NA	PA	PA
<i>Shortenings</i> especiales	AA	AA	AA	PA	AA	NA	PA	NA
Margarinas	AA	AA	AA	PA	AA	NA	PA	AA
Grasas para frituras	AA	AA	A	NA	A	AA	PA	NA
Aceite cocina (clima caliente)	NA	A	NA	NA	NA	AA		NA
Grasas especiales para coberturas	NA	NA	AA	NA	NA	NA	PA	NA
Grasas para helados	AA	NA	NA	NA	A	NA	NA	AA
Galletería	AA	NA	A	PA	PA	NA	NA	NA
Mezclas para pastelería	AA	NA	A	PA	PA	NA	NA	NA
Glaseados	AA	NA	PA	NA	PA	NA	A	NA
Fideos precocidos	A	AA	A	NA	A	NA	NA	NA
Cremas no lácteas	PA	NA	PA	NA	PA	NA	NA	AA
Galletas	AA	PA	A	AA	A	NA	NA	AA
Grasa para donas	AA	NA	AA	AA	AA	NA	NA	NA
Sustitutos lácteos	AA	AA	AA	PA	AA	NA	PA	AA

AA: Altamente aplicable - A: Aplicable - PA: Poco aplicable - NA: No aplicable

Fuente (Percival, A. 2004, 76).

Como se puede observar en la tabla 5, es recomendable utilizar el aceite de palma o estearinas para fritar las donas.

En diferentes estudios se proponen aceites con alto contenido de ácidos grasos monoinsaturados especialmente ricos en ácido oleico como las oleínas de palma, aceite de oliva y girasol. Por esta razón, el aceite y la oleína de palma incursionaron en el mercado mundial de la fritura a finales del siglo XX y se han mantenido debido a sus ventajas técnico-económicas comparados con otros aceites y grasas. Se estima que millones de toneladas de oleína y aceite de palma en sus formas naturales o mezclas con otros aceites, se utilizan anualmente para frituras domésticas e industriales; adicionalmente, numerosos trabajos indican las ventajas del aceite de palma en fritura por su mayor estabilidad oxidativa en comparación con otros aceites (Zapata, A, Vanegas, LS, & Rojano, R. 2014, 132).

Otro ejemplo del uso del aceite de palma en una matriz de panificación se evidencia en una investigación llevada a cabo para cuantificar la formación de acrilamida en galletas (Anese, Quarta, Peloux, & Calligaris, 2011, 2840).

### **Algunas recomendaciones de uso**

En un trabajo realizado por la investigadora Suaterna Hurtado, AC. 2009, 42-49 describe las principales prácticas con el uso de aceites:

- La adición de aceite fresco al aceite y la limpieza diaria de los residuos de alimentos por medio de la filtración. Aunque se cree que mezclar aceite nuevo con aceite usado altera el proceso de catálisis del aceite, aumentando el deterioro de éstos, según los datos reportados por algunas investigaciones; dicha práctica se

recomienda para mantener el perfil de ácidos grasos y disminuir la formación de compuestos tóxicos, aumentando la vida útil.

- Al igual que para los compuestos polares, aún no hay un consenso en el número de frituras máximo para la utilización del aceite; se ha reportado que la formación de ácidos grasos cíclicos (polímeros y monómeros) aún es baja cuando se han realizado 20 frituras continuas de papas pre-fritas en aceite de girasol, con alto contenido de linoleico y oliva.

El empleo de altas temperaturas, en combinación con otros factores internos al alimento puede dar lugar a la formación de algunos compuestos tóxicos que, además de reducir el valor biológico, inciden en la seguridad del mismo, al ser sustancias que no estaban presentes en el alimento fresco y cuyo origen está directamente relacionada con el proceso tecnológico o culinario aplicado.

## **Acrilamida.**

### **¿Qué es la acrilamida (AA)?**

La acrilamida (AA) es una sustancia química que se encuentra en una amplia aplicación en la industria, por ejemplo, purificación del agua potable y en el envase de alimentos, debido a sus propiedades toxicológicas, los límites legales se han fijado para el agua potable y para la migración a los alimentos (Wenzl, T, De la Calle, B, *et al.*, 2004, 449) en empaques a razón que los materiales de poliacrilamida contienen pequeñas cantidades de acrilamida (Godnic, M, 2002, 1).

Asimismo, es usada en el sector textil, papelera, como acondicionador de suelos, en el procesamiento de vegetales, en la industria cosmética y es un componente del humo del cigarrillo. La acrilamida es un sólido cristalino inodoro y sin color cuyo punto de fusión es 84.5 °C y que se forma de la hidratación del acetonitrilo (Pedreschi, F, 2014, 1).

En la industria alimentaria, la acrilamida se forma principalmente en los alimentos por la reacción de la asparagina (aminoácido) con azúcares reductores (glucosa y fructosa) como parte de la reacción de Maillard; también puede formarse por medio de reacciones que contienen 3-aminopropionamida. La formación de esta sustancia se produce en condiciones de altas temperaturas, generalmente superiores a 120 °C, escasa humedad y tiempos prolongados, principalmente formada en la región de la corteza (CODEX ALIMENTARIUS, 2009, 1); (Dybing, E, Farmer, P B, *et al.*, 2005, 368); (Halder, A, Dhall, A, *et al.*, 2007, 211); (Halder, A, Dhall, A, *et al.*, 2007, 229), (Pavesi, A, Toledo, M C, *et al.*, 2007, 1).

La asparagina es uno de los componentes básicos de las proteínas de semillas de trigo y de centeno. Está presente en  $\gamma$ -gliadina y secalina (1,3-1,47%),  $\alpha$ -gliadina y secalina (2,54-2,68%), co-gliadina y secalina (0,75-0,77%) y subunidades de glutenina de bajo peso molecular (LMW Subunidades) (0,7-1,08%), pero no en subunidades de alto peso molecular (subunidades HMW) (Khan 2007). Es uno de los aminoácidos no esenciales en la dieta (Curtis T, 2016, 156).

## Mecanismos de formación y metabolismo de la Acrilamida.

### Reacción de Maillard.

Una fuerte correlación ha sido señalada entre el desarrollo de color y el contenido de acrilamida de los productos de panadería, debido a la reacción de Maillard que es responsable de la formación de los dos. Se trata de la condensación de grupos amino y azúcares reductores que resultan en la formación de compuestos químicos intermedios que en última instancia se polimerizan para formar pigmentos marrones y aromas deseables (Isleroglu, H, Kemerli, T, *et al.*, 2012, E257, 258). Se produce en tres etapas descritas por (Nursten, 2005, 1-3), (Mottram, Low, & Elmore, 2005, 4-6) (Gökmen, 2016, xxi-xxiii), (Curtis T, 2016, 153-154):

1. Etapa de iniciación: los aminoácidos libres y otros grupos amino reaccionan con azúcares reductores para formar el compuesto carbonilo. La reacción se inicia por la condensación del grupo carbonilo (C=O) de un azúcar reductor con el grupo amino, produciendo una base de Schiff [I]. Si el azúcar es una aldosa, la base de Schiff se puede ciclar para obtener una aldosilamina N-sustituida, tal como glucosilamina a partir de glucosa. El reordenamiento del ácido catalizado de aldosilamina produce un 1,2-enaminol, el cual está en equilibrio con su cetosilamina, una 1-amino-2-desoxicetosa N-sustituida: se conocen como productos de reordenamiento de Amadori. Las cetosas, tales como la fructosa, proporcionan productos de reordenamiento de Heyns relacionados por vías similares [II].

Los productos son incoloros, no se presenta absorción ultravioleta (aproximadamente 280 nm) y se identifica la generación de N-ε-fructosil lisina.

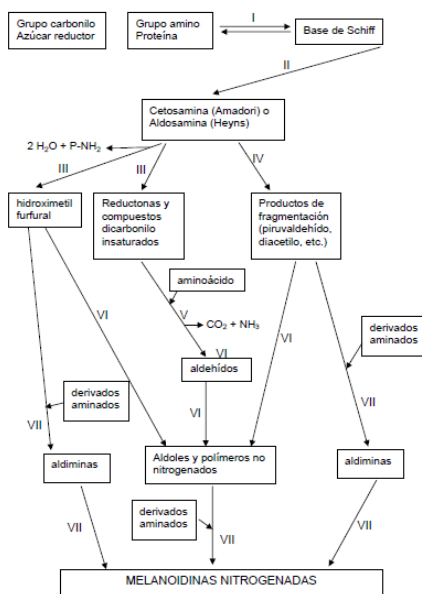
**2.** Etapa intermedia: los productos de reestructuración de Amadori y Heyns se someten a enolización, deshidratación, fragmentación y degradación, dando lugar a productos de deshidratación y fragmentación del azúcar que contienen uno o más grupos carbonilo, incluyendo furfurales heterocíclicos, furanonas y piranonas. Estos compuestos de carbonilo pueden experimentar reacciones de condensación con grupos amino y otros componentes presentes, obteniendo la formación diversos sabores diferentes. Una reacción importante de los compuestos de carbonilo es la degradación de Strecker: la desaminación y descarboxilación de un  $\alpha$ -aminoácido para transformarse en un grupo aldehído [V], con un carbono menos que el aminoácido que le dio origen, y aparecen nuevos compuestos carbonilo que pueden reaccionar entre sí, y producir aromas, como las pirazinas, la dimetil pirazina contribuye al aroma de las papas [IV].

Los productos son incoloros o amarillos, con fuerte absorción en el ultravioleta. Se desarrollan compuestos como el hidroximetilfurfural y la acrilamida [III] a partir de la degradación de Strecker que implica compuestos de carbonilo derivados de azúcar y asparagina.

**3.** Etapa de finalización: produce la polimerización de los intermediarios, y se forman polímeros insaturados, fluorescentes y coloreados: las melanoidinas [VII], las cuales son pigmentos pardos o negros, de estructura compleja y alto peso molecular, responsables del color dorado o tostado de los productos de panadería, estos polímeros se forman principalmente por condensación aldólica de cetosaminas o compuestos procedentes de ellas, y también por condensación aldosa-imina con formación de compuestos nitrogenados heterocíclicos [VI].

En esta etapa se incluye la formación de carboximetil lisina como productos finales de glicación avanzada. En la figura 3 se muestra gráficamente las etapas anteriormente expuestas.

Figura 3. Esquema general con las principales reacciones de Maillard.



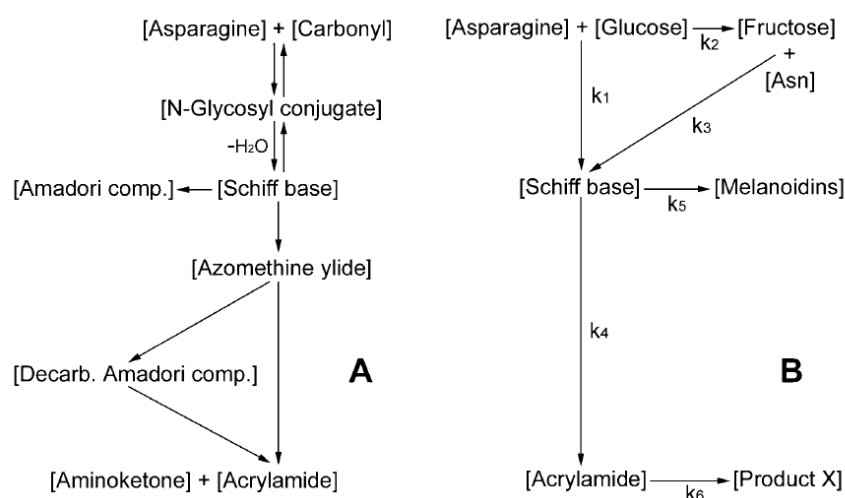
Fuente (Lupano, 2013, 43).

## Rutas de formación de Acrilamida en alimentos.

La asparagina se considera que es la fuente de nitrógeno para la formación de la acrilamida, el calentamiento de este aminoácido solo, no produce acrilamida eficientemente, pero combinado con azúcares reductores como glucosa o fructosa acelera su formación (Masson, L, Muñoz, J R, *et al.*, 2007, 187).

La reacción en condiciones de baja humedad que implica la formación de una base de Schiff a partir de asparagina y un azúcar reductor figura 4, es el paso clave de la descarboxilación de la base de Schiff formándose los intermediarios de la reacción de Maillard (aminas) los cuales pueden liberar directamente acrilamida o indirectamente por la acción de su precursor 3-aminopropionamida (Dybing, E, Farmer, P B, *et al.*, 2005, 368).

Figura 4. (A) Reacción de la formación de acrilamida a partir de asparagina (B) Reacción simplificada para la formación de acrilamida a partir de asparagina y glucosa / fructosa.



Fuente (Knol J, Van Loon W, Linssen J, Ruck A, Van Boekel M, 2005, 6134),(Evin, 2008).

Se han propuesto tres (3) vías alternas de formación de acrilamida con los intermediarios: acroleína, ácido acrílico y 3-aminopropionamida (3 - APA).

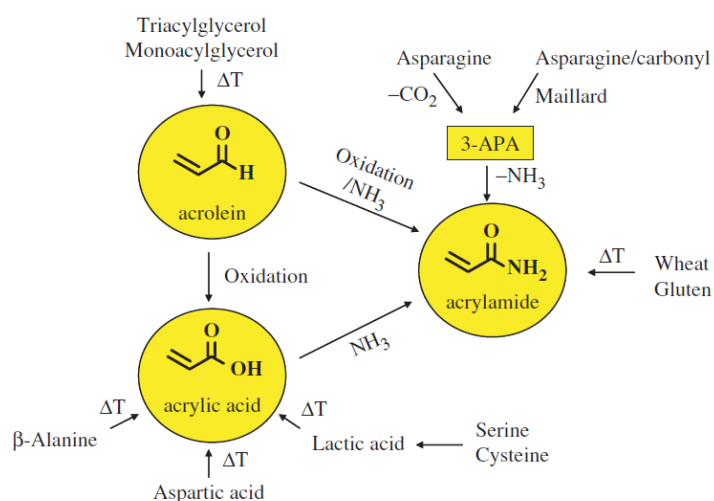
Bajo ciertas condiciones modelo, cantidades significativas de acrilamida fueron reportadas a partir de amoníaco y acroleína en ausencia de asparagina, una vía sugerida a desempeñar un papel en alimentos ricos en lípidos. La acroleína puede formarse por descomposición térmica de los triglicéridos presentes en el aceite de freír (Dybing, E, *et al.*, 2005, 368). Es responsable del olor desagradable de los vapores de las grasas sobrecalentadas (Lupano, 2013, 22).

La acroleína (2-propenal) es un aldehído que se puede desarrollar por diferentes rutas, incluyendo la degradación oxidativa de lípidos, de carbohidratos, aminoácidos y proteínas, y por medio de la reacción de Maillard. La formación de acrilamida, dependiendo de las condiciones de fritura (temperatura del aceite y grado de calidad), se pueden formar 5 - 250 mg de acroleína por kg de aceite. Tiene un punto de ebullición a 51 °C y se volatiliza fácilmente a altas temperaturas. Sin embargo, la acroleína cuando se oxida puede proporcionar ácido acrílico, que al reaccionar con amoníaco -liberado durante la termólisis de aminoácidos- vía amino-deshidroxilación produce acrilamida. (Stadler & Studer, 2016, 8-9).

Ahora bien, para el intermediario 3-APA se ha propuesto que se genera directamente a través de la descarboxilación de la asparagina, una ruta admisible en presencia de una enzima adecuada que acepta asparagina como sustrato y piridoxal fosfato como cofactor. Esta ruta es pertinente para explicar la formación de acrilamida en condiciones acuosas, con un tratamiento térmico durante un periodo de tiempo más largo y sometidos a secado a una temperatura relativamente baja (<120 °C) (Stadler & Studer, 2016, 10-11).

De otro lado, las reacciones pirolíticas que implican serina y cisteína, mediante la conversión de ácido pirúvico a ácido láctico, en la presencia de amoníaco y lactamida producen acrilamida en panes. En este estudio, la adición de gluten de trigo a un rollo de pan provocó un aumento del 20% de acrilamida. Los autores pueden demostrar que la acrilamida es liberada térmicamente por eliminación de una secuencia de aminoácidos definida en el péptido (Helmut, Anklam, Wenzl, & Stadler, 2007, 63). Rutas ilustradas en la figura 5.

Figura 5. Rutas alternas de formación de acrilamida.



Fuente (Helmut et al., 2007, 62).

En resumen, los autores Moreno, I M, Rubio C, *et al.*, 2007, 3 describen tres (3) mecanismos para la formarse la acrilamida:

1. Directa a partir de aminoácidos.
2. A través de acroleína o ácido acrílico que puede provenir de la degradación de lípidos, carbohidratos o aminoácidos libres.
3. Mediante la deshidratación/descarboxilación de ciertos ácidos orgánicos comunes incluyendo ácido málico y ácido láctico.

### **Metabolismo de la acrilamida en el organismo.**

El trabajo realizado por Romero, I (2016) permite acceder a una simulación sobre la variación del contenido de acrilamida tras la digestión gástrica en diferentes matrices, con el fin de observar los cambios experimentados por este compuesto durante el proceso digestivo, en cuanto a su absorción, pasa por la barrera intestinal y llegar al torrente sanguíneo, concluyó que el proceso de digestión puede alterar la cantidad de acrilamida biodisponible por la influencia de diferentes parámetros como: el pH ácido del estómago, el efecto del tiempo o la acción de la pepsina al favorecer la liberación de acrilamida, observando que la digestión gástrica incrementa significativamente los niveles de acrilamida respecto al alimento para todos los productos analizados (papitas a la francesa y tipo Chips, nuggets de pollo, aros de cebolla fritos, cereales de desayuno (de arroz, trigo y cebada), galletas dulces saladas, café soluble y sustituto de café a base de cereales ) a excepción del café soluble. 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 iniciales y finales (Romero I, Sansano M, Heredia AB, 2016, 5-6-14-17).

Shipp, A, Lawrence, G, *et al.*, 2006, 482 reportan que la absorción de la AA se puede inferir a partir de dos estudios realizados con voluntarios humanos; para el primero, se reunió dos grupos, a uno se les dio a beber agua que contenía AA en concentraciones de 0,5, 1 y 3 mg / kg y el otro recibió agua sin AA, si bien, no se realizó ninguna medición directa de la absorción, el 34 % de la dosis administrada se recuperó como metabolitos totales en la orina dentro de 24 h, dado que con la eliminación urinaria es medible la cantidad de AA. El segundo caso, se dirigió con otros

voluntarios, quienes recibieron una comida que contenía 0,94 mg de AA, los metabolitos urinarios se recogieron durante 72 h, el 60 % de la dosis administrada se recuperó en la orina.

Concluyeron que la distribución de AA que es absorbida por la ruta oral, rápidamente es distribuida en todo el cuerpo, metaboliza y excretada. Sin embargo, la tasa de absorción fue diferente según la especie (Shipp, A, *et al.*, 2006, 483).

Después de la ingestión, la acrilamida se absorbe y se distribuye en todo el cuerpo rápidamente. Se puede encontrar en muchos órganos, como el timo, el hígado, corazón, cerebro, riñones, así como en la placenta humana y la leche materna, siendo por lo tanto, fácilmente transferibles al feto o al recién nacidos (Capuano & Fogliano, 2011, 797).

A dosis bajas, el 50% de la acrilamida se metaboliza por el citocromo 2E1 (CYP2E1) mediante epoxidación a un metabolito reactivo del ADN, llamado 'glicidamida'. Sin embargo, esta conversión es saturable, a altas dosis sólo el 13% de la acrilamida se biotransforma en glicidamida. La glicidamida puede ser metabolizada por la epóxido hidrolasa y tanto la acrilamida como la glicidamida pueden sufrir conjugación con el glutatión (GSH). Los resultados de diferentes investigaciones respaldan el concepto que la acrilamida por sí misma no actúa como un agente genotóxico a los niveles de exposición que cabe esperar de la ingesta de alimentos. La formación metabólica de glicidamida es esencial para la eficacia genotóxica. Por lo tanto, el glicidimida actúa como el metabolito genotóxico último de la acrilamida y se descubrió que forma aductos de ADN (de N<sup>7</sup> de guanina o N<sup>3</sup> de adenina) e induce micronúcleos en diferentes órganos de ratones (Erkekoglu, P, Baydar, 2014, 49).

## **Efectos tóxicos y epidemiológicos.**

El Centro Internacional de Investigaciones sobre el Cáncer (IARC) ha clasificado la acrilamida el Grupo 2A como "probablemente carcinógena para los seres humanos"; además, el Comité Científico de Alimentación (SCF) de la Unión Europea (UE) lo ha calificado como carcinógeno genotóxico (CODEX ALIMENTARIUS, 2005, 2).

**Neurotoxicidad:** Su naturaleza hidrofílica sugiere la posibilidad de formación de aductos neurotóxicos con grupos nucleofílicos. La formación de aductos con grupos tioles puede ser la responsable de los efectos carcinogénicos y reproductivos de la acrilamida. En animales expuestos a dosis repetidas de acrilamida, se ha observado daño en los nervios periféricos (neuropatía periférica), los mecanismos por los que ejercería sus efectos neurotóxicos, son la inhibición del transporte quinésico axonal rápido, por fusión de las membranas afectadas y por tanto la inhibición de la neurotransmisión por acción directa sobre el nervio terminal (Moreno, I M, Rubio C, *et al.*, 2007, 2).

Afectando, tanto al sistema nervioso central (SNC) como al sistema nervioso periférico (SNP). La magnitud del efecto tóxico depende de la duración y de la dosis de exposición total. Sólo el monómero de acrilamida es tóxico mientras que los polímeros de acrilamida no son tóxicos (Erkekoglu, P, Baydar, 2014, 49).

**Carcinogenicidad:** Mediante los estudios experimentales con las ratas, se comprueba que es carcinogénica, se observan tumores en tiroides, testículos, glándulas adrenales y mamarias, endometrio y ovarios tras exposición a dosis relativamente bajas (2 mg / kg administrada en agua potable). También puede producir

tumores en cerebro, médula espinal y otros tejidos (Moreno, IM, Rubio C, *et al.*, 2007, 2).

Estudios epidemiológicos con trabajadores expuestos a la acrilamida no han demostrado riesgos excesivos de cáncer estadísticamente significativos, con la única excepción del cáncer de páncreas, para el cual se halló una duplicación del riesgo, existen otras investigaciones que relacionan cáncer de mamas (Murniece, I, Karklina, D, *et al.*, 2013, 318), endometrio, ovario y riñón (Palazoğlu, T K, Savran, D, 2010, 1).

### **Límite permitido del contenido de acrilamida en alimentos.**

En el 2015, luego de la reunión de los expertos de la EFSA (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria) establecieron las siguientes conclusiones:

Estimaron el rango de dosis dentro del cual es probable que la acrilamida produzca alguna incidencia de tumores (llamados efectos "neoplásicos") u otros efectos adversos potenciales (desarrollo neurológico, pre y posnatal y reproducción masculina). El límite inferior de este rango se denomina Límite de Confianza Inferior de la Dosis de Referencia (BMDL10) de 0,17 mg / Kg pc / día.

1 mg / Kg pc / día = miligramos por kilogramo de peso corporal por día.

Para otros efectos, los cambios neurológicos se consideraron los más relevantes con una BMDL10 de 0,43 mg / Kg pc / día.

Finalmente, mencionaron los porcentajes de exposición de alimentos que presentan alto contenido de acrilamida, según la edad de consumo de la población:

- Los adultos: papas fritas (incluyendo papas fritas, croquetas y papas asadas) representan hasta el 49% de la exposición media en adultos, con café

(34%) y pan blando (23%); otras fuentes dietéticas más importantes para adultos son: galletas, galletas y panes crujientes.

- Niños (primera infancia, niños y adolescentes): los productos fritos de papas representan hasta el 51% de toda la exposición dietética. Pan blando, cereales de desayuno, galletas y otros productos a base de cereales pueden contribuir hasta el 25%. Los alimentos procesados a partir de cereales representaron hasta un 14% de exposición para la primera infancia, pasteles y tortas hasta un 15% para los niños y adolescentes, y papas fritas y meriendas un 11% para adolescentes.

- Los lactantes: alimentos infantiles distintos de los elaborados a base de cereales, otros productos a base de papas, y alimentos elaborados a base de cereales para bebés (principalmente panes y galletas) contribuyen hasta un 60%, 48% y 30%, respectivamente (European Food Safety Authority., 2015, 1-4).

### **Determinación de acrilamida.**

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) fue la primera técnica analítica desarrollada, comprendía una etapa de derivatización incluyendo bromación de acrilamida; con el fin de obtener métodos rápidos donde la preparación de la muestra sea más ágil, ha sido eficiente utilizar la técnica cromatográfica líquida acoplada a espectrometría de masas masas (LC-MS / MS), a la cual se le atribuye un particular interés en el análisis de compuestos desarrollados en el pan y otros alimentos de alto consumo (Govaert, Y, Arisseto, A, *et al.*, 2006, 276).

### **Método QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe).**

Sus siglas traducen al español: rápido, fácil, barato, eficaz, resistente y seguro. Ofrece un amplio alcance analítico, alto grado de selectividad y sensibilidad, parámetros proporcionados por cromatografía de gases y líquidos (GC y LC) acoplados a espectrometría de masas (MS / MS) para su detección. (Lehotay et al., 2010, 2548 2549).

La unión de procedimientos (extracción y limpieza) demostró ser efectiva en diferentes grupos de compuestos del medio ambiente, matrices agroalimentarias y bioanalíticas. Los solventes utilizados para las extracciones son acetona, acetonitrilo (ACN) y acetato de etilo (EtOAc), presentando el ACN mayor capacidad para extraer analitos de amplia gama de polaridades y selectividad con respecto a los otros. En cuanto a la relación disolvente / muestra, se indicó que una proporción 1: 1 es suficiente y adecuada para lograr una extracción cuantitativa. Con respecto al uso de sales para inducir la separación de fases, la sal más estudiada es sulfato de magnesio ( $MgSO_4$ ) proporcionando la separación de fase líquido - líquido más completa y con facultad suficiencia para unir grandes cantidades de agua, como consecuencia de la reacción exotérmica de hidratación. Sin embargo, se produjo una separación de fase más integrada al añadir cloruro de sodio (NaCl) siendo la relación adecuada 4:1 provocando alta selectividad y efectividad para separar fases acuosas y orgánicas, generando mayores porcentajes de recuperación y baja coextracción de interferencias. (González MA, Socas B, Herrera AV, González J, Hernández J, 2015, 170).

Luego, se organizó el método para los compuestos que sufren ionización o degradación durante la extracción, dependiendo del pH de la matriz; por lo que la

versión original sin búfer evolucionó en dos métodos oficiales utilizando buffer de citrato Método EN 15662, desarrollado por Anastassiades y colaboradores o un buffer de acetato concentrado para dar una mayor fuerza de amortiguamiento AOAC Official Method 2007.01, investigado por Lehotay.

Otro aspecto optimizado, en lo que respecta a la limpieza d-SPE (técnica de extracción dispersiva en fase sólida), fue incluir el uso de diferentes cantidades de PSA<sup>a</sup> o C18<sup>b</sup> junto con PSA para obtener extractos más limpios. El uso de C18 es particularmente eficaz para aquellas muestras con un contenido de lípidos, así como GCB<sup>c</sup> para eliminar pigmentos coloreados de las matrices. Generalmente, los métodos QuEChERS desarrollados para el análisis de compuestos farmacéuticos han proporcionado porcentajes de recuperación de 70 - 120% excepto para ciertos analitos (González MA, Socas B, Herrera AV, González J, Hernández J, 2015, 171-175).

Sorbentes de eliminación:

<sup>a</sup> PSA (Primary and secondary amine exchange material): azúcares, ácidos grasos, ácidos orgánicos.

<sup>b</sup> C18: lípidos e interferencias no polares.

<sup>c</sup> GCB (graphitized carbon black): pigmentos, esteroides e interferencias no polares.

Dentro de las familias de compuestos que se han determinado utilizando QuEChERS como método de extracción son por ejemplo: lactonas macrocíclicas, lípidos, antioxidantes, aditivos alimentarios, hormonas, filtros UV y acrilamida, entre otros (González MA, Socas B, Herrera AV, González J, Hernández J, 2015, 180).

## **Separación cromatográfica de acrilamida.**

Las columnas Waters Atlantis C18 proporcionan el equilibrio óptimo de retención de compuestos polares y no polares en cromatografía de fase inversa, están diseñadas para garantizar compatibilidad LC / MS, formar picos superiores y obtener excelente reproducibilidad de columna a columna. Se usa este tipo de columna analítica para lograr una buena separación y elución de acrilamida porque permite suficiente retención para minimizar la interferencia de la matriz mientras se corre el tiempo de ciclo cromatográfico, por lo general de 10 minutos.

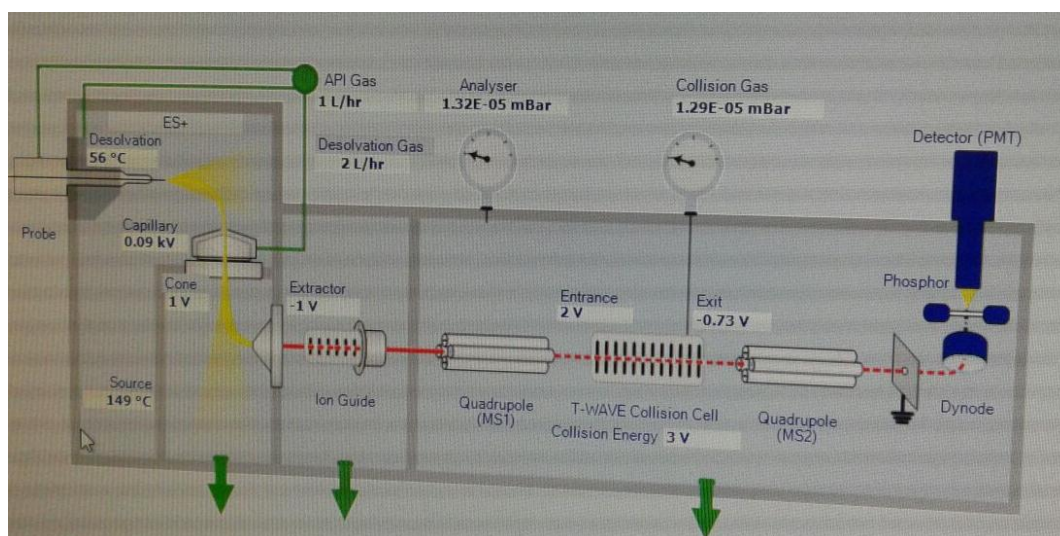
## **Detección de acrilamida.**

La detección de acrilamida después de la separación por LC se produce debido a la espectrometría de masas para hallar los iones característicos de la acrilamida. LC-MS / MS demuestra buena selectividad cuando se trabaja en modo MRM (monitoreo de reacciones múltiples) en el que se controla la transición de un ion precursor a un ion de producto. MRM significa que la transición de un ion precursor, se separa en el primer cuadrupolo, a un ion producto, generado por colisión con argón en el segundo cuadrupolo y se controla en el tercer cuadrupolo. En cuanto a la detección de monómero de acrilamida usando MRM, las muestras inyectadas entran en la fuente de ionización a presión atmosférica y estos iones se muestrean a través de una serie de orificios y óptica iónica en el primer cuadrupolo donde se filtran de acuerdo con la relación masa / carga ( $m / z$ ) de 72, figura 6.

La masa separa el ion  $[\text{CH}_2=\text{CHCONH}_2]^+$ , luego pasa a la celda de colisión del túnel de iones, con campo axial, donde se somete a una descomposición inducida por colisión (CID) o pasan sin obstáculos al segundo cuadrupolo. Los iones fragmentados

de acrilamida después de la colisión, es decir,  $[\text{CH}_2\text{CHC}=\text{O}]^+$  para  $m/z$  55 y  $[\text{CH}_2=\text{CHC}=\text{NH}]^+$  para  $m/z$  54, las masas son entonces analizadas en el segundo cuádrupolo. Por último, los iones seleccionados y transmitidos son detectados por el sistema de detección de dinodo de conversión, fósforo y fotomultiplicador. La señal de salida se amplifica, se digitaliza y se presenta en el programa de datos del equipo. La transición  $72>55$  siempre se selecciona para cuantificar la acrilamida, ya que es de abundancia relativa. Otras transiciones, tales como  $72>54$ ,  $72>44$  y  $72>27$ , se han utilizado en algunos casos para la confirmación de analito de acrilamida. La transición  $72>72$  también se ha observado con una intensidad pronunciada de aproximadamente 195% en comparación con  $72>55$ . Para la detección de la acrilamida marcada isotópicamente utilizada como patrón interno, las transiciones monitorizadas son  $75>58$  para  $[2\text{H}^3]$  y  $[13\text{C}^3]$  acrilamida como  $73>56$  para  $[13\text{C}^1]$  acrilamida (Zhang, Zhang, & Zhang, 2005, 14-15).

Figura 6. Esquema del funcionamiento del equipo HPLC.

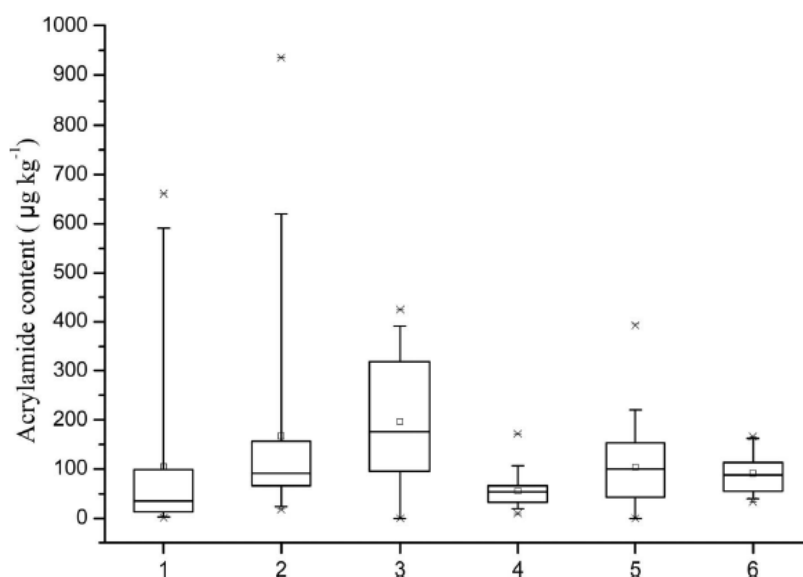


Fuente (Equipo Waters® Xevo® Triple Cuadrupole Detector (TQD) ACQUITY UPLC® Laboratorio de Trazabilidad, Corporación Universitaria Lasallista).

### Alimentos que presentan formación de acrilamida.

Los investigadores Zhuang, H, Zhang, T, *et al.*, 2012, 40, 41 demostraron que todos los procesos térmicos a los que son sometidos los alimentos forman acrilamida, con base en 22 productos agrupados según su métodos de procesamiento. En la figura 7 se reportan los siguientes resultados.

Figura 7. Contenido de acrilamida de acuerdo al tratamiento térmico. 1: comida seca; 2: comida frita; 3: extruidos (granos); 4: comida asada; 5: comida salteada; 6: comida tostada.



Fuente (Zhuang, H, Zhang, T, *et al.*, 2012, 40).

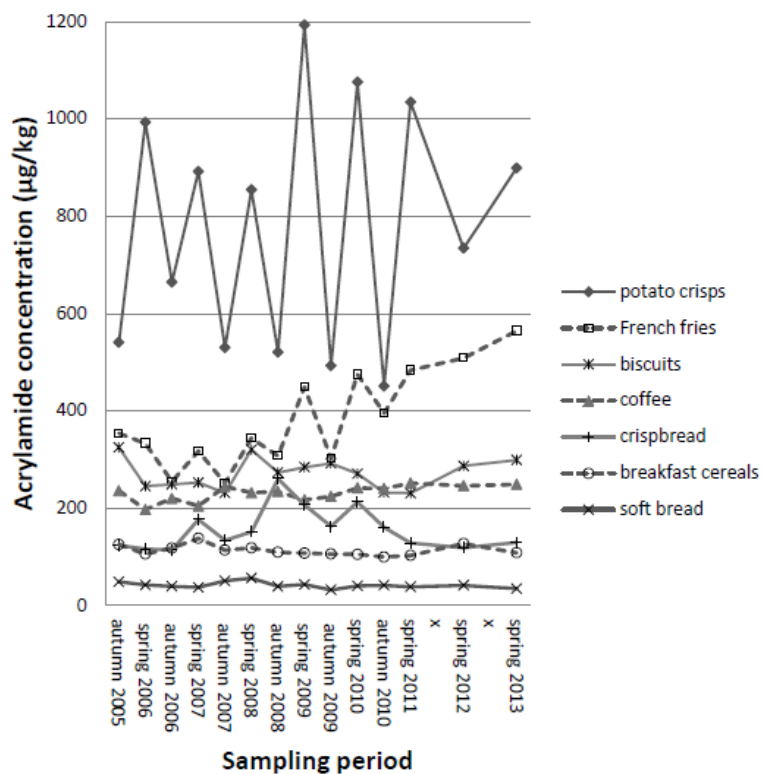
Los principales grupos de alimentos que por sus características presentan mayor formación de AA son: las papas fritas, las papas fritas (chips), el café, las

galletas, los pasteles, el pan y las roscas del pan tostado (CODEX ALIMENTARIUS, 2009, 2).

Las principales fuentes de acrilamida varían de acuerdo con la hábitos nacionales y regionales de alimentos, por ejemplo, papas fritas y relacionados se consumen en cantidades relativamente altas en los Estados Unidos 35 % de la ingesta media de acrilamida al día, mientras que el café y el pan contribuyen relativamente poco a la ingesta diaria promedio 7 % para el café, el 11 % para el pan. La contribución de los productos a partir de papas es aún mayor en los Países Bajos, con papas fritas y chips en conjunto contribuye hasta en un 50%. Por otra parte, la contribución de café y pan o galletas es mucho mayor en los países europeos (Dybing, E, *et al.*, 2005, 374).

Los resultados analíticos como seguimiento a diferentes matrices alimentarias se reportan en la figura 8, con las concentraciones permitidas de la formación de acrilamida.

Figura 8. Seguimiento a los niveles de acrilamida en alimentos del mercado sueco durante el período 2005-2013.



Fuente (Hellenäs, K, Fohgelberg, P, et al., 2013, 6).

El pan suave es el grupo que después de las papas fritas dieron lugar a la mayoría de los resultados sobre el valor indicativo, el 18%. Muestreo centrado en aquellos tipos: pan integral y pan de centeno (Hellenäs, K, Fohgelberg, P, *et al.*, 2013, 15).

Tabla 6. Concentraciones de acrilamida medidas en Alimentos en Europa de 2007 a 2012 (EFSA 2015a, b) y los niveles indicativos fijados por Comisión Europea (Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria 2011).

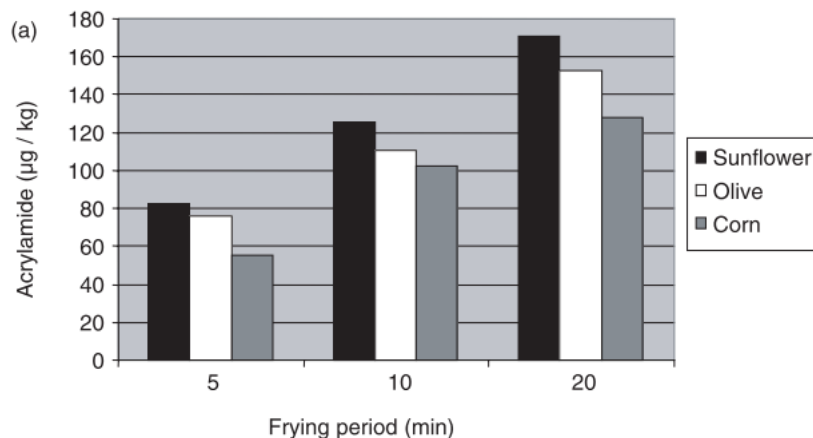
Acrylamide levels ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )											Indicative levels ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	
Food type	Mean					Max					2011	2013
	2007	2008	2009	2010/2011	2012	2007	2008	2009	2010/2011	2012		
<i>Biscuits</i>												
Crackers	291–292	203–206	195–208	275	333	1526	1042	1320	473	1062	500	500
Infant	197–204	98–110	88–108	110	86	2300	1200	430	598	470	250	200
Unspecified	299–303	213–223	128–140	625	289	4200	1940	2640	1574	5849		500
Wafers	206–210	251–254	244–246	154	389	1378	2353	725	154	1300		500
<i>Bread</i>												
Bread crisp	221–226	229–231	219–223	197	249	2430	1538	860	326	1863	150	450
Bread soft	54–68	31–46	27–37	15	30	910	528	364	37	425		80
Unspecified	172–190	45–231	54–76	14		2565	86	1460	51			150
Breakfast cereals	130–150	140–156	132–142	149	138	1600	2072	1435	325	1290	400	200–400
Baby food	48–69	35–51	55–70	18	51	353	660	710	68	578	100	50

Bold values are the indicative levels recognized by the EU Commission.

Fuente (Curtis T, 2016, 155).

Variaciones sobre el contenido de acrilamida en productos de panadería (tabla 6) pueden atribuirse a las diferencias en cualquiera de los ingredientes, agentes de fermentación, el pH antes de hornear la masa de los productos o la intensidad del tratamiento de calor (Govaert, Y, Arisseto, A, *et al.*, 2007, 240). A medida que el pH aumenta a 4 a 8, el contenido de acrilamida incrementa con un aumento del tiempo de tratamiento (Yuan, Y, Chen, F, *et al.*, 2007, C214). La acrilamida no se produce a través de un mecanismo de aceite tal como la oxidación de lípidos. Sin embargo, el aceite es un factor importante para la formación de acrilamida, el tipo de medio de fritura puede afectar a la transferencia de calor entre el aceite y la matriz del alimento, figura 9 (Ozkaynak, E, 2009, 796).

Figura 9. Formación de acrilamida vs tipo de aceite utilizado en pasteles de carne con vegetales.



Fuente (Ozkaynak, E, 2009, 796).

La formación de AA también se desarrolla en el procesamiento de los alimentos en las cocinas de hogares familiares y sitios similares (Carrieri, G, De Bonis, M V, *et al.*, 2009, 90, 97).

El pan contiene niveles relativamente bajos de acrilamida, pero debido a su frecuente consumo es un contribuyente principal a la ingesta total. Es importante tener en cuenta que algunos panes se consumen como tostadas y los niveles de acrilamida en el producto antes de tostar son mucho más bajos en comparación con los niveles en el pan tostado. Por ejemplo, Granby *et al.* informó que niveles de  $<5 \mu\text{g} / \text{kg}$  en una rebanada de pan blando aumentaron a 11-161  $\mu\text{g} / \text{kg}$  en una rebanada de pan tostada dependiendo de la coloración. Esto pone en evidencia situaciones de cómo se cocinan los alimentos en el hogar y la necesidad de educar a los consumidores sobre las maneras de reducir la formación de acrilamida (Curtis T, 2016, 156).

En Colombia, se encuentra publicado un artículo del 2015, el cual reporta las cantidades de acrilamida formadas tanto para productos comerciales, como para alimentos tradicionales del país, la preparación de la muestra se basó en el método QuEChERS y para la detección de AA utilizaron la cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC / MS).

Las muestras convencionales (n=112) fueron: fórmulas en polvo infantil, polvos de café y chocolate, snacks de maíz, productos de panadería y alimentos a base de tubérculos, carne y vegetales. Y para los tradicionales (n=43) incluyeron: plátano maduro, habas fritas, yuca frita o precocida, mojarra frita, chicharrones, buñuelos y empanadas, arepa, y arequipe.

Entre los alimentos convencionales probados, figura 10, el valor más alto de AA se encontró en productos de panadería, como galletas con valores entre 1449  $\mu\text{g} / \text{kg}$  a 1104  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . En el grupo de los alimentos tradicionales figura 11 se detectaron mayores cantidades de AA en plátano frito 1330  $\mu\text{g} / \text{kg}$ ; se resalta una cantidad no despreciable de AA para el arequipe con 1032  $\mu\text{g} / \text{kg}$ , mientras que en el grupo de productos a base de carne y la arepa los valores de esta sustancia estuvieron por debajo del LC -límite de cuantificación- (Pacetti et al., 2015, 2-5).

Figura 10. Niveles de acrilamida en alimentos convencionales colombianos.

Food group	Mean value	Median	Range	n
Infant powdered formula	1019	1493	<LOQ–1821	9
Coffee (roasted powder)	960	1106	<LOQ–3797	9
<b>BAKERY PRODUCTS</b>				
Wafer	1449	1356	687–2497	4
Biscuits	1104	517	<LOQ–3180	14
Crackers	758	843	194–1271	5
Breakfast cereals (wheat, oat, rice and com flakes)	726	734	<LOQ–2288	14
Soft bread (white)	231	170	102–594	5
Toasted bread	<LOD	<LOD	<LOQ	5
Crisp bread	<LOD	<LOD	<LOQ	5
<b>POTATO</b>				
Chips	916	1044	82–1852	5
French fries (home-made)	<LOD	<LOD	<LOQ–12,626	5
French fries (fast food rest)	<LOD	<LOD	<LOQ–661	5
Fried creole	143	175	83–209	4
Chocolate powder	489	408	<LOQ–1017	6
<b>CORN SNACKS</b>				
Pop corn	452	268	<LOQ–781	5
Corn chips, com nut	253	327	78–441	9
<b>MEAT</b>				
Hamburger	<LOD	<LOD	<LOQ	3

Fuente (Pacetti et al., 2015, 3).

Figura 11. Niveles de acrilamida en alimentos tradicionales colombianos.

Food group	Mean value	Median	Range	n
<b>VEGETABLE PRODUCTS</b>				
Fried platano <sup>a</sup> (maduro, tostone)	1330	821	<LOQ–2813	10
Fried habas <sup>b</sup>	<LOD	<LOD	<LOQ–336	6
<b>TUBER-BASED PRODUCTS</b>				
Yuca <sup>c</sup> (fried and precooked)	952	219	<LOQ–3755	9
<b>DESSERT</b>				
Arequipe <sup>d</sup>	1032		<LOQ–1809	3
<b>BAKERY PRODUCTS</b>				
Arepa <sup>e</sup>	<LOD		<LOQ	3
<b>MEAT</b>				
Fried mojarra <sup>f</sup> (fish)	<LOD		<LOQ	3
Chicharrones <sup>g</sup>	<LOD		<LOQ	3
Buñuelos <sup>h</sup>	<LOD		<LOQ	3
Empanadas <sup>i</sup>	<LOD		<LOQ	3

Fuente (Pacetti et al., 2015, 6).

### Mitigación de acrilamida en los procesos.

Diferentes autores se basan en la adición de aminoácidos, antioxidantes, sales, ácidos, entre otros compuestos que demuestran buenos resultados para matrices en panadería, dentro de los cuales se destacan:

La glicina en pan, fue aplicada a la masa antes de la fermentación, se logró la reducción de acrilamida entre un 80 % y 90 %; otro proceso fue rociando la superficie de la masa con una solución de glicina al 10 % antes de la cocción, pero se obtuvo una ligera reducción en la formación de acrilamida (Capuano, E, Ferrigno, A, *et al.*, 2009,

1295); (Napolitano, A, Morales, F, *et al.*, 2008, 2034).

El ácido ferúlico y ácido ascórbico a los sistemas de trigo modelo / agua, se le atribuyó a su capacidad de reaccionar con los precursores de acrilamida o intermedios en el proceso químico de su generación (Capuano, E, Ferrigno, A, *et al.*, 2009, 1296); (Napolitano, A, Morales, F, *et al.*, 2008, 2035).

El cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2$ , bisulfito sódico  $\text{NaHSO}_3$  y L-cisteína, obtuvieron resultados positivos para la inhibición de la formación de acrilamida de la siguiente manera: L-cisteína mayor capacidad inhibitoria que  $\text{CaCl}_2$  y ésta a su vez con mayor efecto que el  $\text{NaHSO}_3$ . El mecanismo de la inhibición de acrilamida para el calcio puede ser debido a su complejación con aminas y algunos compuestos intermedios de la reacción de Maillard productos de ácido acrílico especialmente (Das, AB, Srivastav, P, 2012, 68).

Antioxidantes como las hojas de bambú (AOB) y del té verde fueron reportados por Zhang, H, Zhang, T, en 2007 en palitos fritos. La planta aromática de romero en el aceite usado y para freír varias matrices. Cabe señalar, que este resultado no pudo ser confirmado por otros autores (Napolitano, A, Morales, F, *et al.*, 2008, 2035).

Otras propuestas recomiendan el uso de los antioxidantes sintéticos como: Terbutil Hidroquinona (TBHQ), Butil Hidroxianisol (BHA), Butil hidroxitolueno (BHT), (Li, D, Chen, Y, *et al.*, 2012, C1144, 45, 47).

La reducción más prometedora que se ha aplicado, es mediante el uso de la enzima asparaginasa para eliminar selectivamente la asparagina antes del calentamiento. Es usada en tratamientos previos y produjo una reducción de la asparagina en 88 % y una reducción de acrilamida de más de 99 % (Das, AB, Srivastav, P, 2012, 68).

Como se aprecia, se han desarrollado algunos estudios en matrices de panificación, por lo general, en panes blancos, galletas saladas y dulces; no existe algún artículo publicado que relacione las donas con los aditivos reductores seleccionados en este trabajo, a pesar de ello, en uno se investigó la influencia de los antioxidantes del té verde y café verde a tres concentraciones sobre la formación de acrilamida en donas. Obtuvieron cantidades relativamente bajas de acrilamida, que ascienden entre 18 - 46  $\mu\text{g} / \text{kg}$ . Sólo la adición más baja del extracto de té y la más alta del extracto de café verde causaron un aumento del contenido de acrilamida, mientras que los otros niveles de los extractos añadidos causaron disminución (Grażyna B & Nebesny E, Oracz J, 2013, 150, 152, 157).

### **Asparaginasa**

La asparaginasa (L-asparagina amidohidrolasa, EC 3.5.1.1) cataliza la hidrólisis del grupo amida de la cadena lateral de asparagina que produce ácido aspártico y amonio (Hendriksen HV, Kornbrust B, 2010, 4169).

Es una enzima intracelular que se obtiene de microorganismos, organismos genéticamente modificados (OGM) o de materiales vegetales. Las cepas de *Aspergillus oryzae* y *Aspergillus niger* tienen alta especificidad y por lo tanto una actividad mínima hacia la glutamina y otros aminoácidos. En última instancia, estas enzimas se desactivarán durante el proceso de calentamiento, asegurando su aplicación en los alimentos, en tal sentido es clasificada como "generalmente reconocido como seguro" por JECFA (El Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Aditivos Alimentarios) 2007. Dado que las diferentes dosis de asparaginasa se han

utilizado en diversos alimentos, no existe un estándar unificado para la dosis máxima (Xu F, Elmore J, 2016, 166).

Las patentes relacionadas con el uso de asparaginasa han sido presentadas por varias compañías por ejemplo, Frito Lay, Procter & Gamble, DSM, Novozymes (Hendriksen, Kornbrust, Østergaard, & Stringer, 2009, 1533).

Para identificar el uso efectivo de la asparaginasa han demostrado simulaciones en modelos químicos simples que sólo contienen asparagina y azúcares reductores o harina, y como tal en productos alimenticios.

Acrylaway® es la marca comercial de asparaginasa de Novozymes, Dinamarca, producida por *Aspergillus oryzae* (OGM) con una actividad enzimática de 3500 ASNU / g. Una ASNU es la cantidad de enzima que produce 1  $\mu\text{mol}$  de amoníaco por minuto a 37 ° C, pH 7 (Hendriksen HV, Kornbrust B, 2010, 78), de otro lado, se encontró que es más activa a temperaturas hasta 60 °C. Además, está influenciada por el contacto con el sustrato, que a su vez puede verse afectado por la composición y estructura de la matriz alimenticia.

La temperatura del proceso, el contenido de agua, el tiempo de incubación, el punto de adición de la enzima, la formulación y el contenido libre de asparagina son otros factores principales que inciden en la mitigación de la acrilamida (Hendriksen HV, Kornbrust B, 2010, 84-85).

Los ensayos en escala piloto mostraron que la asparaginasa añadida directamente a la masa durante la producción era eficaz para reducir los niveles de acrilamida en un producto frito. A una dosis enzimática de 1750 ASNU / g d.m., redujo un 80% y sugieren que, al aumentar la dosificación enzimática, mejora el efecto. La

incubación puede ser a temperatura ambiente y al pH de la masa, haciendo uso del tiempo de reposo de la masa estándar o tiempo de fermentación para la actividad enzimática (Hendriksen HV, Kornbrust B, 2010, 82).

Las propiedades sensoriales (sabor, suavidad, flexibilidad, porosidad) tienden a alterarse, de tal manera que causan inaceptabilidad por parte de los consumidores. Por esta razón, se recomienda que la adición de enzima sea en una dosis tan baja como sea posible para lograr un efecto deseable sobre la reducción de acrilamida sin ninguna consecuencia sobre las propiedades sensoriales y nutricionales del producto final (Ciesarova Z, Kukurova K, Bednarikova A, Markova L, 2010, 90).

### **Antioxidantes**

Los polifenoles son compuestos naturales que se encuentran en gran parte en las frutas, verduras, hierbas, especias y granos. Hasta ahora se han encontrado más de 8.000 estructuras fenólicas. Estas se dividen en varios grupos, por ejemplo, flavonoides, ácidos fenólicos, ácidos hidroxicinámicos así como flavonas. Recientemente, algunos extractos de plantas que contienen altos porcentajes de polifenoles se clasificaron como aditivos alimentarios al considerarse aptos al consumo humano en comparación con los antioxidantes sintéticos.

Los flavonoides representan el grupo más abundante distribuidos en subclases, incluyendo flavonoles, flavanonas, chalconas, flavandioles, antocianinas y los taninos. Con las investigaciones de la epicatequina y la naringenina – redujo hasta un 50% en el sistema modelo asparagina / glucosa calentado a 128 °C de 60 a 180 minutos -. se demostró que el tipo de o-difenoles podría ser eficaz para reducir la formación de acrilamida (Liu et al., 2015, 46-50).

Para aproximarse al efecto entre los antioxidantes y la disminución de la formación de acrilamida se aplicaron 35 variedades de extractos crudos acuosos de plantas y 11 ácidos fenólicos para mitigar la acrilamida en un sistema modelo de asparagina-glucosa (ASN-GLC), encontrando que 34 de 35 extractos de plantas y 9 ácidos fenólicos excepto ácido ferúlico y hesperetina inhibieron la formación de acrilamida (Jin, Wu, & Zhang, 2013, 162).

De acuerdo con Zhang & Cheng, los flavonoides, los ácidos fenólicos y los polifenoles, y los taninos inhiben la formación de acrilamida, de manera que los sitios de acción para los anteriormente señalados son: se produce en las reacciones intermedias de Maillard alterando la vía de formación, impide que los lípidos se oxiden y en la precipitación de la asparagina, respectivamente (Zhang & Cheng, 2016, 342-345).

Aún no se ha establecido la última palabra referente a los efectos de los antioxidantes en la formación o reducción de acrilamida, como los mecanismos.

### **Ácido Cítrico**

En productos de panadería, la acidez minimiza el contenido de acrilamida, mediante la reducción del pH, la protonación del grupo  $\alpha$ -amino de la asparagina dificulta la formación de la glicosilamina. En un trabajo de investigación reportan la adición de 0,5 y 1,0 g de ácido cítrico / 100 g de masa en un pan jengibre, el pH alcanzado fue 5,6 y 5,0, y una reducción de la concentración de acrilamida por factores 4 y 40, respectivamente, para ambas variables (Mesias & Morales, 2016, 144).

Otras referencias sugieren el reemplazo del bicarbonato de amonio con otros agentes elevadores como ácidos orgánicos (cítrico y tartárico). Sin embargo, se debe tener en cuenta el impacto potencialmente negativo sobre las propiedades sensoriales y calidad general del producto, tales como sabor, textura, bajo desarrollo de color, lo que conduce a una menor aceptación por parte del consumidor. Los cambios incluso afectan a la tecnología del proceso, por ejemplo, reduce las propiedades de fermentación de la levadura en el pan (Kukurová, Morales, & Bednáriková, A, Ciesarová, 2009, 1532).

Cabe señalar, que en un sistema modelo, cuando el pH está alrededor de 8, el contenido de acrilamida se alcanza en una cantidad máxima que a su vez está cerca del valor de pKa de la asparagina produciendo un aumento en las etapas iniciales de la formación de acrilamida, donde al reducir el pH con compuestos como el ácido cítrico conduce a la disminución de esta (Xu F, Elmore J, 2016, 165).

## Metodología

Las actividades planteadas para la ejecución del proyecto se desarrollaron según los objetivos específicos propuestos:

### Estandarización la formulación de las donas

Se elaboraron donas con un peso promedio en crudo de 27 g y un peso final, después de la fritura, de 36 g, quedando dentro del rango sugerido (35 g a 50 g) (AIB International, 2015, 13). La fritura se realizó en un equipo Haceb XJ-6K116 con una capacidad de un 1, 2 L. En la tabla 7 se relacionan los porcentajes de los ingredientes finales con su respectiva marca comercial para la producción de las donas.

Tabla 7. Formulación de la dona para 1000 g de harina.

Ingrediente	Conversión a % panadero	
	%	Cantidad (g)
Harina Haz de Oros, Harinera del Valle S.A.	100	1000
Agua	55	550
Grasa (Shortening) G36 LECITINA, Team® Foods.	10	100
Azúcar blanco especial, Riopaila Castilla S.A.	6	60
Leche en polvo Entera, Colanta®.	2	20
Levadura seca instantánea, Safmex S.A. – Lesaffre Colombia Ltda.	1,6	16

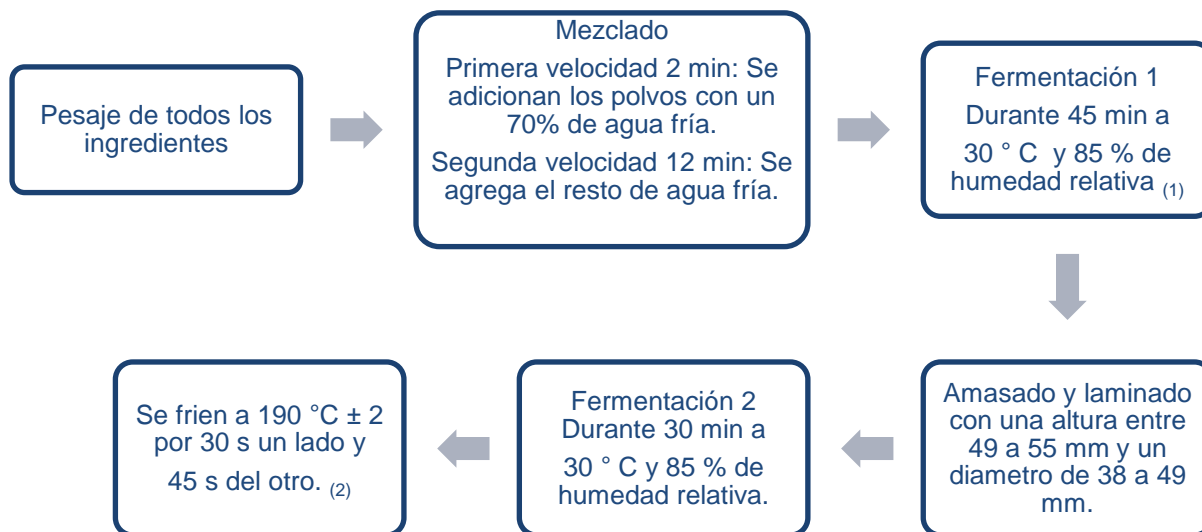
Ingrediente	Conversión a % panadero	
	%	Cantidad (g)
Huevo en polvo, Avícola Nacional S.A. – Avinal.	1,5	15
Mejorador de textura, Tecnas S.A.	1,5	15
Sal, Refrisal®.	1	10
Polvo para hornear, Carolesen, Colorisa S.A.S	0,2	2

A nivel industrial se manejan las formulaciones en porcentaje panadero, según la siguiente relación: (Hendriksen et al., 2009, 4169), tal como se muestra en la tabla anterior.

$$\%panadero = \frac{ingrediente}{harina} * 100 \quad (1)$$

Luego de varios ensayos preliminares, se estableció el proceso de elaboración de las donas, teniendo en cuenta las pruebas con los aditivos reductores del segundo objetivo para asegurar las mismas condiciones de producción, en la figura 12 se describe dicho procedimiento.

Figura 12. Diagrama de las etapas de elaboración de las donas.



(1) Se fijó esta duración, debido a que en el momento de utilizar el ácido cítrico no se producía gluten a un tiempo inferior y a partir de este se formó satisfactoriamente.

(2) El aceite seleccionado fue sólido vegetal marca Búcaro distribuido por C.I. Saceites S.A.S., al contener la mezcla de aceites recomendada en la literatura (aceite refinado de palma y estearina refinada de palma, colorante natural (betacaroteno), antioxidante (TBHQ) = 120 ppm (mg/kg)). Se verificó que cumpliera con los parámetros de calidad exigidos en la Resolución 2154 de 2012: “Reglamento técnico sobre los requisitos sanitarios que deben cumplir los aceites y grasas de origen vegetal o animal que se procesen, envasen, almacenen, transporten, exporten, importen y/o comercialicen en el país, destinados para el consumo humano y se dictan otras disposiciones”. Para el porcentaje de acidez como ácido palmítico, de humedad, de impurezas insolubles; índice de refracción, de peróxidos, de yodo y punto de humo.

Cabe mencionar, que el aceite se filtró en una malla acero inoxidable 325 Mesh, en caliente en cada cambio de formulación, con el objetivo de minimizar impurezas u oxidaciones.

**Objetivo 1: Estandarizar el método analítico para la cuantificación cromatográfica de acrilamida en productos fritos (donas).**

**Determinación del método de extracción**

La extracción y limpieza de acrilamida en las donas se realizó aplicando el método QuEChERS marca RESTEK Q-sep™ (Al-Taher, 2012, 3).

Como punto de partida se sometió el material de referencia ERM® -BD272 “Acrylamide in Crispbread” de concentración  $0.98 \pm 0,09$  mg / kg, la cual fue certificada por 15 laboratorios aplicando diferentes metodologías de cuantificación, de acuerdo al certificado de análisis.

El proceso de extracción comenzó pesando un gramo de la muestra para llevar a 42 combinaciones aleatorias entre sales de extracción y dispersivas de limpieza, QuEChERS 1 y 2, respectivamente descritas en la tabla 8.

Tabla 8. Listado de sales de extracción y limpieza.

<b>QuEChERS 1 (sal de extracción)</b>	
A	Método oficial AOAC 2007.01 (6 g MgSO <sub>4</sub> + 1,5 g NaOAc)
E	Método Europeo EN 15662 (4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl + 0,5 g Sesquihidrato de hidrogencitrato disódico)
0	Método original sin buffer (4 g MgSO <sub>4</sub> + 1 g NaCl)
<b>QuEChERS 2 (dispersiva de limpieza)</b>	
1	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA <sup>a</sup>

2	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA + 25 mg C18 <sup>b</sup>
3	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA + 2,5 GCB <sup>c</sup>
4	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA + 50 mg GCB
5	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA + 50 mg C18 + 7.5 mg GCB
6	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 25 mg PSA + 7.5 mg GCB
7	150 mg MgSO <sub>4</sub> + 50 mg PSA

La selección del método de extracción (sales de extracción y dispersivas de limpieza) fue determinado por la exactitud o mayor porcentaje de recuperación de acrilamida para el material de referencia, las cuales fueron empleadas posteriormente para las pruebas con las diferentes formulaciones de donas.

La cuantificación de acrilamida en el material de referencia se llevó a cabo mediante una curva con el patrón interno de acrilamida -marca Dr. Ehrenstofer GmbH al 99% - en acetonitrilo (ACN) marca Merck a diferentes concentraciones (0,02; 0,03; 0,05; 0,1; 0,15; 0,3; 1; 5 y 10) ppm, como se describe a continuación.

### **Exactitud**

La ecuación empleada para determinar el porcentaje de recuperación se describe a continuación:

$$\% \text{ de Recuperación} = \frac{\text{Concentración encontrada}}{\text{Concentración adicionada}} * 100 \quad (2)$$

Para alcanzar los porcentajes mínimos de recuperación 65 % y 70 % de componentes en bajas concentraciones en productos de panificación (Crews, 2016,

468), se procedió a evaluar condiciones para aumentar el porcentaje de extracción de acrilamida; consistió en incluir la extracción asistida por ultrasonido después del primer vortex o después de centrifugar, con y sin NaCl a 2  $\mu$ L y a 5  $\mu$ L de volumen de inyección para las cuatro combinaciones.

### **Extracción de acrilamida en las diferentes formulaciones de las donas**

El primer paso fue el desengrasado de las donas, la muestra se acondicionó a una humedad inferior al 10 % en una estufa convencional Memmert UN55 a 105 °C durante 2,5 horas. 2 gramos de la muestra fue llevada a un tubo Falcon de 50 mL previamente pesado, se adicionó 10 mL de hexano y se agitó en un vortex por 30 s a 4000 rpm, luego pasó al ultrasonido SB modelo 300 DTY, durante 15 min a 25 °C, una potencia de 99% a 25 kHz. Se repitió la agitación en vortex antes de centrifugar en el equipo HERMLE Labortechnik GmbH Z326K por 15 min a 4 °C a 4000 rpm. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se evaporó el hexano por medio de una corriente de N<sub>2</sub>. El material desengrasado se almacenó en un desecador antes del análisis.

El procedimiento anterior, se repitió tres veces hasta asegurar que la diferencia en peso entre cada extracción no haya superado 1 mg y sea cercano al valor de referencia de extracto etéreo obtenido previamente por Soxhlet para la formulación estudiada.

El segundo paso fue el proceso de extracción, en un tubo Falcon con un gramo de la muestra desengrasada se añadió 10 mL de agua Tipo I (Purelab ULTRA ELGA), 10 mL de ACN y el contenido de la sal QuEChERS seleccionada del paso anterior con el material de referencia. La mezcla fue agitada en un vortex por 3 min a 3000 rpm,

luego se procedió a llevarla a ultrasonido durante 5 min a 25 °C, una potencia de 99% a 25 kHz y a centrifugación a 4000 rpm a 4 °C por 20 min. Se tomó una alícuota de 1 mL de la fase de ACN en la cual queda retenida la acrilamida y se mezcló con las sales correspondientes a la dispersiva seleccionada. La mezcla fue agitada durante 1 min en vortex a 3000 rpm y se centrifugó en el equipo Mikro 120 Hettich a 5000 rpm por 3 min. Finalmente, el sobrenadante se filtró (0.22 µm) y se transfirió al vial con inserto para su análisis por UPLC/MS/MS.

### **Identificación y cuantificación de la acrilamida.**

Se utilizó un equipo Waters® Xevo® Triple Cuadrupole Detector (TQD) ACQUITY UPLC® System con una interfase Electro-spray (ESI). La columna empleada fue una CSH marca ACQUITY UPLC CSH™ C18 1,7 µm (2,1 x100 mm).

La fase móvil fue agua tipo I al 0.1 % de ácido fórmico marca Merck y ACN en una relación 95:5 de manera isocrática por 5 min a un flujo de 0.3 mL/min. La temperatura de la columna y de la muestra permaneció a 40 °C y 10 °C, respectivamente. El volumen de inyección en el equipo fue de 5 µL.

Las condiciones usadas en la interfase de ionización fueron: temperatura de desolvatación 200 °C, el gas de nebulización fue nitrógeno N<sub>2</sub> a un flujo de 650 L/h y con un voltaje del capilar de 3 Kv.

Las condiciones de la espectrometría de masa se describen en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones del método masas para la acrilamida.

<b>ión precursor (m/z)</b>	<b>ión Producto</b>	<b>Cono (v)</b>	<b>Energía de colisión</b>
71.7498	43.8367	22	12
71.7498	54.8488	22	10



Para la cuantificación se elaboró una curva con el patrón interno de acrilamida y en matriz a diferentes concentraciones (0,01; 0,02; 0,05; 0,1; 0,2 y 0,5) ppm. Se calcula la recuperación a un nivel de concentración; el efecto matriz, se probó en solvente y en el extracto a 5 niveles cada uno por triplicado y posteriormente, la linealidad y límite de detección y cuantificación.

### **Efecto matriz**

El efecto matriz se calculó con las pendientes obtenidas de la curva de calibración con el patrón interno preparado en solvente (ACN) y de la fase acuosa obtenida durante la extracción con QuEChERS 1 y se aplica la siguiente ecuación:

$$\text{Efecto matriz} = \frac{\text{pendiente de la ecn ste} - \text{pendiente de la ecn extracto}}{\text{pendiente de la ecn ste}} \quad (3)$$

En caso de obtener valores inferiores a 15 %, la cuantificación de las muestras debe ser realizada usando la matriz como solvente para la preparación de la curva.

### **Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)**

Los LD y LC fueron calculados de acuerdo al método basado en la desviación estándar de la respuesta y la pendiente de la recta de calibrado (Ribani, Collins, & Bottoli, 2007, 201 - 202).

$$LD = 3,3 * S/m \quad (4)$$

$$LC = 10 * S/m \quad (5)$$

Dónde:

(S) Desviación estándar

(<sup>m</sup>) Pendiente de la curva del extracto

**Objetivo 2: Reformular la matriz de panificación con el uso de extractos o aditivos para la reducción en la formación de acrilamida.**

### **Determinación de la acrilamida.**

1. Los tres aditivos reductores seleccionados fueron la enzima asparaginasa de Novozymes®, Acrylaway®, como antioxidante un mix de frutos amarillos Nativanox® de TECNAS S.A., y como aditivo sintético fue el ácido cítrico comprado en la empresa mencionada anteriormente.

2. El proceso de elaboración fue el mismo descrito en la figura 12, realizado por triplicado para cada formulación y con la adición de su respectivo aditivo reductor: 430 ppm para la enzima, según ficha comercial y técnica, 1 g tanto para el antioxidante como para el ácido cítrico, a razón de conservar la misma proporción entre ellos, siendo lo mínimo de antioxidante por agregar, de acuerdo a la asesoría técnica.

Se aplicó un diseño unifactorial para la cuantificación e identificación de la acrilamida:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

$y$  = Contenido de acrilamida

$\mu$  = Constante

$\tau$  = Aditivo

$i = 1, 2, 3$ , cantidad de acuerdo a ficha técnica y estudios relacionados

$\varepsilon$  = Error

3. Los análisis bromatológicos, sensoriales y de textura se realizaron en las donas fritas. Con la caracterización bromatológica para la dona patrón se pretendió tener los parámetros básicos como referencia de trabajo. Las pruebas de textura y el análisis sensorial fueron aplicados tanto en la muestra patrón como en las donas con los diferentes aditivos reductores. Los métodos basados en las normas AOAC o NTC se describen a continuación:

### **Caracterización bromatológica.**

Una vez las muestras estaban a temperatura ambiente, se les disminuyó el tamaño de partícula en un procesador de alimentos y se secaron a  $105 \pm 2$  °C durante 3 horas para garantizar que estuviesen totalmente libre de humedad o por debajo del 10 %.

**Determinación del contenido etéreo:** se llevó a cabo por método Soxhlet un equipo Velp Scientific SER 148, a partir de 2 a 3 g de muestra seca y 90 mL de hexano a 130 °C por 4 h y el procedimiento se repitió dos veces. El porcentaje de extracto etéreo se determinó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\%Extracto\ etéreo = \frac{P_1 - P_0}{P_2} \times 100 \quad (6)$$

Dónde:

Peso de vaso extractor vacío,  $P_0$

Peso de muestra,  $P_1$

Peso de vaso extractor con extracto etéreo,  $P_2$

**Determinación del contenido de fibra cruda:** el método consistió en la digestión en un equipo VELP Serie Fiwe de la materia orgánica en presencia de ácido

sulfúrico e hidróxido de sodio (1,25 N), con posteriores lavados con acetona fría y agua, así como el contenido mineral por un calentamiento en mufla a 550 °C por 3 h.

El contenido de fibra cruda total se determinó por la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de fibra cruda} = \frac{F_2 - F_1}{F_0} \times 100 \quad (7)$$

Dónde:

Peso de la muestra (g), F0

Peso de crisol con muestra seca (fibra cruda + cenizas) (g), F1

Peso del crisol con la muestra calcinada (cenizas) (g), F2

#### **Determinación del contenido de nitrógeno total y proteína por Kjendahl:**

Método Kjeldahl, se emplea un equipo Digestor de nitrógeno Velp Scientific modelo DK 20.

El cálculo se realizó teniendo en cuenta el peso de un miliequivalente de nitrógeno multiplicado por la diferencia entre los mL gastados del ácido valorante y un blanco de reactivos. Todo esto sobre el peso inicial de la muestra húmeda y multiplicada por 100. Este resultado (nitrógeno total) es multiplicado por un factor establecido para cada tipo de alimento y así se determina el porcentaje de proteína total en base húmeda para la muestra.

$$\%N = \frac{(14 \text{ mg/meq}) \cdot (V_m - V_b) \cdot N}{w} \times 100 \quad (8)$$

$$\%P = \%N \cdot F \quad (9)$$

Dónde:

%N= Porcentaje de Nitrógeno total

N= Normalidad del Titulante

14mg = Peso de un miliequivalente de Nitrógeno

Vb = Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por el blanco de reactivos

Vm= Volumen en mL de HCl 0.1N gastados por la muestra en la titulación

W = Peso en mg de la muestra alimenticia

F = Factor de conversión del nitrógeno total a porcentaje de proteína de acuerdo a la muestra analizada, se considera un factor de 6,25 de acuerdo con la norma AOAC.

%P = Porcentaje de proteína en base seca

**Contenido de cenizas:** por medio del método de incineración a 550 °C por 12 h, se determinó el contenido de cenizas, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de cenizas (\%)} = \frac{C2-C0}{C1} \times 100 \quad (10)$$

Dónde:

Peso de crisol vacío sin humedad y marcado, C0

Peso de muestra, C1

Peso de crisol con muestra seca, C2

### **Análisis de perfil de textura TPA.**

Debido a la presencia de los aditivos reductores, las variaciones de las propiedades de textura se realizaron mediciones instrumentales mediante un

analizador de textura CT3 100 K de marca Brookfield® empleando el Software TexturePro CT®.

El proceso fue desarrollado a través de ensayos de doble compresión con una placa circular plana TA 25/1000 sobre la dona completa a temperatura ambiente ( $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) a pocas horas después de elaboradas, con cinco repeticiones en cada muestra, las dimensiones promedio de las donas fueron 49 mm de diámetro y 57 mm de alto, las cuales fueron comprimidas axialmente al 50% de su altura original. Las curvas de fuerza de deformación vs tiempo se obtuvieron utilizando una celda de carga de 10 kg y una velocidad de pre-ensayo, ensayo y pos-ensayo de 1 mm / s. Se determinaron los siguientes parámetros: dureza, cohesividad, elasticidad y masticabilidad (Tan & Mittal, 2006, 88).

Análisis estadístico: la información obtenida se tabuló y se evaluó a través de análisis de varianza ANOVA, empleando diferencias mínimas significativas (LSD) de Fisher como método de comparación múltiple, con un nivel de confianza del 95,0%, en algunos casos se aplica modelo de calibración para establecer relaciones entre variables. Los análisis de se efectúan en software estadístico Statgraphics Centurión XVI.I.

### **Análisis sensorial.**

Se estableció una prueba de perfil de sabor, basada en la NTC 3929, llevada a cabo en las instalaciones de un laboratorio de Análisis Sensorial -exclusivo para este tipo de evaluaciones-, con 5 jueces entrenados, quienes por medio de un consenso seleccionaron y valoraron los atributos de la dona en una escala 0 a 10 cm (los

términos descriptivos cada dos cm fueron ausencia, muy leve, leve, moderado, marcado y muy marcado) (ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación, 2009).

La intensidad se cuantificó para los siguientes descriptores de sabor: sabor característico, considerado como aquella nota propia de las donas; dulce; graso, percibido a esa sensación grasosa de panadería/repostería; ácido; amargo; levadura, asociada a una nota química típica de la fermentación de un pan, salado; objetable, vinculada a algún sabor rancio o particularmente diferente al sabor especial de una dona y la calidad en general.

Lo anterior, se ilustró por métodos gráficos (histograma y radial), con el fin de determinar las relaciones existentes entre los descriptores en las cuatro formulaciones. Una vez analizados todos los datos que componen este objetivo, se eligió la formulación que tuvo menor cantidad de acrilamida y presentó adecuadas características de calidad, a esta formulación se le denominó como prototipo "ideal".

**Objetivo 3: Determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de la acrilamida en las reformulaciones seleccionadas.**

### **Determinación de la acrilamida.**

Se desarrolló mediante la metodología de superficie de respuesta, a partir de un diseño  $2^3$  para determinar el efecto del tiempo y la temperatura de fritura, sobre el contenido de acrilamida (variable respuesta), adicionado mayores cantidades de la dosificación del aditivo reductor utilizado en el objetivo dos. Los datos experimentales analizados fueron:

Factores	Temperatura	Tiempo	Aditivo reductor:
	170 °C	45 s	Enzima asparaginasa
Niveles			572 ppm
	190 °C	65 s	715 ppm

Lo que proyectó 16 tratamientos con un diseño de composición central, con un bloque, tal como se muestra en la tabla 10.

Tabla 10. Distribución de las corridas para el diseño de superficie de respuesta.

<b>Tratamientos</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Dosificación de la enzima ppm (mg/Kg)</b>
1	190	65	572
2	190	45	715
3	180	55	643
4	170	65	715
5	180	72	643
6	163	55	643
7	170	45	572
8	180	55	643
9	190	65	715
10	190	45	572
11	170	65	572
12	170	45	715
13	180	55	763
14	196	55	643
15	180	38	643
16	180	55	523

### Medición de color.

De manera paralela, se ejecutó la medición del color para las 16 donas elaboradas, según el esquema de trabajo anterior con respecto al tiempo, la temperatura y la dosificación de la enzima.

Los datos fueron evaluados en un colorímetro DATACOLOR (R) 650, de esfera integrada de doble haz con lámpara de xenón. La geometría de medición es difusa, con un ángulo de medición de observador 8° conforme a la CIE publicación 15.2 de colorimetría.

Se utilizó como fuente de iluminación xenón pulsado (aprox. iluminante D65), apertura media con recubrimiento de bario (área iluminada 20 mm, área de medición 16mm). Se configuró para promediar tres puntos medidos en la muestra y se calibró en modo reflectancia.

Cuenta con un software de análisis de color Datacolor tools 2.0. Las lecturas realizadas arrojan las coordenadas colorimétricas L° (Luminosidad), a° (+/- rojo/verde), b° (+/- amarillo/azul), C° (saturación), h° (tono) de la muestra.

El cambio de color total en el espacio colorimétrico L, a, b, se calculó a partir de la Ecuación (10) (Kumar, P, Ngadi, M, Chinnan, 2010, 127 - 128).

$$\Delta E = ((L - L^\circ)^2 + (a - a^\circ)^2 + (b - b^\circ)^2)^{0.5} \quad (11)$$

Donde L, a y b fueron los valores reales de color y L°, a° y b° fueron los valores de color para la muestra patrón, cabe recordar las condiciones de fritura: 190°C y 45 s.

Análisis estadístico: Los resultados se procesaron para obtener los modelos de regresión, que explicaron el comportamiento del tiempo, la temperatura y dosificación

sobre la formación de acrilamida en donas. Los análisis se generaron en un software estadístico Statgraphics Centurión XVI.I.

## Resultados

Los resultados obtenidos fueron con relación a los objetivos proyectados:

**Objetivo 1: Estandarizar el método analítico para la cuantificación cromatográfica de acrilamida en productos fritos (donas).**

### **Determinación del método de extracción.**

Las dos sales de extracción con mayores porcentajes de recuperación dieron lugar al método europeo EN 15662 y el oficial AOAC 2007.01, ambas sales con la dispersiva de limpieza 150 mg MgSO<sub>4</sub> + 25 mg PSA + 25 mg C18, inicialmente con un porcentaje máximo al 32 %.

A partir de tal resultado se desarrollaron las variaciones descritas anteriormente para el aumento de recuperación hasta niveles superiores a 80 %. Las condiciones seleccionadas consistieron en la inclusión de una extracción asistida por ultrasonido después del primer vortex, sin NaCl y con 5 µL de volumen de inyección en el método cromatográfico.

El Método Europeo EN 15662 con 150 mg MgSO<sub>4</sub> + 25 mg PSA + 25 mg C18 presentó el mayor porcentaje de recuperación o exactitud basada en la concentración obtenida en el material de referencia, que fue 1.0353 mg/kg hasta alcanzar un valor máximo de 105.6 %.

### **Extracción de acrilamida en las diferentes formulaciones de las donas**

El porcentaje evaluado posteriormente en la matriz de panificación fue máximo 74 ± 0.76%, valor que se encuentra dentro de los límites establecidos por normativa y

es comparable con estudios realizados en un producto similar, donde se adicionó extracto de té y de café (Grażyna B & Nebesny E, Oracz J, 2013, 152) y (Crews, 2016, 468).

### **Identificación y cuantificación de la acrilamida.**

#### **Efecto matriz**

El efecto matriz obedeció a la ecuación (12), con un coeficiente de correlación  $R^2 = 0,9979$ :

$$y = 19592x - 134 \quad (12)$$

De otro lado, bajo el mismo procedimiento la ecuación con un  $R^2 = 0,9964$  en solvente fue:

$$y = 27129x + 8,3549 \quad (13)$$

El efecto matriz obtenido fue 27.8 % superior al límite máximo, por esta razón la cuantificación de la acrilamida en muestra siempre se determinó mediante una curva de calibración preparada en matriz, por triplicado.

#### **Límite de detección (LD) y de cuantificación (LC)**

La desviación estándar ( $S$ ) de la curva de calibración del solvente fue 34,01, así los valores del LD y LC fueron 0,005729 mg / kg y 0,017360 mg / kg, respectivamente.

**Objetivo 2: Reformular la matriz de panificación con el uso de extractos y/o aditivos para la reducción en la formación de acrilamida.**

### **Medidas de producción de las donas.**

En las tablas 11 y 12 se muestran los datos registrados durante el proceso de elaboración de las donas, fueron tres lotes por cada formulación: patrón, enzima, antioxidante y ácido cítrico, con una formulación calculada para 250 g de harina.

Tabla 11. Promedios de las unidades y masas de las donas crudas.

	<b>Patrón</b>	<b>Enzima</b>	<b>Antioxidante</b>	<b>Ácido Cítrico</b>
<b>Número de unidades elaboradas</b>				
Promedio	13	14	14	14
Desviación, S2	1,00	1,53	0,71	0,71
Coefficiente de variación, CV	0,08	0,11	0,05	0,05
<b>Masa de las donas en crudo -antes de fermentar- (g)</b>				
Promedio	27	25	24	22
Desviación, S2	1,8	0,7	4,2	1,9
Coefficiente de variación, CV	0,1	0,0	0,2	0,1
<b>Masa de recorte (g)</b>				
Promedio	104,3	119,0	157,5	173,0
Desviación, S2	32,62	28,35	48,79	32,53
Coefficiente de variación, CV	0,31	0,24	0,31	0,19

Tabla 12. Promedios de los parámetros físicos de las donas fritas.

	<b>Patrón</b>	<b>Enzima</b>	<b>Antioxidante</b>	<b>Ácido Cítrico</b>
<b>Altura (mm)</b>				
Promedio	56,4	51,0	49,3	50,7
Desviación, S2	2,1	4,6	3,8	1,2
Coefficiente de variación, CV	0,04	0,09	0,08	0,02
<b>Diametro (mm)</b>				
Promedio	48,2	38,5	39,7	38,0
Desviación, S2	2,8	3,5	3,1	1,0
Coefficiente de variación, CV	0,06	0,09	0,08	0,03
<b>MASA FINAL (g)</b>				
Promedio	36	35	30	29
Desviación, S2	4,2	2,0	1,2	1,0
Coefficiente de variación, CV	0,12	0,06	0,04	0,03

El número de donas que se obtienen en la producción para cada formulación, solo se encuentra diferencia en una unidad de la formulación patrón vs las otras; en las condiciones crudas se observaron masas de mayor a menor: patrón, enzima, antioxidante y ácido cítrico, lo que se relaciona con la masa para recorte que en su orden van en sentido contrario a lo anterior.

De acuerdo a la experiencia práctica en la elaboración de las donas en la planta de panificación, aquella formulación tratada con ácido cítrico presentó alta elasticidad en el momento de moldear la masa antes de llevarla al proceso de fermentación, por lo tanto, tuvo menor espesor y perdió manejo para ser laminada. En los resultados de TPA hubo diferencias estadísticamente significativas con la dona patrón, esto corroboró el comportamiento observado y no hay referencias bibliográficas donde reporten al menos cualquier formulación de panificación que utilice este aditivo reductor.

Se evidenció que el peso de las donas crudas y fritas continúan con el mismo comportamiento, es decir, no varía el peso entre muestras antes y después del proceso térmico, el orden de manera descendente fue la dona patrón, con enzima, antioxidante y ácido cítrico.

Con respecto a los parámetros diámetro y altura, la muestra patrón presentó una tendencia mayor con respecto a las formulaciones sin aditivos, consecuencia de las modificaciones del pH que aportan la enzima; los flavonoides, taninos y polifenoles totales que contiene el Nativanox® y el ácido cítrico a la masa en el momento del mezclado y posterior formación del gluten, sin embargo, no es posible atribuir con certeza dicha apreciación, debido a que no fueron datos medidos en este trabajo.

La razón que las donas sin aditivos fuesen más altas y extensas corresponde al desarrollo del gluten, por no permitir que la celda del gas formada desde el amasado se expandiera en la fermentación, se tuvo baja cantidad de CO<sub>2</sub> y la fuerza de tensión en la matriz proteína-almidón no se rompiera para dar crecimiento en red y aumentara su volumen, antes de sellar el producto con la fritura.

Diferentes autores han destacado esta condición desde el punto de vista reológico, la masa de harina de trigo con el agua constituyen de un sistema viscoelástico, donde el esqueleto de gluteninas contribuye a la elasticidad y las gliadinas a la extensibilidad (Elina, 2014, 23 - 31), estas proteínas son capaces de absorber dos veces su peso en agua para retener el CO<sub>2</sub> durante la fermentación (Roccia, 2011, 11 - 41), por enlaces disulfuro, puentes de hidrógeno, entrecruzamientos e interacciones hidrofóbicas para formar una red continua, que es la base para el desarrollo y retención de gas en la masa (Rodríguez, Fernández, & Ayala, 2005, 74 - 75).

Durante el amasado se producen numerosas interacciones, no sólo entre las proteínas y el agua para formar la red de gluten sino también los otros componentes presentes en la harina (Roccia, 2011, 11 - 41). En la fermentación hay dos etapas importantes, la producción y la retención de gas, el dióxido de carbono que se produce queda retenido en los pequeños alvéolos que se habían formado en la matriz proteica durante el amasado, provocando el crecimiento de los mismos y la expansión de la masa (Elina, 2014, 23 - 31).

A su vez, el efecto oxidante presente en los antioxidantes está limitado por el tiempo de amasado debido a que la levadura toma el oxígeno de las burbujas de aire (celdas). De este modo, se genera una mezcla de nitrógeno (proveniente del aire) y dióxido de carbono (proveniente de la fermentación) que abastece un ambiente en el que el antioxidante puede actuar como agente reductor. Por ello, si es utilizado en procesos de panificación con largos períodos de fermentación el poder reductor puede debilitar la estructura del gluten con la subsecuente pérdida de retención de gas en la masa (Dziki, Rozylo, Gawlik-Dziki, & Swieca, 2014, 51- 55).

De otro lado, la adición de algunas enzimas a la masa de pan hace que se diluya el gluten y produce un producto con malas propiedades reológicas, bajos rendimientos y aceleramiento en el proceso de envejecimiento (Altuna, Ribotta, & Tadini, 2015, 872).

### **Caracterización bromatológica.**

Los resultados de los análisis bromatológicos, expresados en porcentajes, de la dona patrón fueron  $20,2 \pm 5,4$  extracto etéreo;  $12,43 \pm 13,6$  proteína,  $6,10 \pm 22,5$  fibra cruda y  $0,98 \pm 2,6$  de cenizas.

El porcentaje de extracto etéreo fue fundamental para conocer el contenido de grasa inicial y poder proceder con el método de desengrasado con los fines anteriormente mencionados.

En las cantidades de proteína y de cenizas se encontraron dentro de lo reportado para productos comerciales. Caso contrario para la fibra y proteínas que fueron superiores a los reportados por Herrera S.P. & Sisalima D.E., 2013, 18, 87, 89.

### **Determinación de la acrilamida.**

La formación de acrilamida en las formulaciones se muestra en la tabla 13. Las cantidades desarrolladas de esta sustancia de manera descendente fueron: patrón, antioxidante, enzima y ácido cítrico; aunque en proporciones relativamente bajas con los tres aditivos hay reducción, efecto positivo, para el caso de los antioxidantes porque según varios autores referencian que la puede potenciar (Liu et al., 2015, 46-50), (Zhang & Cheng, 2016, 342-345).

Tabla 13. Porcentaje de reducción de la acrilamida en las formulaciones.

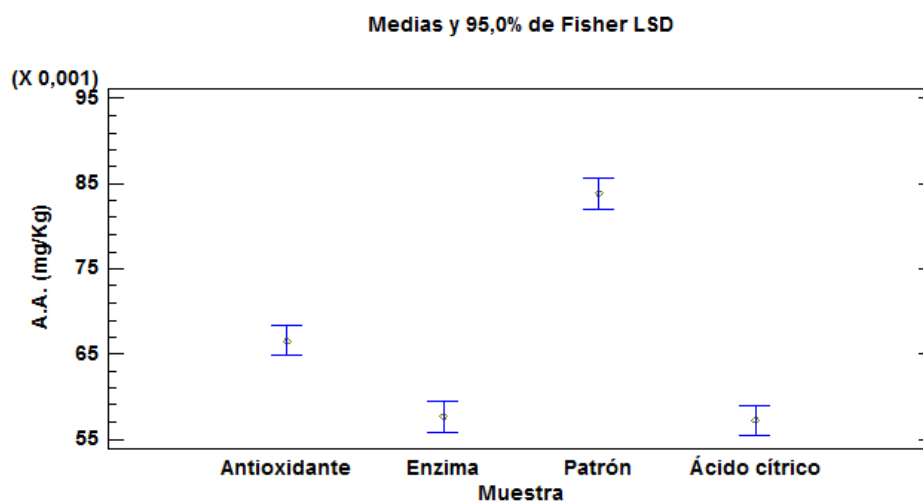
<b>Formulaciones</b>	<b>% desengrasado</b>	<b>A.A. (mg/kg)</b>	<b>% Reducción</b>
Patrón	80,09 ± 0,04	0,08245 ± 0,004	
Enzima	80,32 ± 0,02	0,05720 ± 0,001	42,774
Antioxidante	77,76 ± 0,00	0,06658 ± 0,002	26,865
Ácido cítrico	75,84 ± 0,03	0,05717 ± 0,003	42,778

Los resultados anteriores están dentro de los rangos de disminución de acrilamida en estudios previos con galletas, en el cual reportan porcentajes de reducción entre un 7 % a 88 % al analizar tiempo y temperatura de fermentación así

como las dosificaciones con la asparaginasa, donde atribuyen estas diferencias a la complejidad de la matriz, desde el punto de vista de la composición de la formulación y procesos simulados de la industria, que contenían ingredientes adicionales, tales como grasa y sal, que podrían obstaculizar de algún modo la actividad enzimática, mientras que otros estudios solo reportan la mezcla de almidón, azúcar y agua (Anese M, Quarta B, 2011, 2837).

Como se muestra en la figura 13, los valores medios de acrilamida (mg / Kg) desarrollada en las formulaciones no presentan diferencias estadísticamente significativas entre los niveles (enzima vs ácido cítrico). Los restantes presentan diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza de 95 %.

Figura 13. Gráfico de medias e intervalos de diferencia mínimo significativa (LSD) del contenido de acrilamida (mg/Kg) en las formulaciones.



### **Análisis de perfil de textura TPA.**

Los resultados del análisis de perfil textura descritos en la tabla 14, mostraron los mayores valores de dureza en las donas donde usó la enzima y el antioxidante; presentando diferencias significativas entre la enzima con el patrón y el ácido cítrico, efecto relacionado con las características de la miga, la cual eran más compacta y con alveolos más pequeños en el caso de la enzima. Tan & Mittal, 2006,142 reportaron  $816 \pm 95$  g/fuerza en donas elaboradas con harina de trigo para el desarrollo de las mismas con un contenido de aceite menor. En el segundo ciclo la deformación del producto disminuyó en un [57, 2; 71,4; 94,6 y 66,6] g/fuerza, respectivamente a las formulaciones como se listan en la tabla 14, controlando la deformación del producto de manera paulatina, que al ser humedecido en boca por medio de las enzimas salivales permitirá seguir apreciando las sensaciones características de la dona y la reducción de tamaño en la masticación.

Con respecto a la cohesividad, los datos obtenidos desde el punto de vista estadístico y experimental apuntaron que las tres formulaciones patrón, ácido cítrico y enzima, se puedan considerar iguales, esto se atribuyó a que los grosores de las cortezas de los productos fueron muy similares. La muestra donde se adicionó antioxidante fue la más cohesiva, es decir, tuvo una corteza menos blanda con mayor dificultad deformación antes de romperse, estos datos fueron cercanos de acuerdo a lo estudiado por Ghaitaranpour, Elahi, Nagafi, & Mohebbi, 2013,142, donde estimaron un valor de  $0,37 \pm 0,01$  para una dona, el primer día de elaboración, con el fin de evaluar el efecto del almacenamiento a temperatura ambiente sobre la calidad del producto.

En el caso de la elasticidad presentó diferencias significativas el aditivo reductor ácido cítrico, -efecto descrito anteriormente, el cual fue evidenciado a la luz de los

resultados experimentales en planta-, con la dona patrón (estructura interna menos compacta). Esta formulación exhibió el mayor valor de elasticidad, y el menor valor de firmeza.

La masticabilidad es un parámetro dependiente de los tres anteriores, por lo tanto, hubo una tendencia similar a la dureza, con la excepción del aditivo reductor ácido cítrico que al tener mayor elasticidad invirtió su orden con la formulación patrón.

Tabla 14. Análisis de perfil de textura TPA para las formulaciones de donas.

Tratamiento	Dureza 1 (N)	Dureza 2 (N)	Cohesividad	Elasticidad (mm)	Masticabilidad
Patrón	633 <sup>2</sup>	575,8 <sup>2</sup>	0,434 <sup>1</sup>	14,946 <sup>1</sup>	4056,61 <sup>2</sup>
Ácido cítrico	623,4 <sup>1</sup>	552 <sup>1</sup>	0,454 <sup>2</sup>	16,62 <sup>1</sup>	4689,67 <sup>1</sup>
Enzima	894 <sup>1,2</sup>	799,4 <sup>1,2</sup>	0,452 <sup>3</sup>	15,42	6219,55 <sup>1,2</sup>
Antioxidante	687,4	620,8	0,49 <sup>1,2,3</sup>	15,274	5119,52
Desviación estándar	±71,274	±63,47	±0,011	±0,463	±488,804

<sup>1,2,3</sup>Valores medios en la misma columna seguidos por números iguales son diferentes significativamente ( $P < 0.05$ ).

### Análisis sensorial.

Se presentan las gráficas en la figura 14, con los resultados promedios de los descriptores de sabor del panel sensorial de las cuatro formulaciones, con el esquema radial se resaltaron las calificaciones más sobresalientes y con el histograma se visualiza el valor de cada atributo con respecto a las donas desarrolladas.

La muestra donde se utilizó la asparaginasa, obtuvo las mejores ponderaciones en cuanto a la intensidad de sabores esperados: dulce, graso, levadura y una valoración menor en ácido y amargo, descriptores que no se buscan en un producto de panificación.

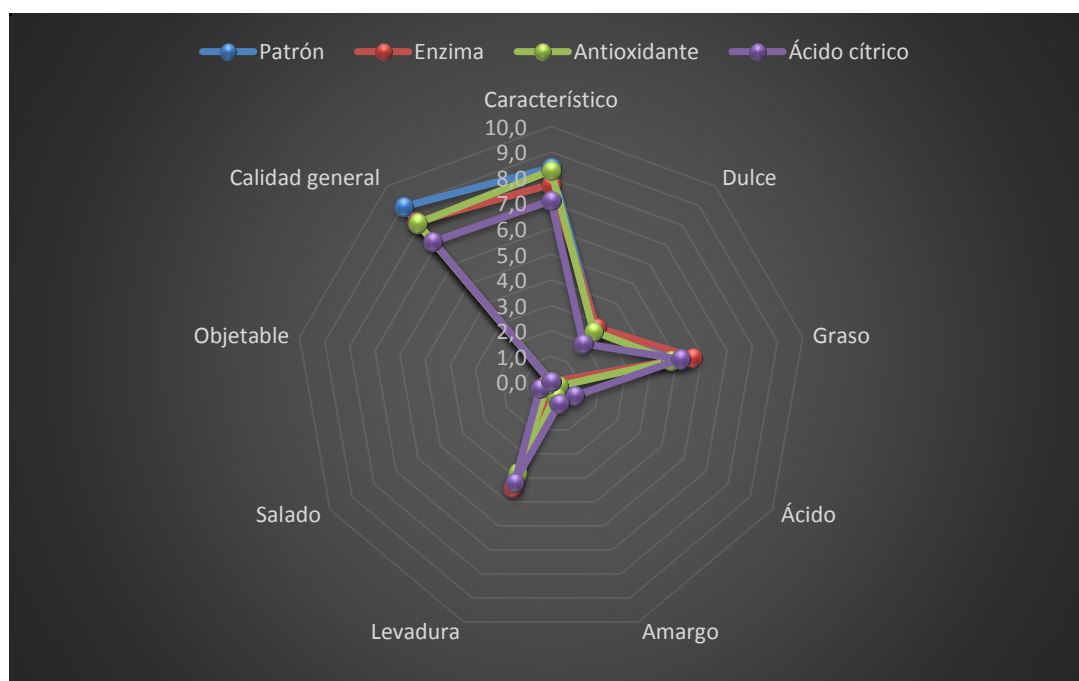
Sin embargo, de las tres formulaciones comparadas con el patrón, el antioxidante tuvo un marcado sabor característico, seguido por uno moderado para la enzima. En el sabor salado la asparaginasa aportó una mayor intensidad, aunque

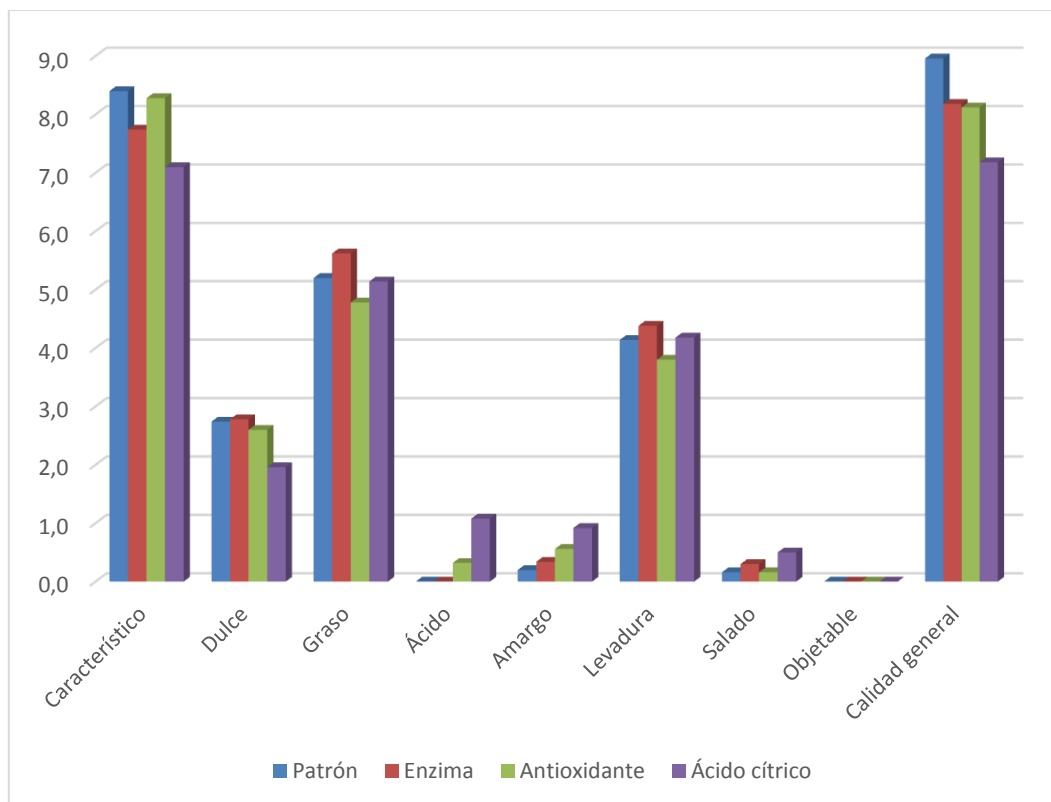
todos estén en un rango cercano a la ausencia. En la calidad general de la dona, ambos aditivos reductores fueron calificados de manera aproximada. Se presentó ausencia de sabor objetable para todas las formulaciones.

La dona elaborada con ácido cítrico alcanzó las más bajas calificaciones sensoriales para el sabor dulce, característico y calidad general, asimismo mantuvo la mayor intensidad en los sabores salado, amargo y como se esperaba, ácido.

Según las condiciones llevadas a cabo en la propuesta de este trabajo, no existen referencias comparables para estimar similitudes o diferencias con los resultados obtenidos.

Figura 14. Resultados sensoriales, gráficos radial e histograma.





A partir de los anteriores resultados, se escogió aplicar para el siguiente objetivo la asparaginasa, de un lado, al no presentar diferencias estadísticamente significativas con el ácido cítrico, aditivos reductores que disminuyen en mayor porcentaje el contenido de acrilamida en las donas con respecto al uso del antioxidante. En cuanto al análisis sensorial y de textura, si bien la formulación con la enzima presentó mayor dureza, le sigue la muestra con antioxidante, al establecer las comparaciones con la dona patrón; y en el aspecto sensorial, el producto con enzima tuvo calificaciones superiores en los descriptores de sabor, aunque la calidad en general haya sido muy cercana a la dona con antioxidante. En tal sentido, la asparaginasa permitió tener un balance en los parámetros deseados, que a nivel industrial se pueden controlar para el mejoramiento del producto final.

**Objetivo 3: Determinar el efecto del tiempo y la temperatura sobre la formación de la acrilamida en las reformulaciones seleccionadas.**

**Determinación de la acrilamida.**

La variable temperatura obtuvo un valor P de 0.0343, lo que permitió considerar que existe diferencia estadísticamente significativa con respecto a los tratamientos evaluados, es decir, es el factor que directamente se relaciona con la formación de acrilamida, independiente del tiempo y cantidad de enzima adicionada; las cuales presentaron un valor P > 0.05, como se reportan en la tabla 15 las interacciones entre las variables que afectan la formación de acrilamida.

Tabla 15. Análisis de Varianza (ANOVA) del diseño factorial.

Variable	Valor-P
A: T °C	<b>0,0343</b>
B: Tiempo (s)	0,9003
C: ppm (mg/Kg)	0,7963
AA	0,0657
AB	0,5377
AC	0,1920
BB	0,3541
BC	0,3649
CC	0,9125
R <sup>2</sup>	74,7 %
Error estándar	0,0043

El análisis estadístico del modelo de superficie de respuesta, tuvo una función de tipo cuadrático representado en la ecuación 14 de regresión múltiple ajustada a los datos experimentales para hallar el contenido mínimo de acrilamida.

$$\begin{aligned}
 \text{A. A. } \left(\frac{\text{mg}}{\text{kg}}\right) = & 0,535205 - 0,00860224 * T (^{\circ}\text{C}) + 0,00159977 * \text{tiempo (s)} + \\
 & 0,000729986 * \text{ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}}\right) + 0,0000319574 * T (^{\circ}\text{C})^2 - 0,00001 * T (^{\circ}\text{C}) * \\
 & \text{tiempo (s)} - 0,00000315789 * T (^{\circ}\text{C}) * \text{ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}}\right) + 0,00001428 * \text{tiempo (s)}^2 - \\
 & 0,00000210526 * \text{tiempo (s)} * \text{ppm} \left(\frac{\text{mg}}{\text{Kg}}\right) - 3,21072\text{E} - 8 * \text{ppm} (\text{mg/Kg})^2 \quad (14)
 \end{aligned}$$

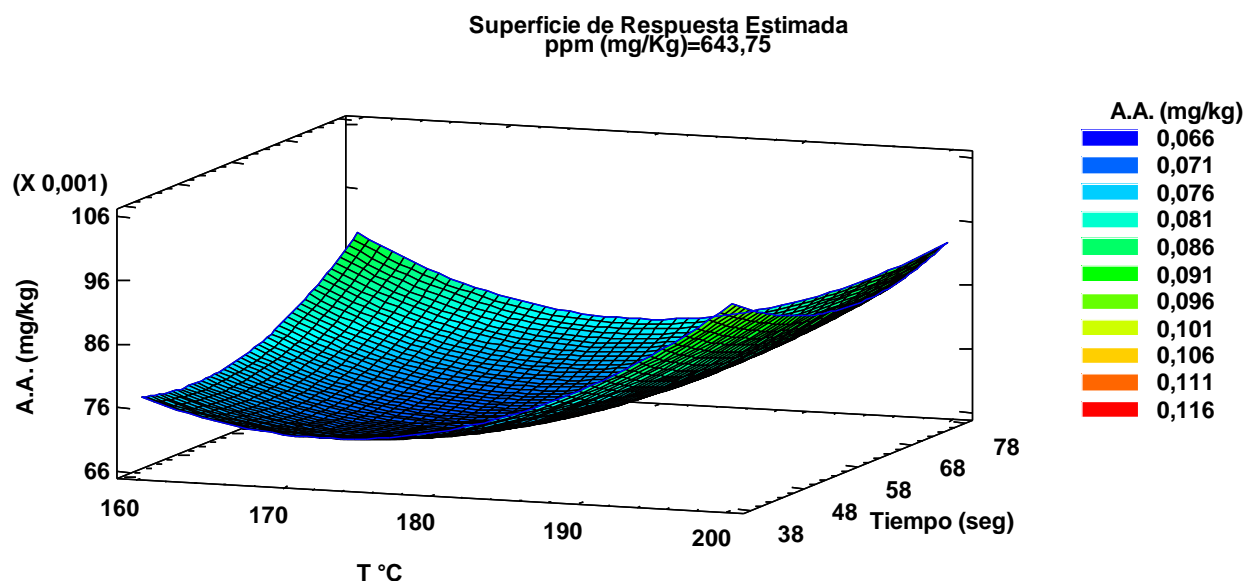
La optimización de la respuesta, se definió bajo la meta de minimizar el contenido de A.A. (mg/kg), con un valor óptimo de 0,063, en la tabla 16 se describió la combinación de los niveles de los factores, los cuales determinaron las condiciones óptimas para un tratamiento térmico ideal.

Tabla 16: Condiciones de optimización para la minimización de acrilamida.

Factor	Bajo	Alto	Óptimo
T °C	163,182	196,818	<b>166,9</b>
Tiempo de fritura (s)	38,1821	71,8179	<b>41,04</b>
Dosificación de enzima ppm (mg/Kg)	523,922	763,578	<b>523,9</b>

La figura 15 muestra la estimación de la cantidad de acrilamida en función del tiempo, la temperatura y la dosificación de la asparaginasa bajo los parámetros propuestos. La altura de la superficie representa los valores de acrilamida, indicando que la relación entre temperatura y tiempo posee un efecto negativo sobre la formación de esta sustancia, mientras que la dosificación de la enzima no presentó significancia.

Figura 15. Gráfica de superficie de respuesta estimada.



Al analizar el contenido de acrilamida durante los diferentes tratamientos (tabla 17) demostró que a mayor temperatura hubo más formación de la sustancia, todavía por encima de la dona patrón en el objetivo anterior, por tal razón el porcentaje de reducción es cero para el tratamiento número 14. Mientras que, el mínimo contenido de acrilamida en las donas fue para el tratamiento 9 con 0.068 mg/Kg, donde se agruparon condiciones altas como, por ejemplo, una temperatura de 190 °C, un tiempo de 65 s y una dosificación de asparaginasa por 715 ppm.

Los otros tratamientos disminuyeron la producción de acrilamida en las donas entre un rango de 7% a 17%, condición que experimentaron Anese M, y colaboradores (2011), 2837, para unas galletas utilizando la misma enzima.

La combinación de una temperatura a 180 °C y un tiempo por 55 s fueron las condiciones que representaron la mayoría de tratamientos para reducción de acrilamida con un porcentaje entre un 16 % a 17 %. Otro efecto puntual se dio cuando

a un tiempo constante (45 s), una dosificación de asparaginasa intermedia de 572 ppm y a menores temperaturas la tendencia es a disminuir la formación de esta sustancia.

Tabla 17. Relación entre las condiciones del proceso con la reducción de acrilamida.

<b>Tratamientos</b>	<b>T °C</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>Dosificación de enzima ppm (mg/Kg)</b>	<b>Contenido de A.A (mg/Kg)</b>	<b>Porcentaje de reducción (%)</b>
1	190	65	573	0,077	7
2	190	45	715	0,078	6
3	180	55	644	0,069	17
4	170	65	715	0,074	10
5	180	72	644	0,077	7
6	163	55	644	0,069	17
7	170	45	573	0,069	17
8	180	55	644	0,069	16
9	190	65	715	0,068	17
10	190	45	573	0,075	9
11	170	65	573	0,070	15
12	170	45	715	0,076	8
13	180	55	764	0,069	17
14	197	55	644	0,089	0
15	180	38	644	0,071	14
16	180	55	524	0,069	16

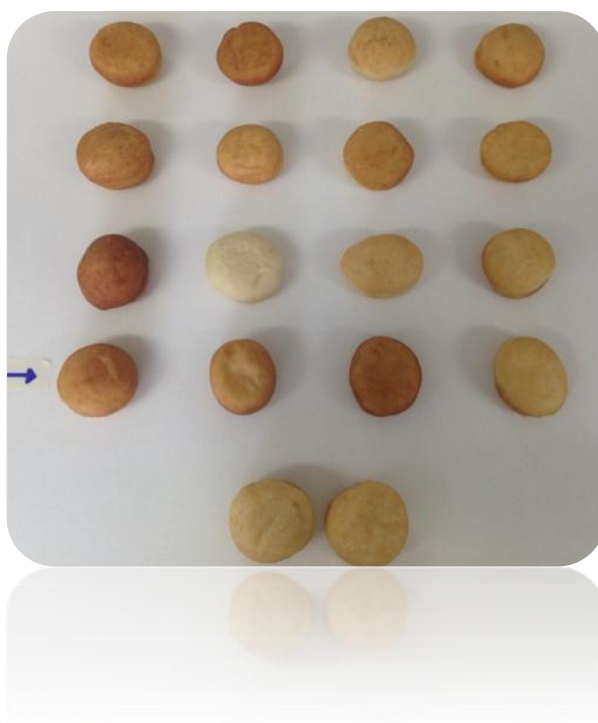
### Medición de color.

El color está asociado con la reacción de Maillard, la cual es una de las principales rutas de formación de acrilamida, por esta razón es posible inferir que al propiciar las condiciones para que se desarrolle este tipo de reacciones se presente mayor cantidad de la sustancia probablemente cancerígena en la dona, como también dependa del oscurecimiento de la superficie de los productos.

En la figura 16, de abajo hacia arriba, las dos donas que están ubicadas en la parte central de la imagen, corresponden a las muestras patrón.

Los 16 tratamientos elaborados -representados por una sola unidad de dona-, comienzan en orden, a partir de la fecha que indica el punto de partida: tratamiento número 1 hasta el 4 y en ese mismo lado, continúa el tratamiento número 5 al 8, y así sucesivamente hasta llegar a la última en el extremo superior derecho.

Figura 16. Fotografía del cambio de color entre tratamientos vs la muestra patrón.



Los colores percibidos, reflejaron que la menor temperatura proporcionó características más claras, bajos tonos amarillos y rojos, asemejándose la muestra seis al color de un pan molde tradicional, es pocas palabras, quedó totalmente desalineada al referente que el mercado que ha dispuesto para estos productos.

Por su parte, el desarrollo del color amarillento, aquel dorado deseable fue notorio para las donas elaboradas a altas temperaturas, sin embargo, valores por arriba de 180 ° y 55 s, generó un oscurecimiento pronunciado en la corteza de las donas 3, 5 y 14, acercándose a tonos rojizos.

A cada muestra de la dona se le efectuaron tres mediciones de color en la corteza, informándose el valor promedio. Los valores de la tabla 18 correspondieron a los datos promedio para el cálculo del ( $\Delta E$ ), que indicó la diferencia total de color entre las condiciones evaluadas. En general, los resultados estuvieron ajustados con lo reportado por Vélez & Sosa, 2003, 347 - 348, quienes evaluaron parámetros como el color en las donas a diferentes temperaturas de freído 180 °C, 190 °C y 200 °C, donde establecieron que los valores a y L fueron significativamente correlacionados mostrando un enrojecimiento creciente y una ligereza decreciente en función de la temperatura del aceite. Ambos parámetros a y L expresaron las transformaciones de color del pardeamiento no enzimático.

Tabla 18. Variaciones en la diferencia total de color ( $\Delta E$ ), según las condiciones de elaboración de las donas.

<b>Tratamiento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>L</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta E</math></b>
1	190	65	52,86	21,42	71,08	27,07
2	190	45	55,95	18,39	65,94	20,38
3	180	55	46,42	27,68	76,5	36,93
4	170	65	64,69	12,05	48,62	1,03
5	180	72	43,58	28,24	72,6	35,99
6	163	55	77,29	2,9	29,55	24,60
7	170	45	70,8	6,07	38,21	13,40
8	180	55	63,72	11,98	46,92	2,50
9	190	65	53,84	22,06	72,85	28,38
10	190	45	66,65	9,91	46,22	3,62
11	170	65	57,31	17,15	61,19	15,46
12	170	45	65	9,87	44,24	4,97
13	180	55	56,66	17,69	64,89	18,96
14	197	55	50,89	21,03	71,53	28,20

<b>Tratamiento</b>	<b>T (°C)</b>	<b>Tiempo (s)</b>	<b>L</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b><math>\Delta E</math></b>
15	180	38	67,28	10,44	47,61	3,01
16	180	55	59	18,14	60,99	15,00
Patrón	190	45	64,72	11,11	49,04	

## Conclusiones

En la identificación y la cuantificación de acrilamida en productos de panificación se evidenció que no es pertinente adicionar NaCl para mejorar el porcentaje de recuperación del analito, debido a que se registraron menores resultados con una diferencia de 10% en promedio al compararse sin la adición de esta sal, independientes de las sales de extracción y dispersivas de limpieza como en las variaciones del proceso (tiempos y equipos).

La dosis de acrilamida necesaria para que genere algún efecto negativo en la salud humana es a partir 0,17 mg / Kg pc / día, esta depende del peso de la persona; si al hacer un estimado con un peso promedio de 55 Kg, la cantidad de acrilamida debería estar por debajo de los niveles de 0,0031 mg/Kg, lo que indica que las cuatro formulaciones de las donas de este trabajo aportan un mayor valor permitido y sí a esto se le suma la cantidad de los otros alimentos que también la contienen, confirma la importancia de continuar en la búsqueda de la disminución de dicha sustancia en los alimentos.

La aplicación de los tres aditivos reductores en la matriz minimiza la formación de acrilamida en las donas y no existe diferencias estadísticamente significativas entre el uso de la enzima o el ácido cítrico, ambas la reducen en un 42,8 %. Lo que genera la posibilidad que panaderías de todo tipo puedan agregar ácido cítrico en sus formulaciones teniendo presente las características organolépticas que se le confiere al alimento. De otro lado, incorporar productos antioxidantes naturales, también es otra opción, ya que vienen reemplazando aceleradamente a los sintéticos, es importante evaluar qué tipo de antioxidantes se escogen para evitar que desarrollen el efecto

contrario. Asimismo, la clave en el uso de la asparaginasa está en utilizar bajas dosificaciones en producciones a nivel industrial, donde justifique la inversión en esta materia prima al estimar el costo por dosis, ya que comercialmente se vende en cantidades mínimas (25 Kg) y a un alto costo con respecto a los otros aditivos reductores. Finalmente, al relacionar los descriptores o parámetros en el análisis sensorial y de textura de cada fórmula con la dona patrón, presentan mejores características la enzima, el antioxidante y el ácido cítrico, respectivamente.

El porcentaje de reducción de acrilamida alcanzó un 17% al optimizar las dosificaciones de la enzima y las condiciones de tiempo y temperatura en la fritura. No fue posible estimar una dependencia entre las tres variables con la formación de acrilamida en las donas, solo la temperatura demostró diferencias estadísticamente significativas; en cuanto a los resultados del color, también la temperatura fue la única condición que estableció un comportamiento proporcional con el aumento de las tonalidades.

## Recomendaciones

De acuerdo al trabajo desarrollado en el laboratorio, bajo las condiciones establecidas y los resultados alcanzados, tienen un protocolo preliminar como avance hacia la validación del método de determinación de acrilamida en matrices similares, para incluirla como otro servicio que la universidad pueda ofrecer a la industria o en próximas investigaciones.

La formulación de la dona con el ácido cítrico debe ser mejorada hasta que sea sensorialmente aceptada, se proponen varias opciones: desde la premezcla buscar un vehículo encapsulante que minimice el sabor o permita la liberación controlada durante la fritura; reformular la dona base o evaluar los efectos del relleno y glaseado sobre el enmascaramiento de los sabores que potencializa, la razón se fundamenta en la ventaja económica que tiene este aditivo y el poder de reducción de acrilamida.

Es pertinente realizar ensayos variando las condiciones de tiempo y temperatura en la primera y segunda fermentación sin la adición del algún aditivo reductor, con el fin de estimar si es necesario o no el uso de estos o es posible controlar la formación de acrilamida desde el proceso de elaboración.

## Referencias

- AIB International. (2015). *Proceso de donas y muffins*.
- Al-Taher, F. (2012). Analysis of Acrylamide in french fries using Agilent Bond Elut QuEChERS AOAC kit and LC/MS/MS. Institute for food safety and health Illinois Institute of Technology Bedford Park, IL.
- Altuna, L., Ribotta, P. D., & Tadini, C. C. (2015). Effect of a combination of enzymes on dough rheology and physical and sensory properties of bread enriched with resistant starch. *LWT - Food Science and Technology*, *64*(2), 867–873. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.024>
- Anese, M., Quarta, B., Peloux, L., & Calligaris, S. (2011). Effect of formulation on the capacity of L-asparaginase to minimize acrylamide formation in short dough biscuits. *Food Research International*, *44*(9), 2837–2842. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.06.025>
- Anese M, Quarta B, F. J. (2011). Modelling the effect of asparaginase in reducing acrylamide formation in biscuits. *Food Chemistry*, *126*(2), 435–440. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.11.007>
- Botero, C. R. (2012). Contenido de compuestos polares totales en aceites de cocina previo uso más vendidos en Medellín (Colombia). *Perspectivas En Nutrición*, *14*, 59–69. Retrieved from <http://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Contenido+de+compuestos+polares+totales+en+aceites+de+cocina+previo+uso+más+vendidos+en>

+Medellín+(Colombia).#0

Brennan, J. (2008). *Manual del procesado de los alimentos*. (ACRIBIA S.A., Ed.). Zaragoza (España).

Capuano, E, Ferrigno, A, Acampa, I, Serpen, A., & Açar, Ö, Gökmen, V, Fogliano, V. (2009). Effect of flour type on Maillard reaction and acrylamide formation during toasting of bread crisp model systems and mitigation strategies. *Food Research International*, 42(9), 1295–1302. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.03.018>

Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, 44(4), 793–810. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>

Carrieri, G, De Bonis, MV, Pacella, C, Pucciarelli, A., & Ruocco, G. (2009). Modeling and validation of local acrylamide formation in a model food during frying. *Journal of Food Engineering.*, 95, 90–98. <http://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2009.04.017>

Castellanos, G, Francisco, J, Pinedo, J, Hernández, P. (2012). Comparación entre fritura atmosférica y al vacío en chip de plátano. *Vitae*, 19(1), S197–S200.

Ciesarova Z, Kukurova K, Bednarikova A, Markova L, B. S. (2010). Influence of food processing on acrylamide level in gingerbreads and cookies. En Acrylamide: Influence of plant genetics, agronomy and food processing. *Aspects of Applied Biology*, 97, 87–92.

CODEX ALIMENTARIUS. (2005). Documento de debate sobre la acrilamida. Retrieved from [ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac37/fa37\\_33s.pdf](ftp://ftp.fao.org/codex/Meetings/CCFAC/ccfac37/fa37_33s.pdf)

CODEX ALIMENTARIUS. (2009). Código de prácticas para reducir el contenido de acrilamida en los alimentos. Retrieved from [www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP\\_067s.pdf](http://www.codexalimentarius.org/input/download/standards/.../CXP_067s.pdf)

Crews, C. (2016). *Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry to Determine Acrylamide in Foods. Acrylamide in Food.* Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00024-3>

Curtis T, H. N. (2016). Reducing the acrylamide-forming potential of wheat. *Food and Energy Security*, 5(3), 153–164. <http://doi.org/10.1002/fes3.85>

Dybing, E, Farmer, PB, Andersen, M, Fennell, T., Lalljie, SPD, Müller, DJG, Olin, S, Petersen, BJ, Schlatter, J, Scholz, G, Scimeca, JA, Slimani, N., & Törnqvist, M, Tuijtelaars, S, Verger, P. (2005). Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food and Chemical Toxicology.*, 43, 365–410. <http://doi.org/10.1016/j.fct.2004.11.004>

Dziki, D., Rozylo, R., Gawlik-Dziki, U., & Swieca, M. (2014). Current trends in the enhancement of antioxidant activity of wheat bread by the addition of plant materials rich in phenolic compounds. *Trends in Food Science and Technology*, 40(1), 48–61. <http://doi.org/10.1016/j.tifs.2014.07.010>

Elina, L. (2014). *Efecto de distintos hidrocoloides sobre la microestructura de la masa y su relación con la calidad de productos de panificación.* La Plata : Universidad Nacional de La Plata.

Erkekoglu, P, Baydar, T. (2014). Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience.*, 17(2), 49–57. <http://doi.org/10.1179/1476830513Y.0000000065>

- European Food Safety Authority. (2015). Acrylamide in food. En EFSA explains risk assessment. <http://doi.org/10.2805/90424>
- Evin, C. A. E. L. (2008). Review of Methods for the Reduction of Dietary Content and Toxicity of Acrylamide, 6113–6140.
- Farhoosh, R., Einafshar, S., & Sharayei, P. (2009). The effect of commercial refining steps on the rancidity measures of soybean and canola oils. *Food Chemistry*, 115(3), 933–938. <http://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.01.035>
- Franek, M., Rubio, D., Diblikova, I., & Rubio, F. (2014). Analytical evaluation of a high-throughput enzyme-linked immunosorbent assay for acrylamide determination in fried foods. *Talanta*, 123, 146–150.
- Ghaitaranpour, A., Elahi, M., Nagafi, M. N., & Mohebibi, M. (2013). Effect of storage at ambient temperature on quality of donut. *Agricultural Advances*, 2(4), 139–145.
- Gil, B., Cho, Y. J., & Yoon, S. H. (2004). Rapid determination of polar compounds in frying fats and oils using image analysis. *LWT - Food Science and Technology*, 37(6), 657–661. <http://doi.org/10.1016/j.lwt.2004.02.006>
- Godnic, M. (2002). Acrilamida en los Alimentos. Retrieved from [www.nutrinfo.com.ar](http://www.nutrinfo.com.ar)
- Gökmen, V. (2016). Introduction: Potential safety risks associated with thermal processing of foods. In *Acrylamide in food Analysis, Content and potential Health Effects* (pp. xxi–xxv). Ankara: Academic Press - Elsevier.
- Gómez-Daza J.C. (2014). Evaluación de las propiedades físicas de la masa de las donas durante la fritura profunda a diferentes temperaturas – Análisis crítico. *Revista UGCiencia* 20., 87–95.

- González MA, Socas B, Herrera AV, González J, Hernández J, R. M. (2015). Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185. <http://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>
- Govaert, Y., Arisseto, A., Van Loco, J., Scheers, E., Fraselle, S., Weverbergh, E., ... Goeyens, L. (2006). Optimisation of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of acrylamide in foods. *Analytica Chimica.*, 556, 275–280. <http://doi.org/10.1016/j.aca.2005.09.045>
- Grażyna B, Ź. D., & Nebesny E, Oracz J, K. W. (2013). Influence of addition of green tea and green coffee extracts on the properties of fine yeast pastry fried products. *Food Research International*, 50, 149–160. <http://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.006>
- Griguol, V., Camacho, M. L., & Vicario, I. (2007). Revisión de los niveles de ácidos grasos trans encontrados en distintos tipos de alimentos. *Grasas Y Aceites*, 58(1), 87–98. Retrieved from <http://digital.csic.es/handle/10261/2457>
- H., N. (2005). *The Maillard Reaction Chemistry, Biochemistry and Implications*. Reading: The Royal Society of Chemistry.
- Halder, A, Dhall, A, Datta, A. (2007). An improved, easily implementable, porous media based model for deep-fat frying. Part II: Results, validation and sensitivity analysis. *Food and Bioproducts Processing.*, 85, 220–230. <http://doi.org/10.1205/fbp07034>
- Halder, A., Dhall, A., & Datta, A. (2007). An improved, easily implementable, porous media based model for deep-fat frying: Part I: Model development and input parameters. *Food and Bioproducts Processing*, 85(C3), 209–219.

<http://doi.org/10.1205/fbp07033>

Hellenäs, K, Fohgelberg, P, Fäger, U, Busk, L., & Z, Abramsson, Ionescu, C, Sanner, J. (2013). Acrylamide in Swedish food - targeted sampling 2011 and 2012. Retrieved from

[http://www.slv.se/upload/dokument/rapporter/kemiska/2013\\_national\\_food\\_agency\\_25\\_acrylamide\\_in\\_swedish\\_food\\_targeted\\_sampling\\_2011\\_and\\_2012.pdf](http://www.slv.se/upload/dokument/rapporter/kemiska/2013_national_food_agency_25_acrylamide_in_swedish_food_targeted_sampling_2011_and_2012.pdf)

Helmut, H., Anklaam, E., Wenzl, T., & Stadler, R. (2007). Acrylamide in coffee: review of progress in analysis, formation and level reduction. *Food Additives and Contaminants*, 24 Suppl 1, 60–70. <http://doi.org/10.1080/02652030701243119>

Hendriksen HV, Kornbrust B, S. M. (2010). Acrylamide mitigation using asparaginase. En Acrylamide: Influence of plant genetics, agronomy and food processing. *Aspects of Applied Biology*, 97, 77–86.

Hendriksen, H. V, Kornbrust, B. a, Østergaard, P. R., & Stringer, M. a. (2009). Evaluating the potential for enzymatic acrylamide mitigation in a range of food products using an asparaginase from *Aspergillus oryzae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(10), 4168–4176. <http://doi.org/10.1021/jf900174q>

Herrera S.P. Sisalima D.E. (2013). *Elaboración de donas (rosquillas) a base de harina de camote morado, quinua y trigo, y evaluación de su potencial nutritivo*. Universidad de la Cuenca.

ICONTEC Instituto Colombiano de Normas Técnicas y Certificación. (2009). NTC 3929 ANÁLISIS SENSORIAL. MÉTODOS DEL PERFIL DEL SABOR.

Isleroglu, H, Kemerli, T, Sakin-Yilmazer, M, Guven, G, Ozdestan, O, Uren, Ali, Kaymak-

- Ertekin, F. (2012). Effect of steam baking on acrylamide formation and browning kinetics of cookies. *Journal of Food Science.*, 77(10), E257-63. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02912.x>
- Jin, C., Wu, X., & Zhang, Y. (2013). Relationship between antioxidants and acrylamide formation : A review. *Food Research International*, 51, 611–620.
- Knol J, Van Loon W, Linssen J, Ruck a, Van Boekel M, V. A. (2005). Toward a Kinetic Model for Acrylamide Formation in a Glucose – Asparagine Reaction System. *Agricultural and Food Chemmistry.*, 53, 6133–6139.
- Kukurová, K., Morales, F., & Bednáriková, A, Ciesarová, Z. (2009). Effect of L-asparaginase on acrylamide mitigation in a fried-dough pastry model. *Molecular Nutrition & Food Research*, 53(12), 1532–1539. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200800600>
- Kumar, P, Ngadi, M, Chinnan, M. (2010). *Breaded fried foods*. (L. CRC Press, Taylor and Francis Group, Ed.).
- Lehotay, S., Son, K., Kwon, H., Koesukwiwat, U., Fu, W., Mastovska, K., ... Leepipatpiboon, N. (2010). Comparison of QuEChERS sample preparation methods for the analysis of pesticide residues in fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A.*, 1217(16), 2548–2560. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.044>
- Li, D, Chen, Y, Zhang, Y, Baiyi L, C. J., & Wu, X, Zhang, Y. (2012). Study on mitigation of acrylamide formation in cookies by 5 antioxidants. *Journal of Food Science.*, 77(11), C1144-9. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2012.02949.x>

- Liu, Y., Wang, P., Chen, F., Yuan, Y., Zhu, Y., Yan, H., & Hu, X. (2015). Role of plant polyphenols in acrylamide formation and elimination, *186*, 46–53.
- Lupano, C. E. (2013). *Modificaciones de componentes de los alimentos: cambios químicos y bioquímicos por procesamiento y almacenamiento* (1a ed.). La Plata: Universidad Nacional de La Plata: Edulp.
- Manzur, F., Alvear, C., & Alayón, A. (2009). Consumo de ácidos grasos trans y riesgo cardiovascular. *Rev. Colomb. Cardiol*, *16*(3), 103–111. Retrieved from <http://bases.bireme.br/cgi-bin/wxislind.exe/iah/online/?IsisScript=iah/iah.xis&src=google&base=LILACS&lang=p&nextAction=lnk&exprSearch=534570&indexSearch=ID>
- Marcano, J., La Rosa, Y., & Salinas, N. (2010). Influencia del proceso de fritura en profundidad sobre el perfil lipídico de la grasa contenida en patatas tipo “french”, empleando oleina de palma. *Grasas Y Aceites*, *61*(1), 24–29. <http://doi.org/10.3989/gya.053309>
- Masson, L, Muñoz, JR, Romero, N, Conrado, C, Encina, C, Hernández, L, Castro, J, Robert, P. (2007). Acrilamida en patatas fritas: revisión actualizada. *Grasas Y Aceites*, *58*(2), 185–193. Retrieved from <http://www.captura.uchile.cl/handle/2250/14361>
- Mba, O. I., Dumont, M.-J., & Ngadi, M. (2015). Palm Oil: Processing, Characterization and Utilization in the Food Industry – A Review. *Food Bioscience*, *10*, 26–41. <http://doi.org/10.1016/j.fbio.2015.01.003>
- Mesias, M., & Morales, F. J. (2016). *Acrylamide in Bakery Products. Acrylamide in*

Food. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00007-3>

Morales V, N. D. (2001). *Diseño de un Sistema de Riesgos y Puntos Críticos de Control ( HACCP ) para la Línea de Producción de Donas.*

Moreno, IM, Rubio C, Gutiérrez, AJ, C. A., & Hardisson De La Torre, A. (2007). La acrilamida , contaminante químico de procesado: Revisión. *Revista de Toxicología.*, 24(1), 1–9.

Moreno, S, Ruiz, B, Pérez, L., & Belmonte, S. (2014). CONTENIDO DE ÁCIDOS GRASOS TRANS EN ALIMENTOS COMERCIALIZADOS EN LA COMUNIDAD DE MADRID (ESPAÑA). *Nutrición ...*, 29(1), 180–186. <http://doi.org/10.3305/nh.2014.29.1.6980>

Mottram, D. S., Low, M. Y., & Elmore, J. S. (2005). The Maillard reaction and its role in the formation of acrylamide and other potentially hazardous compounds in foods, (April 2002). <http://doi.org/10.1533/9781845692018.1.3>

Murillo, M. (2010). fritura para la obtención de chips de oca (*Oxalis tuberosa*, Mol) a diferentes temperaturas y tiempos, utilizando dos empaques a dos condiciones de almacenamiento., 4–36. Retrieved from <http://repositorio.utc.edu.ec/handle/27000/896>

Murniece, I, Karklina, D, Galoburda, R, Santare, D. (2013). Risk Assessment of Acrylamide Intake from Deep-Fat Fried Potatoes in Latvia. *Nternational Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*, 3(4), 318–321. <http://doi.org/10.7763/IJBBB.2013.V3.222>

Napolitano, A, Morales, F., & Sacchi, R, Fogliano, V. (2008). Relationship between

- virgin olive oil phenolic compounds and acrylamide formation in fried crisps. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.*, 56, 2034–40. <http://doi.org/10.1021/jf0730082>
- Ozkaynak, E, G. O. (2009). Effects of various cooking conditions on acrylamide formation in rolled patty. *Food Additives & Contaminants.*, 26(6), 793–799. <http://doi.org/10.1080/02652030902780257>
- Pacetti, D., Gil, E., Frega, N., Álvarez, L., Dueñas, P., Garzón A, & Lucci, P. (2015). Acrylamide levels in selected Colombian foods. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 1–7. <http://doi.org/10.1080/19393210.2014.995236>
- Palazoğlu, TK, Savran, D, Gökmen, V. (2010). Effect of cooking method (baking compared with frying) on acrylamide level of potato chips. *Journal of Food Science.*, 75(1), E25-9. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01389.x>
- Pavesi A, Toledo, MC, Govaert, Y, Van Loco, J., & Fraselle, S, Weverbergh, E, Degroot, J. M. (2007). Determination of acrylamide levels in selected foods in Brazil. *Food Additives and Contaminants*, 24(3), 236–41. <http://doi.org/10.1080/02652030601053170>
- Percival, A. (2004). Los ácidos grasos trans: debate entre la industria de alimentos, científicos y consumidores. *Revista Palmas*, 25, 69–77. Retrieved from <http://temporal-fedepalma-ojs.biteca.com/index.php/palmas/article/view/1023>
- Restrepo, L. (2015). (Material de clase: grasas y aceites).
- Ribani, M., Collins, C., & Bottoli, C. (2007). Validation of chromatographic methods: evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in

omeprazole. *Journal of Chromatography. A*, 1156, 201–205.  
<http://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.080>

Rincón, SM.; Martínez, D. (2009). Análisis de las propiedades del aceite de palma en el desarrollo de su industria. *PALMAS*, 30(2), 11–24.

Roccia, P. (2011). *Uso de enzimas y oxidantes en productos de panificación fortificados. estudio de las propiedades físico- químicas y funcionales*. La Plata : Universidad Nacional de La Plata.

Rodríguez, GC, Zuluaga, CL, Puerta LF, Ruiz, L. (2013). Evaluación de parámetros físicoquímicos en el proceso de fritura de banano osmodeshidratado. *Biotecnología En El Sector Agropecuario Y Agroindustria.*, 11(1), 123–129.  
Retrieved from <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol11-1/EVALUACION DE PARAMETROS FISICOQUIMICOS.pdf>

Rodriguez, E., Fernández, A., & Ayala, A. (2005). Reología y textura de masas: Aplicaciones en trigo y maíz. *Ingeniería E Investigación*, 25(1), 72–78. Retrieved from <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=64325110>

Romero I, Sansano M, Heredia AB, A. A. (2016). *Evolución del contenido en acrilamida durante el proceso digestivo de distintos alimentos*. UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA.

Ruiz, V. (2009). Ácidos grasos trans. Recomendaciones para reducir su consumo. *Revista Cubana de Alimentación Y Nutrición.*, 19(2), 364–369.

Shipp, A, Lawrence, G, Gentry, R, McDonald, T., Bartow, H, Bounds, J, Macdonald, N, Clewell, H., & Allen, B, Van Landingham, C. (2006). Acrylamide: review of toxicity

- data and dose-response analyses for cancer and noncancer effects. *Critical Reviews in Toxicology.*, 36, 481–608. <http://doi.org/10.1080/10408440600851377>
- Stadler, R., & Studer, A. (2016). Acrylamide Formation Mechanisms. In *Acrylamide in food Analysis, Content and potential Health Effects* (pp. 1–17). Ankara: Academic Press - Elsevier. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00001-2>
- Suaterna Hurtado, A. (2009). La fritura de los alimentos: el aceite de fritura. *Perspectivas En Nutrición Humana*, 11(1), 39–53.
- Tan, K. J., & Mittal, G. S. (2006). Physicochemical Properties Changes of Donuts During Vacuum Frying. *International Journal of Food Properties*, 9(1), 85–98. <http://doi.org/10.1080/10942910500473947>
- Thomas, J, Crawford, M, Elmadfa, I, et al. (2012). Grasas y ácidos grasos en nutrición humana. Consulta de expertos. Retrieved from <http://www.fao.org/docrep/017/i1953s/i1953s.pdf>
- Uauy, R, Torrejón, C. (2011). Calidad de grasa, arterioesclerosis y enfermedad coronaria: efectos de los ácidos grasos saturados y ácidos grasos trans. *Revista Médica de Chile.*, 139, 924–931.
- Valenzuela, A. (2008). Ácidos grasos con isomería trans I: Su origen y los efectos en la salud humana. *Revista Chilena de Nutrición*, 35(3), 162–171. Retrieved from [http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182008000300001&script=sci\\_arttext&tlng=pt](http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0717-75182008000300001&script=sci_arttext&tlng=pt)
- Vélez, J. F., & Sosa, M. E. (2003). Evaluation of physical properties of dough of donuts during deep-fat frying at different temperatures. *International Journal of Food*

*Properties*, 6(2), 341–353. <http://doi.org/10.1081/JFP-120017813>

- Wenzl, T, De la Calle, B, Gatermann, R, Hoenicke, K, Ulberth, F, Anklam, E. (2004). Evaluation of the results from an inter-laboratory comparison study of the determination of acrylamide in crispbread and butter cookies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 379, 449–57. <http://doi.org/10.1007/s00216-004-2591-4>
- Xu F, Elmore J, O. M. (2016). The use of asparaginase to reduce acrylamide levels in cooked food. *Food Chemistry*, 210, 163–171.
- Yuan, Y., Chen, F., Zhao, G., Liu, J., Zhang, H., & Hu, X. (2007). A comparative study of acrylamide formation induced by microwave and conventional heating methods. *Journal of Food Science*, 72(4), C212-6. <http://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2007.00332.x>
- Zapata, A., Vanegas, L. S., & Rojano, B. (2014). Oleína De Palma Estabilizada Con Antioxidante Natural De Romero En Un Proceso Discontinuo De Fritura. *Información Tecnológica*, 25(2), 131–140. <http://doi.org/10.4067/S0718-07642014000200015>
- Zhang, Y., & Cheng, J. (2016). *Relationship between Antioxidants and Acrylamide Formation. Acrylamide in Food*. Elsevier Inc. <http://doi.org/10.1016/B978-0-12-802832-2.00017-6>
- Zhang, Y., Zhang, G., & Zhang, Y. (2005). Occurrence and analytical methods of acrylamide in heat-treated foods, Review and recent developments. *Journal of Chromatography A*, 1075(1–2), 1–21. <http://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.03.123>

Zhuang, H, Zhang, T, Liu, J, & Yuan, Y. (2012). Detection of acrylamide content in traditional Chinese food by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method. *CyTA-Journal of Food*, 10(1), 36–41.