

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS



***EFFECTO DE LA ASPARAGINASA EN LA DISMINUCIÓN
DE LOS NIVELES DE ACRILAMIDA PRESENTES EN
SOPAIPILLA.***

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al grado de Magíster en alimentos, mención gestión, calidad e inocuidad de los alimentos por:

NICOLÁS CARVAJAL REYES

Director de Tesis: María Salomé Mariotti Celis

Santiago-CHILE

Septiembre 2015

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

INFORME DE APROBACIÓN DE TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Dirección de la Escuela de Graduados de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas que la Tesis de Magíster presentada por el candidato:

NICOLÁS CARVAJAL REYES

Ha sido aprobada por la Comisión Evaluadora de Tesis, como requisito para optar al grado de Magíster en alimentos, mención gestión, calidad e inocuidad de los alimentos: en el examen público rendido el día:

Director de Tesis:

Dra. Eng. María Salomé Mariotti

Co-directores de Tesis:

M.S.c. Andrea Bunguer

Dr.Eng. Franco Pedeschi

Comisión Evaluadora de Tesis:

Dra. Paz Robert Canales

Dra. Inés Urquiaga

Dra. Paula Jiménez

LA PRESENTE TESIS ES PARTE DEL
PROYECTO FONDEF D10I1109 TITULADO:

“Minimización de la formación de acrilamida
en alimentos amiláceos de consumo masivo
en Chile”.

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mi directora de tesis, María Salomé Mariotti por su constante apoyo y dedicación durante el desarrollo de esta tesis; por sus valiosos aportes e incentivar constantemente la búsqueda de conocimiento.

A mi codirectora, Andrea Bunger, por su gran apoyo, guía y ayuda oportuna durante el desarrollo de esta tesis; y la enorme colaboración en las correcciones que sin su ayuda habría sido imposible terminar. Al Profesor Franco Pedreschi por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis de maestría en su laboratorio y la constante preocupación por el bienestar de sus estudiantes.

Además agradezco a Juan Pablo Gómez por su inmenso aporte técnico y científico, su excelente disposición a colaborar en cualquier momento y su amistad. También a Camila Muñoz por su amistad, colaboración y apoyo en el desarrollo de esta tesis.

Agradezco a mis papas Lucy del Carmen Reyes y Álvaro Carvajal por siempre tener una palabra de aliento y por enseñarme que la perseverancia y el trabajo constante vencen cualquier obstáculo.

A mi esposa Laura Santos por siempre confiar en mi y brindarme un apoyo incondicional en todo momento.

A mi hermana Mariela Gaete por sus palabras de aliento, su constante preocupación por mi bienestar y estar presente en todo momento.

A mi abuela Lucinda Araya y a la memoria de mi Tío Juan Reyes quien me enseñó a disfrutar las cosas simples de la vida.

Agradezco a mi comisión de tesis por sus relevantes correcciones y guía oportuna para que esta investigación resultara exitosa.

Finalmente expreso mis agradecimientos a los proyectos FONDEF D10I1109 titulado “Minimización de la formación de acrilamida en alimentos de consumo masivo en Chile” por el financiamiento para la realización de esta tesis. Y a todas las personas de la Universidad de Chile y Pontificia Universidad Católica que me prestaron ayuda.

Índice

1	Resumen	i
2	Abstract	ii
3	Introducción	1
4	Antecedentes bibliográficos	2
4.1	Materiales para la elaboración de sopaipillas.	2
4.1.1	Zapallo (<i>Cucurbita maxima</i> Duch).....	2
4.1.2	Harina de trigo.....	3
4.1.3	Aceite	4
4.1.4	Manteca	5
4.1.5	Sal.....	5
4.1.6	Leudante químico.....	6
4.2	Contaminante estudiado (Acrilamida).....	6
4.3	Asparagina	6
4.4	Generación de acrilamida.....	7
4.5	Efectos de la acrilamida sobre la salud.	11
4.6	Método de reducción de acrilamida: Uso de L-asparaginasa.....	11
4.7	Visión computacional.	13
5	Hipótesis	14
6	Objetivo general	15
7	Objetivos específicos.....	16
8	Metodología	17
8.1	Formulación de las sopaipillas	17
8.2	Materias primas y pasos previos a la preparación de las muestras.	17
8.3	Procesamiento del zapallo	18
8.4	Elaboración de las muestras de sopaipillas	18
8.5	Método de análisis de acrilamida.	19
8.6	Generación de acrilamida.....	21
8.7	Efecto de la asparaginasa en la concentración de acrilamida.	23
8.8	Desarrollo de color y generación de acrilamida.	23
8.8.1	Validación del modelo generado.....	25
9	Resultados.	26
9.1	Método de medición de acrilamida.....	26
9.2	Efecto de la adición de L-asparaginasa en la concentración de aminoácidos.	29
9.3	Efecto de la adición de asparaginasa en la concentración de acrilamida.....	35

9.4	Relación de generación de color y generación de acrilamida.....	36
10	Conclusiones.....	41
11	Referencias	42
12	Anexos.	48

Índice tablas

Tabla 1. Composición nutritiva de 100 g de zapallo cocido.	2
Tabla 2. Requerimientos de Composición de la harina de trigo	3
Tabla 3. Composición de ácidos grasos de diversos aceites de semilla de girasol (clasificación según sus cantidades de ácido oleico).....	5
Tabla 4. Formulación para la elaboración de sopaipillas.	17
Tabla 5. Condiciones del GC-MS para la medición de acrilamida.	21
Tabla 6. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 1.....	22
Tabla 7. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 2.....	22
Tabla 8. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 3.....	22
Tabla 9. Resumen del total de muestras elaboradas por cada tiempo de fritura.	23
Tabla 10. Condiciones de reposo y concentración de asparaginasa,.....	23
Tabla 11. Triplicado de medición de acrilamida en masa frita de sopaipilla.	26
Tabla 12. Concentración de aminoácidos en masa cruda y frita de sopaipilla sin adición de L-asparaginasa (control).....	29
Tabla 13. Concentración de aminoácidos en masa cruda de sopaipilla luego de diversos tiempos de reposo y adiciones de asparaginasa.	31
Tabla 14. Concentración de aminoácidos en masa frita de sopaipilla.	34
Tabla 15. Concentración de acrilamida en muestras tratadas con diferentes niveles de asparaginasa y tiempos de reposo.....	36

Índice figuras

Figura 1. Molécula de acrilamida.	6
Figura 2. Molécula de asparagina	7
Figura 3. Esquema de formación de acrilamida mediante oxidación de ácidos grasos.	9
Figura 4. Esquema de formación de acrilamida mediante la reacción de Maillard	10
Figura 5. Proceso de fritura de sopaipillas.	19
Figura 6. Esquema de Clean-up generado para el análisis de sopaipillas por GC-MS.	20
Figura 7. Puntos de medición para parámetros de color L, a, b con colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus.	24
Figura 8. Sistema de procesamiento de imágenes de vision por computador. .	24
Figura 9. Cromatograma generado al inyectar 25 ppb de estándar de acrilamida	27
Figura 10. Cromatograma generado al inyectar una muestras utilizando el método planteado por Ciesarová y cols (2006).	27
Figura 11. Cromatograma resultante de la medición, aplicando la metodología planteada en esta tesis.	28
Figura 12. Efecto de la fritura en los niveles de asparagina en sopaipilla.	30
Figura 13. Efecto de la fritura en los niveles de ácido aspártico en sopaipilla. ...	30
Figura 14. Efecto de la asparaginasa en el contenido de asparagina en la masa cruda sin reposo.	32
Figura 15. Efecto de la asparaginasa en el contenido de ácido aspártico en la masa cruda.	33
Figura 16. Efecto de la asparaginasa en el contenido de asparagina en la masa frita.	34

Figura 17. Efecto de la adición de asparaginasa en la masa cruda y masa frita sobre la asparagina.	35
Figura 18. Generación de acrilamida, en diversos tiempos de fritura.....	37
Figura 19. Variación de L* con el tiempo de fritura	38
Figura 20. Variación de b* con el tiempo de fritura	39
Figura 21. Variación de a* con el tiempo de fritura.	39
Figura 22. Correlación de concentración de acrilamida con parámetros de color seleccionados específicos para la sopaipilla.	40

1 Resumen

Los alimentos de origen amiláceo procesados a altas temperaturas (fritura y horneado), contienen compuestos considerados probables carcinogénicos tales como la acrilamida, cuyos principales precursores son los azúcares reductores y la asparagina.

Uno de los métodos más efectivos en la reducción de acrilamida es el uso de la enzima L-asparaginasa. Esta enzima reacciona directamente con la asparagina.

El objetivo de este trabajo fue reducir la concentración de acrilamida en sopaipillas fritas mediante el uso de la enzima L-asparaginasa, variando tiempos de reposo y concentración de la enzima; además realizar un modelo predictivo de formación de acrilamida que relacione la generación de color y la aparición del contaminante.

Basado en la bibliografía, se definió un rango de concentración de 60 a 1000 ppm (mg asparaginasa/kg harina) y un rango de tiempos de reposo de la masa de 0 a 30 minutos, se corrió un diseño de cribado con cinco variables de respuesta (concentración de acrilamida, concentración de asparagina en la masa cruda y frita, y concentración de ácido aspártico en masa cruda y frita).

Las sopaipillas se elaboraron con una receta optimizada desde el punto de vista sensorial y se frieron a $170 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 minutos; en el caso de las muestras, para determinar la generación de acrilamida la temperatura se mantuvo constante y los tiempos se variaron desde los 130 segundos hasta los 250 segundos con incrementos de 30 segundos entre cada medición.

La adición de L-asparaginasa demostró ser un método efectivo para disminuir el contenido de acrilamida en sopaipillas; en todos los niveles de adición de L-asparaginasa, independiente de los tiempos de reposo, generó una reducción de acrilamida a concentraciones menores a los 25 ppb. Se desarrolló un método de "*clean-up*" que permitió el análisis de las muestras de sopaipillas mediante GC-MS y se determinó un modelo de formación de acrilamida en sopaipillas que permitió relacionar la generación de color con la aparición de acrilamida, este modelo predictivo tiene un coeficiente de correlación de 0,8912.

2 Abstract

Effect of the addition of asparaginase in the formation of acrylamide in sopaipillas

Foods rich in carbohydrates subjected to high temperature processes (frying or baking), contain potential carcinogenic compounds such as acrylamide, whose mainly precursors are reducing sugars and asparagine.

One of the most effective methods for reducing acrylamide is the use of the enzyme L-asparaginase. This enzyme reacts directly with the asparagine that is the most important precursor in the formation of acrylamide.

The objective of this thesis was to reduce the concentration of acrylamide in fried sopaipillas using the enzyme L-asparaginase, varying the resting time and the concentration of the enzyme added to the dough. Also with the information gathered the thesis sought to generate a predictive model for the formation of acrylamide that relates the generation of color and the appearance of the studied contaminant.

Based on literature review a range of concentrations from 60 to 1000 ppm (mg asparaginase/Kg Flour) and a range of resting time for the dough from 0 to 30 minutes were defined. Using statgraphics® software a screening design with five response variables (acrylamide concentration, asparagine concentration in fried and raw dough, and aspartic acid concentration in fried and raw dough) was run.

The sopaipillas were manufactured using a recipe optimized by a sensory panel and fried at $170^{\circ}\text{C} + 1^{\circ}\text{C}$ for 3 minutes. For the samples used in the determination of acrylamide generation the temperature was maintained constant and the frying time varied from 130 seconds to 250 seconds with 30 second of increase between each measurement.

The addition of L-asparaginase demonstrated to be an effective method to diminish the acrylamide content in fried sopaipillas; in every level of addition of L-asparaginase, independent of the resting times, a reduction below 25 ppm of acrylamide was obtained. A clean-up method that allows the analysis of sopaipilla samples by GC-MS was developed and, a model of acrylamide generation on sopaipillas was determined. This model allows relating the color

development with the generation of acrylamide. This predictive model has a correlation coefficient of 0,8912.

3 Introducción

Desde hace algunos años, se ha detectado la presencia de compuestos tóxicos en diversos alimentos procesados a altas temperaturas. Dentro de este grupo de sustancias dañinas para la salud, la acrilamida es uno de los contaminantes más importantes encontrados (Capuano y cols., 2011). Según IARC (Agencia internacional de investigación sobre el cáncer por sus siglas en inglés) la acrilamida está clasificada en el grupo 2A como probablemente carcinogénico para humanos, este compuesto está presente en gran cantidad en los alimentos con alto contenido de almidones procesados a altas temperaturas (Pedreschi y cols., 2011), como por ejemplo las *sopaipillas*. Ya en junio de 2002 la FAO emitió un reporte titulado: “Implicancias a la salud por la presencia de acrilamida en alimentos: reporte de la consulta de la unión FAO/WHO”, en el cual se recopila la información más relevante sobre la acrilamida en alimentos y, finalmente, se llega a varias recomendaciones, una de ellas es que “se debe investigar la posibilidad de reducir los niveles de acrilamida en los alimentos cambiando bien sea la formulación, el procesamiento o mediante otras prácticas”, es ahí donde queda enmarcado este proyecto de investigación.

Frente a esta situación, el presente proyecto de investigación propuso desarrollar una metodología de mitigación de acrilamida en la elaboración de *sopaipillas*. Se propuso reducir la cantidad de asparagina, aminoácido precursor que reacciona con los azúcares reductores (glucosa y fructosa), mediante el uso de la enzima L-asparaginasa, y de esta forma poder disminuir la generación de acrilamida.

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, dan luces sobre el uso de la enzima y sus posibles aplicaciones en diversas matrices alimenticias, que por sus características de composición y procesamiento puedan tener niveles elevados de acrilamida. En cuanto a la relación establecida mediante visión computacional, se generó un modelo de predicción de la concentración de acrilamida basado en el color de las imágenes adquiridas.

También es importante mencionar que estos resultados representan un impacto positivo en la inocuidad de este tipo de productos alimentarios, disminuyendo las concentraciones nocivas de este contaminante.

4 Antecedentes bibliográficos

4.1 Materiales para la elaboración de sopaipillas.

4.1.1 Zapallo (*Cucurbita maxima* Duch).

El género *Cucurbita* está dividido en cuatro especies que se cultivan para la obtención de zapallo maduro (*C. maxima*, *C. moschata*, *C. mixta* y *C. pepo*). De las cuatro especies de zapallo que se cultivan en el mundo, la de mayor importancia en Chile es *Cucurbita maxima* Duch, que corresponde al tradicional zapallo tipo camote o de guarda. Representa desde hace años una fuente de alimentación importante para la población, además de ser utilizado en la elaboración de sopaipillas. Su adaptación a largos períodos de guarda permite que esté disponible prácticamente todo el año, ya sea como producto fresco en verano o de guarda durante los meses invernales (Valencia, 2005; Ahumada, 2011).

Tabla 1. Composición nutritiva de 100 g de zapallo cocido.

Componente	Contenido	Componente	Contenido
Agua	89%	Sodio	1 mg
Carbohidratos	8,8 g	Vitamina A	357 UI
Proteína	1 g	Tiamina	0,08 mg
Lípidos	0,5 g	Caroteno	0,32 mg
Calcio	14,2 mg	Riboflavina	0,02 mg
Fósforo	20,1 mg	Niacina	0,69 mg
Fierro	0,34 mg	Ácido ascórbico	9,8 mg
Potasio	439 mg	Valor energético	39,2 cal

Fuente: Valencia, 2005.

Las zonas de mayor área plantada, son la Región Metropolitana y la Región de O'Higgins (ODEPA, 2015). Aunque su producción disminuye año a año, continúa siendo una de las hortalizas con mayor número de hectáreas plantadas, junto con el choclo, la lechuga y el tomate. El zapallo puede ser considerado como una fuente completaría de calcio, vitamina A y ácido ascórbico. Este último se comporta como azúcar reductor en la reacción de Maillard (Rydberg y cols., 2003), lo que posiblemente puede incrementar los niveles de acrilamida presentes en la sopaipilla.

4.1.2 Harina de trigo

Por harina de trigo se entiende el producto elaborado con granos de *Triticum aestivum vulgare*, en que por medio de procedimientos de trituración o molienda se separa parte del salvado y del germen, y el resto se muele hasta darle un grado adecuado de finura, previa separación de impurezas (CODEX, 1985; RSA, 1996).

Según el Reglamento Sanitario de los Alimentos (1996), la composición de una harina debe cumplir con:

Tabla 2. Requerimientos de Composición de la harina de trigo

Requerimiento	Valor de referencia
Humedad	Máximo 15%
Acidez ¹	Máximo 0,25%
Cenizas ²	Máximo 0,65
Fibra cruda ²	Máximo 0,4%
Materias nitrogenadas ²	Mínimo 7%
Color	Blanca, marfil o ligeramente amarillenta.
Tiamina	6,3 mg/kg
Riboflavina	1,3 mg/kg
Niacina	13,0 mg/kg
Hierro	30,0 mg/kg

Fuente: RSA, 1996.

La harina de trigo contiene entre un 65 y un 70% de almidón y un 2% de lípidos, pero su valor nutritivo fundamental está en su contenido de proteínas constituidas por gluteninas y gliadinas, las cuales constituyen 10 a 14% de las proteínas del grano. La celulosa, los lípidos y el azúcar representan menos de un 4%. Las gliadinas y gluteninas componen el gluten, que es el responsable de lograr el desarrollo del volumen y de una miga esponjosa. El hinchamiento del gluten permite la formación de una masa moldeable y resistente, sobre todo a los gases de la fermentación, producidos por la levadura o liberados por los agentes leudantes químicos (Díaz y cols., 2006).

¹ Expresada en ácido sulfúrico, sobre la base de 14,0% de humedad.

² Sobre la base de 14,0% de humedad.

4.1.3 Aceite

El proceso de fritura usa grasas y aceites como medio de transferencia de calor al producto. Un buen alimento frito se obtiene usando un aceite de buena calidad, que definido por el RSA (1996) es:

Los aceites y mantecas utilizados en la producción industrial e institucional de alimentos fritos, deberán tener un contenido máximo de ácido linolénico de un 2%. Podrán estar adicionados de antioxidantes y sinergistas autorizados en el Reglamento.

No deberán utilizarse los aceites o mantecas cuando sobrepasen los siguientes límites:

- a) Acidez libre expresada como ácido oleico superior al 2,5%
- b) Punto de humo inferior a 170°C
- c) 25% de compuestos polares como máximo.

Se prohíbe el uso de los aceites y mantecas provenientes de los procesos de fritura, descartados o reprocesados, en otros alimentos de uso humano (RSA 1996).

Se escoge el aceite de girasol o maravilla para realizar la fritura debido a su estabilidad. Se obtiene de la semilla de girasol mediante extracción mecánica y disolventes. En la Tabla 3 se muestra la composición de diversos tipos de aceite de girasol que varían en la cantidad de ácido oleico. El aceite de girasol alto oleico es rico en ácido oleico, ácido graso de principal interés, ya que da mayor estabilidad en procesos de fritura sin la necesidad de hidrogenar otros tipos de grasas para estabilizar estos aceites. Según CODEX STAN 210 (1999) se pueden tener tres niveles de ácido oleico: 14 a 39,4% para un aceite de girasol común, de un 43.1 a 71,8% para aceite de girasol medio oleico y un contenido de 75 a 90,70% para aceite de girasol alto oleico.

La razón de uso del aceite alto oleico es que este ácido graso no es precursor en la formación de acroleína, una de las rutas secundarias de generación de acrilamida, que se verá más adelante; además el aceite alto oleico tiene baja concentración de ácido linolénico, que también es un precursor de la acroleína producido por la oxidación lipídica (Tamura y cols., 1991). Al retirar esta posible vía de generación de acrilamida podemos garantizar que la acrilamida medida será producida por la ruta principal propuesta más adelante.

Tabla 3. Composición de ácidos grasos de diversos aceites de semilla de girasol (clasificación según sus cantidades de ácido oleico).

Ácidos grasos	Aceite de semilla de girasol	Aceite de semilla de girasol (medio oleico)	Aceite de semilla de girasol (alto oleico)
C12:0	ND ³ – 0.1	ND	ND
C14:0	ND -0.2	ND – 1	ND – 0.1
C16:0	5.0 – 7.6	4.0 – 5.5	2.6 – 5.0
C16:1	ND – 0.3	ND – 0.05	ND – 0.1
C17:0	ND – 0.2	ND – 0.05	ND – 0.1
C17:1	ND – 0.1	ND – 0.06	ND – 0.1
C18:0	2.7 – 6.5	2.1 – 5.0	2.9 – 6.2
C18:1	14.0 – 39.4	43.1 – 71.8	75 – 90.7
C18:2	48.3 – 74.0	18.7 – 45.3	2.1 – 17
C18:3	ND – 0.3	ND – 0.5	ND – 0.3
C20:0	0.1 – 0.5	0.2 – 0.4	0.2 – 0.5
C20:1	ND – 0.3	0.2 – 0.3	0.1 – 0.5
C22:0	0.3 – 1.5	0.6 – 1.1	0.5 – 1.6
C22:1	ND – 0.3	ND	ND – 0.3
C22:2	ND – 0.3	ND – 0.09	ND
C24:0	ND – 0.5	0.3 – 0.4	ND – 0.5

Adaptado de CODEX STAN 210-1999.

4.1.4 Manteca

Es la materia grasa utilizada en la elaboración de productos horneados o fritos. Las grasas hidrogenadas semisólidas y las mantecas vegetales pueden ser producidas a partir de un solo aceite o pueden ser elaboradas con una mezcla de aceites. En el proceso de horneado de masas existe una etapa crítica entre los 37,8°C y los 57,8°C, cuando la masa es muy blanda y bastante permeable a los gases; son las grasas de este tipo las que ayudan a evitar una mayor difusión de los gases, llevando a tener panes con mayor volumen, además de obtener productos más húmedos de buena textura, estructura celular y facilitar su manipulación y procesamiento (Bailey, 1984).

4.1.5 Sal

La sal tiene tres propósitos principales en las masas, el principal es proveer sabor ya que la masa sin sal tendría un sabor plano e insípido; la sal también ayuda a reforzar la estructura del gluten, lo que permite que esta red

³ ND: No detectable

tridimensional retenga el dióxido de carbono eficientemente; y por último la sal ayuda a preservar el color y sabor (ACHIPAN, 2013).

4.1.6 Leudante químico

El polvo de hornear, también conocido como leudante químico, es una mezcla gasificante que gracias a la liberación de dióxido de carbono causa el hinchamiento de la masa. Según el RSA (1996), los polvos de hornear son aquellos productos formados de ácido carbónico y sus sales sódica, potásica, cálcica y amónica, pudiéndose adicionarles excipientes como material inerte.

4.2 Contaminante estudiado (Acrilamida).

La acrilamida es un molécula pequeña y simple (Figura 1); es un compuesto conformado por un amina unida a un grupo acilo, lo que conforma el grupo amida, el cual está unido a un radical etenilo y tiene un peso molecular de $71,08 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. En matrices alimentarias se puede formar por variadas y distintas rutas, en las que pueden estar involucrados carbohidratos, proteínas y aminoácidos, lípidos y posiblemente otros componentes minoritarios, pero es la reacción de Maillard la principal ruta de generación de este contaminante (Mottram y cols., 2002)

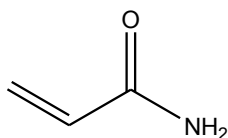


Figura 1. Molécula de acrilamida.

4.3 Asparagina

La asparagina es un aminoácido no esencial que está involucrado en el control metabólico de las funciones celulares en el tejido nervioso y tejido celular. Es sintetizada a partir del ácido aspártico y amoníaco mediante la enzima asparagina sintetasa (Gertz y Klostermann, 2002). La conversión de asparagina a ácido aspártico se realiza con facilidad, éste es uno de los procesos molecularmente asociados al envejecimiento. La asparagina es un sitio común para la unión de las glicoproteínas y carbohidratos (Díaz y cols., 2006), siendo este último factor, uno de los que incrementa la posibilidad de formar acrilamida cuando las masas son sometidas a procesos térmicos.

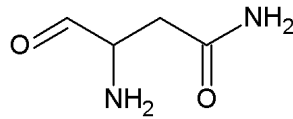


Figura 2. Molécula de asparagina

4.4 Generación de acrilamida.

Las vías más probables de generación de acrilamida son:

La formación mediante la degradación de lípidos producto de una oxidación de ácidos grasos (Gertz y Klostermann, 2002), o degradación de carbohidratos en acroleína o ácido acrílico (FAO, 2002; Stadler y cols., 2004). En la Figura 3 se evidencian las distintas rutas propuestas de degradación; en la reacción A se ve la hidrólisis de un ácido graso, en la reacción B se ve la ciclación del ácido graso y por último en la reacción C la degradación de un carbohidrato en la formación de acroleína precursor de la acrilamida.

La acrilamida también se forma mediante la reacción con azúcares reductores (glucosa y fructosa) y aminoácidos libres (asparagina) en la reacción de Maillard (Mariotti y cols., 2011; Stadler y cols., 2004; Gertz y Klostermann, 2002). La Figura 4 esquematiza el sistema de reacción de formación de acrilamida mediante la reacción con azúcares reductores y asparagina.

Por último, el documento de la FAO propone que la acrilamida se forma directamente por aminoácidos libres; aunque se demostró (Stadler y cols., 2004) que la asparagina por si sola sometida a altas temperaturas no forma cantidades considerables de acrilamida y es necesario la presencia de azúcares reductores como se indicó anteriormente.

Como lo menciona Mariotti y cols (2011), la vía más probable de generación de acrilamida en matrices alimenticias, es la reacción de asparagina con un azúcar reductor. Mottram y cols (2002) demostraron que la asparagina y la glucosa reaccionan en un medio de buffer fosfato a 185°C para formar acrilamida, y afirmaron que la reacción de Maillard es la principal ruta de generación de acrilamida. En otro experimento realizado por Amrein y cols (2004) se adicionaron 250 mg de asparagina a 1 kg de masa, lo que generó niveles cuatro veces mayores de acrilamida que las muestras control.

Zyzak y cols (2003) realizaron varios experimentos en un sistema acuoso en el que se simulaba una matriz alimenticia (formada por D-glucosa, maltodextrina,

emulsificante, almidón de papa y agua) y solo se variaba el aminoácido para determinar el impacto de éste en la generación de acrilamida. Se obtuvo que cuando no se adicionó aminoácido la concentración de acrilamida fue menor a 50 µg/kg; cuando se adicionó asparagina se generó la mayor concentración de acrilamida (9270 µg/kg); y cuando se retiró la D-glucosa pero se adicionó asparagina, se generó una baja concentración de acrilamida (117 µg/kg). Se probaron diversos aminoácidos pero ninguno generó concentraciones altas de acrilamida; lo que finalmente demuestra que el aminoácido relevante en la formación de acrilamida es la asparagina, y es uno de los precursores objeto a disminuir.

Como se mencionó anteriormente, el pH es uno de los factores relevantes en la generación de acrilamida, es por esto y según como lo afirma Kukurová y cols (2013), los leudantes químicos son los principales responsables de cambio en el pH de las masas. Dependiendo del tipo de leudante se reportó que algunos tienden a volver el pH más básico (Kukurová y cols., 2013), lo que lo convierte en un factor que debe ser analizado para determinar su injerencia en el comportamiento del pH en las masas de *sopaipilla*, como en las concentraciones finales de acrilamida.

En varios artículos (Kukurová y cols., 2013; Knol y cols., 2010; Gertz y Klostermann, 2002) se menciona que los pH bajos favorecen la formación de acrilamida, específicamente Knol y cols, (2010) afirman que la combinación de fructosa y un bajo pH resulta en una mayor producción de acrilamida, con un 3% de rendimiento general; y, la actividad de la L-asparaginasa se ve favorecida a pH cercanos a la neutralidad (Kukurová y cols., 2013).

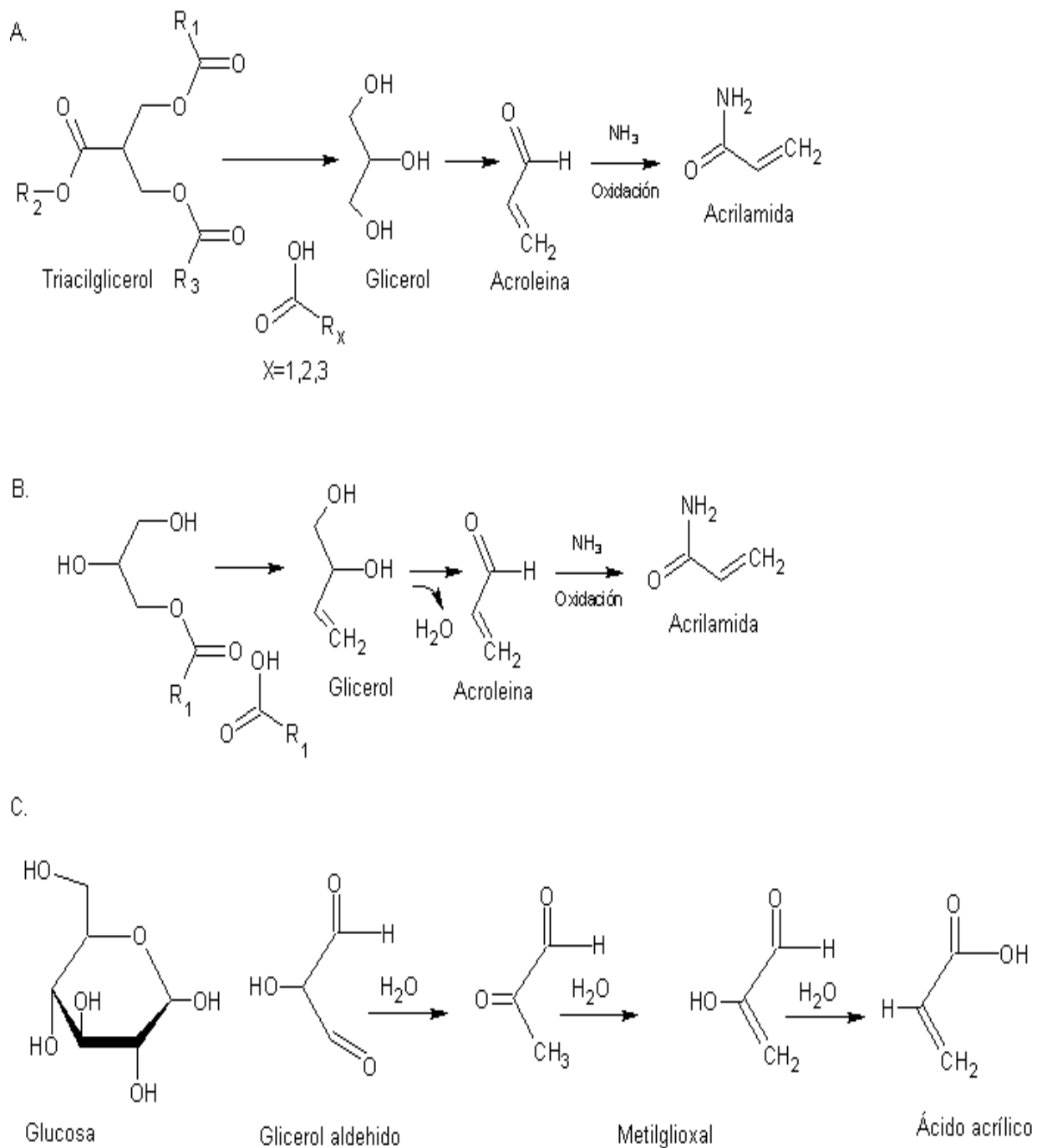


Figura 3. Esquema de formación de acrilamida mediante oxidación de ácidos grasos.⁴

⁴ Tomado de Gertz y Klostermann, 2002.

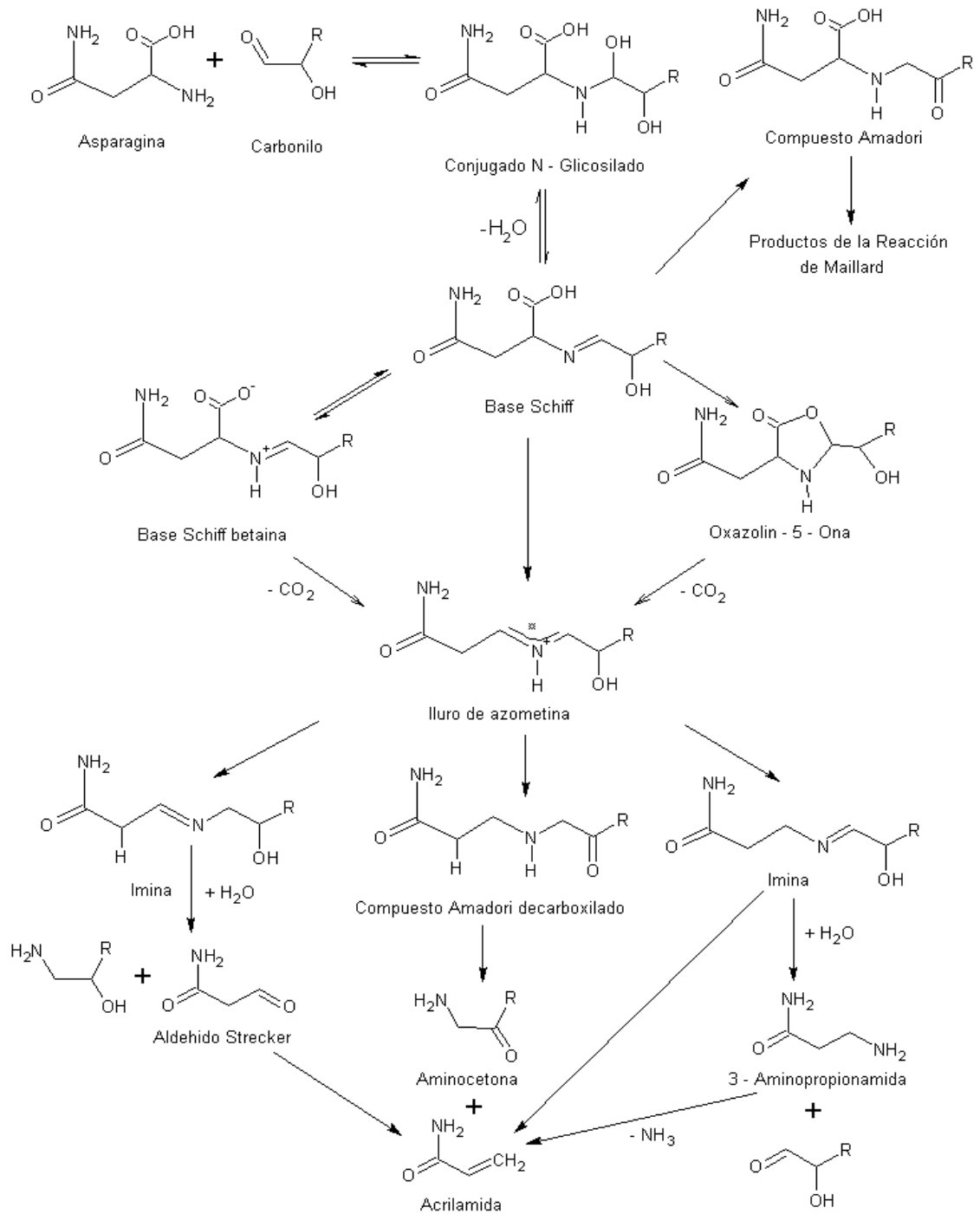


Figura 4. Esquema de formación de acrilamida mediante la reacción de Maillard⁵

⁵ Tomado de Knol, J., y cols, 2010.

4.5 Efectos de la acrilamida sobre la salud.

La acrilamida está clasificada en el grupo 2A (IARC, 1994) como compuesto probablemente cancerígeno, según la definición esto indica que su efecto cancerígeno está mediado por un mecanismo similar en los animales de estudio y en los seres humanos; es importante resaltar que en este estudio los resultados referidos a humanos están enfocados a la exposición aérea y tópica. Esta última es la de mayor ingreso al sistema en trabajadores de fábricas de procesamiento de monómero de acrilamida, sin embargo no hay datos referidos a la ingesta de acrilamida, ya que no se tomó en cuenta. Este mismo estudio indica la falta de datos sobre la absorción y metabolismo de ésta (*ibídem*).

En un estudio en ratas donde se le suministraron diferentes dosis de acrilamida en el agua durante 2 años, se reportaron diferentes incidencias de neoplasias. Entre las más frecuentes se encuentran: adenoma de la glándula harderiana (82% machos, 72% hembras), glándula mamaria (65% hembras), adenoma pulmonar alveolar/bronquial (40% machos, 42% hembras) (Beland y cols, 2013). Si bien los seres humanos no tenemos glándula harderiana u órgano similar, se puede ver que la acrilamida es cancerígeno en múltiples sitios. En humanos, el mecanismo de toxicidad aún no está completamente elucidado (Pedreschi y cols., 2014). La acrilamida se metaboliza por dos vías diferentes: la conjugación de glutatión y la epoxidación a glicinamida, esta última probó ser mutagénica en salmonella, ya que reacciona *in vitro* con ADN. Estos dos metabolitos se descubrieron por los experimentos realizados en ratas (Fennell y cols., 2005).

Aunque en todos estos estudios se hace aclaración que falta mayor comprensión sobre los mecanismos de tumorigenicidad de la acrilamida, la evidencia apunta a que este compuesto en dosis altas ($1,62 \mu\text{g Kg}^{-1}_{\text{pcd}^{-1}}$ hombres y $1,45 \mu\text{g Kg}^{-1}_{\text{pcd}^{-1}}$ mujeres) presenta un riesgo de desarrollar cáncer de 21 casos en hombres y 19 casos en mujeres por cada 10000 individuos (Dybing y Sanner, 2003), lo que según datos de la Sociedad Americana para el Cáncer (ACS) es comparable al riesgo de desarrollar cáncer de mama en hombre (0,13%) o desarrollar la enfermedad de Hodking en mujeres (0,20%).

4.6 Método de reducción de acrilamida: Uso de L-asparaginasa.

Las investigaciones afirman que la asparagina es, por encima de los azúcares reductores, el precursor más importante en la formación de acrilamida

(Kukurová y cols, 2009), es por esto que reducir este precursor es uno de los caminos lógicos para tomar.

La L-asparaginasa tiene como número EC de clasificación 3.5.1.1 y 3.5.1.2 y esto se refiere a una función molecular con actividad catalítica categoría hidrolasa que actúa en enlaces carbono nitrógeno (pero no en péptidos). En amidas lineales, la enzima hidroliza la asparagina en ácido aspártico (BRENDA, 2015), también actúa sobre la glutamina pero no sobre otro aminoácido, no tiene actividad en residuos de asparagina, en péptidos o proteínas. Se debe usar en la formulación antes del tratamiento térmico, luego del cual se debería inactivar, aunque no hay mediciones de asparaginasa luego de estos tratamientos (FAO/WHO, 2008). Es un medio efectivo de reducción de acrilamida, ya que elimina uno de los precursores relevantes que la generan mediante la reacción de Maillard (Mariotti y cols, 2011), además de ser un método práctico, ya que tratar de eliminar la acrilamida en el producto final resultaría poco factible y dañaría irreversiblemente la estructura del producto. La ventaja del uso de esta enzima es que se puede aplicar en todo tipo de proceso, ya sea por lotes, continuo o semi-continuo, y en una amplia gama de matrices alimenticias.

La reducción de acrilamida por el uso de esta enzima, reporta hasta un 90% (Kukurová y cols., 2009) en los niveles finales de acrilamida en masas fritas de harina de trigo, que van de la mano con una reducción de asparagina de entre un 96 % a un 97%, lo que también refuerza la necesidad de medir las concentraciones iniciales y finales de asparagina. De manera similar (Anese y cols., 2011), se reportan niveles de disminución de acrilamida de 58% a 68% en masas horneadas a base de harina de trigo. La disparidad en la reducción depende de varios factores, tales como la composición de la matriz del alimento, el nivel de agua, el contenido de materias grasas, factores de proceso, tipos de calentamiento, origen de la enzima y el pH; siendo este último un elemento relevante en la reducción efectiva de acrilamida, bien sea favoreciendo las condiciones de reacción naturales de la reacción de Maillard o modificando el comportamiento de la enzima (Anese y cols., 2011; Kukurová y cols., 2009; Kukurová y cols., 2013; Mariotti y cols., 2011).

En cuanto a la toxicidad de la L-asparaginasa, en 2008 el comité mixto FAO/WHO de expertos en aditivos alimentarios (JECFA por sus siglas en inglés) evaluó su potencial alérgico, comparando la secuencia de aminoácidos con los alérgicos listados en bases de datos públicos disponibles, y no

encontró ninguna secuencia similar tanto con toxinas como con alérgenos existentes. También se evaluó la exposición de ratas a esta enzima en un estudio de toxicidad a corto plazo, cuyos resultados no reportaron efectos relacionados con el tratamiento en la mortalidad, datos clínicos, oftalmoscopia, peso corporal, eficiencia en la conversión de alimentos, reacción sensorial o actividad motora. El único cambio relacionado con la dosis del tratamiento está referido al aumento de potasio en el plasma sanguíneo, pero como conclusión este cambio no tiene efecto toxicológico. En cuanto a la genotoxicidad, ésta resultó negativa (FAO/WHO, 2008).

4.7 Visión computacional.

La visión computacional es la construcción de descripciones explícitas y significativas de objetos a partir de imágenes; estas imágenes son obtenidas con un sensor físico de imagen transmitidas a una interfaz que traduce esta información que el software analiza según la tarea visual que se haya programado (Brosnan y Sun, 2004). La ventaja de esta técnica es que puede reemplazar los procesos de inspección de calidad realizados por personas, asegurando cumplir con los niveles deseados en los parámetros establecidos.

Como se ha mencionado anteriormente, la formación de acrilamida se da como resultado de la reacción de Maillard por la reacción directa de azúcares reductores y la asparagina presente en alimentos de origen amiláceo. En la reacción de Maillard también se generan compuestos que en algunos casos producen características deseadas de color, aroma y sabor, tales como melanoidinas, polímeros de color pardo cuyo mecanismo de formación no está completamente entendido (Gökmen y Şenyuva, 2006; Lu y Zheng, 2012). Ya que la medición de color se realiza de una forma sencilla, ésta se podría usar como indicador para obtener una relación entre los compuestos no coloreados generados en la reacción de Maillard como la acrilamida, y las tonalidades pardas generados en esta misma (Gökmen y Şenyuva, 2006; Lu y Zheng, 2012).

Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, lo que se busca en este proyecto es que, mediante un sistema de visión computacional de bajo costo, como el descrito por Pedreschi y cols (2007), se obtengan imágenes procesadas por visión computacional, para poder relacionar el contenido de acrilamida con el color que presenta la sopaipilla, apoyándose en las mediciones analíticas realizadas mediante el método propuesto por Ciesarová y cols (2006).

5 Hipótesis

Es posible reducir el contenido de acrilamida en sopaipillas, mediante el uso de asparaginasa.

6 Objetivo general

Determinar el efecto de la asparaginasa sobre el contenido de acrilamida en sopaipillas.

7 Objetivos específicos

1. Implementar una técnica de cuantificación de acrilamida específica para muestras de sopaipillas mediante GC-MS.
2. Determinar el efecto de adición de asparaginasa sobre la concentración de asparagina en la masa cruda de sopaipillas.
3. Medir el efecto de adición de asparaginasa (variando la concentración y el tiempo de reposo) sobre la formación de acrilamida en sopaipillas fritas.
4. Evaluar el desarrollo de pardeamiento no enzimático en sopaipillas, utilizando técnicas de visión computacional.

8 Metodología

8.1 Formulación de las sopaipillas

Para la receta y la elaboración de las sopaipillas se usó como referencia la memoria realizada por Ahumada (2011). Con el fin de garantizar que siempre se contara con una matriz estándar, las cantidades para un lote de 26 sopaipillas fue la siguiente:

Tabla 4. Formulación para la elaboración de sopaipillas.⁶

Ingredientes	Cantidad
Zapallo (puré)	123,2 g
Manteca	21,5 g
Agua	50 g
Harina	217,5 g
Sal	5,4 g
Polvos de hornear	6,5 g

8.2 Materias primas y pasos previos a la preparación de las muestras.

Zapallo: se usó zapallo tipo camote comprado en Supermercado Tottus como corte a granel.

Aceite: El tipo de aceite escogido fue aceite 100% maravilla alto oleico marca CF (Camilo Ferrón S.A.). El aceite fue almacenado a temperatura ambiente.

Manteca: Se utilizó manteca “Crucina Panadera” (Watts), la cual es una manteca emulsionada elaborada en base de aceites vegetales hidrogenados, grasa animal, agua y aditivos permitidos. Ésta se mantuvo refrigerada a 4°C hasta su uso.

Polvo de hornear, sal y harina: Se utilizó polvo de hornear Royal (Kraft Foods), sal Lobos (Sociedad Punta de Lobos S.A) y harina Selecta (Molino San Cristóbal). Estos ingredientes en polvo fueron almacenados a temperatura ambiente en envases sellados herméticamente para evitar intercambio gaseoso con el exterior y aumento de humedad.

⁶ Fuente: Ahumada, 2011

8.3 Procesamiento del zapallo

Luego de seleccionar el zapallo, éste se peló manualmente con cuchillo, eliminando su cascara y se trozó en cubos uniformes. Luego fue lavado para eliminar residuos, se homogenizaron los diferentes cortes, los cuales se pesaron por lotes de 115 ± 2 gramos y se cocieron a 100°C por 30 minutos en un litro de agua. Finalmente se molió con una procesadora de alimentos (Philips Hr1617) hasta obtener un puré que pesaba $123,2$ gramos ± 3 gr, el cual se almacenó en bolsas ziplock® a -20°C hasta su uso.

8.4 Elaboración de las muestras de sopaipillas

Todos los ingredientes de la Tabla 4 se pesaron en una balanza granataria (AND, modelo 4100, Japón). Primero en el tazón de la batidora eléctrica (Marca Kitchen Aid, Italia, con el gancho de amasado. Capacidad 4,3 L, 250 W) se pesaron los ingredientes secos, a los que se les agregó el agua a 80°C previamente hervida, la manteca derretida y el puré de zapallo, el cual se descongeló en el horno a 60°C por 1 h; los ingredientes se incorporaron por 1 minuto a la velocidad más baja, y luego se mezcló a velocidad media (80 rpm) por 5 minutos y a velocidad alta (140 rpm) por 5 minutos más. La masa resultante tenía una humedad de $40 \pm 2\%$ b.h. La masa se laminó (laminadora Marca Malta, Brasil. Modelo 1001, motor 1/4 HP), hasta un espesor de 4 mm y se moldeó en círculos, con un molde metálico de 5 cm de diámetro.

La fritura se realizó en una freidora eléctrica (Marca Súper Chacón F2-C, capacidad 18 L de aceite), que cuenta con un sistema de control de temperatura (Watlow, Serie SD).

En cada batch se frieron 4 sopaipillas, las cuales fueron distribuidas al interior de un sistema de rejilla-canastillo (Figura 5), de manera de asegurar que se mantuvieran sumergidas en posición horizontal durante todo el proceso.

La freidora se llenó con 4 L de aceite, con lo que la relación sopaipilla/aceite fue de ~ 16 g/L (considerando el peso de una sopaipilla cruda ~ 16 g), de tal forma que la temperatura del aceite permaneciera constante, con una variación de ± 2 $^{\circ}\text{C}$ de la temperatura fijada. Una vez terminado el proceso de fritura, se levantó la rejilla- canastillo y se drenó el exceso de aceite mediante vibración manual. Las sopaipillas se sacaron de sus respectivas canastillas y se colocaron sobre una superficie de papel absorbente. Se esperó que la temperatura bajara para realizar los distintos análisis.

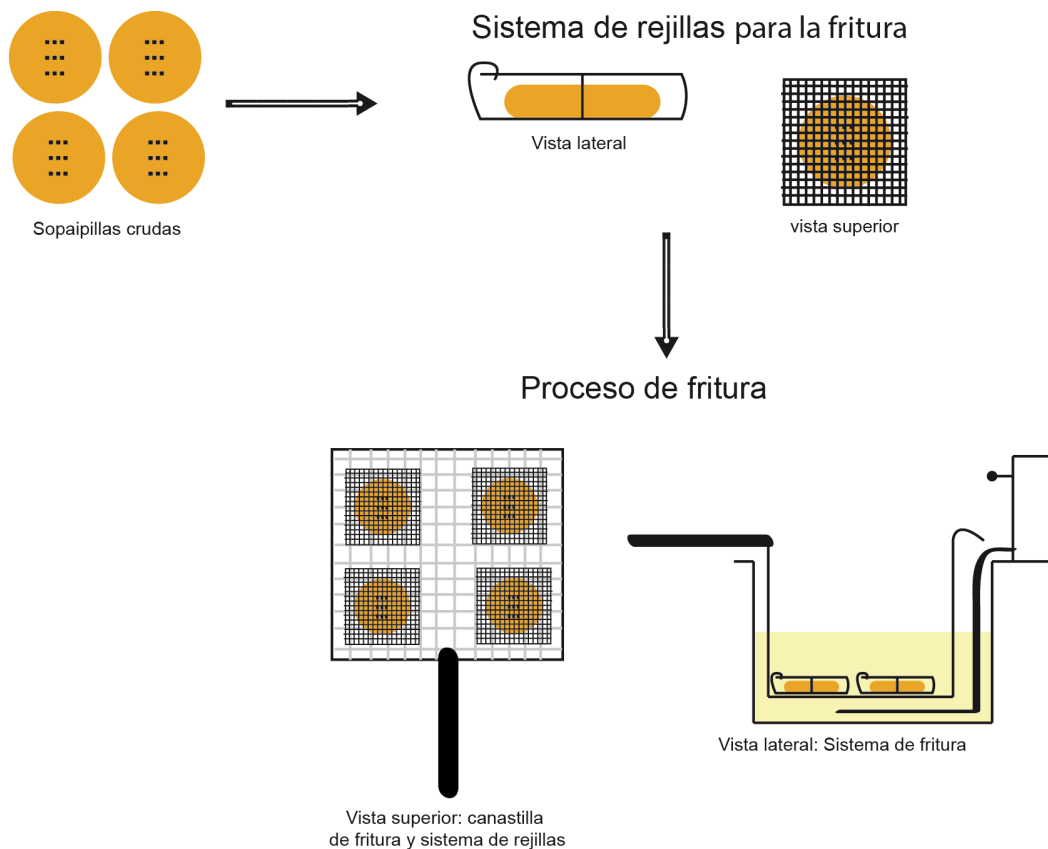


Figura 5. Proceso de fritura de sopaipillas.

8.5 Método de análisis de acrilamida.

Se desarrolló un método de análisis de acrilamida para GC-MS, si bien este equipo no es el más indicado para realizar el análisis de acrilamida ((Stadler y Scholz (2004), Gökmen y cols., (2009)), existen investigadores ((Gertz y Klostermann, 2002), Amrein y cols., (2004), Elmore y cols., (2005), Ciesarová y cols., (2006)) que desarrollaron métodos específicos para este equipo con resultados aceptables para la medición de acrilamida en alimentos (Biedermann y cols., 2002).

Se inició probando el método propuesto por Biedermann y cols., (2002) pero los resultados obtenidos variaban considerablemente entre inyecciones, lo que no lo hacía un método confiable para el análisis; luego de estos resultados se procedió a implementar el método planteado por Ciesarová y cols., (2006) (Anexo 1), con algunas modificaciones para ajustar los procedimientos a los equipos disponibles en el laboratorio. A continuación (Figura 6) se esquematiza el procedimiento realizado.

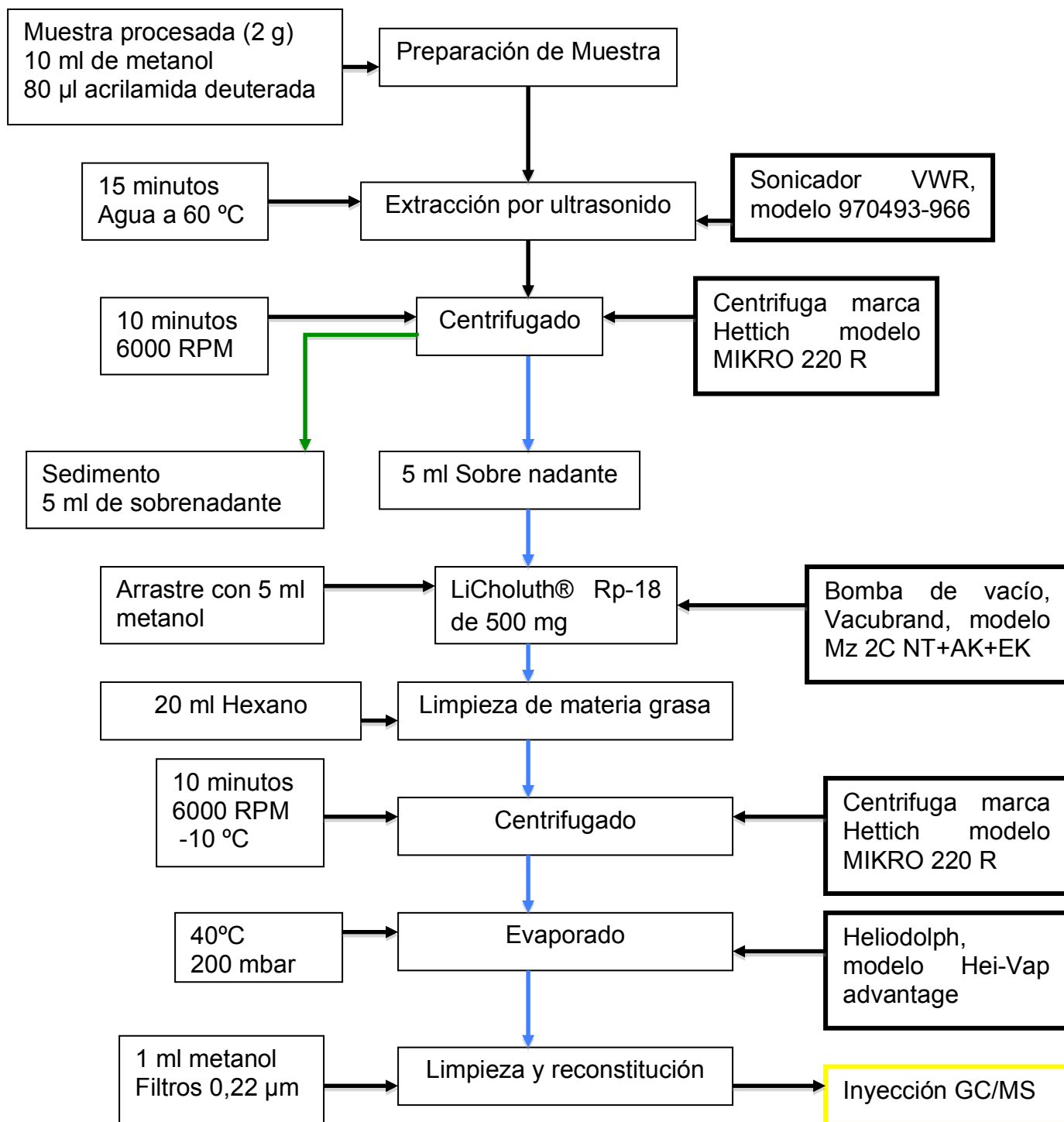


Figura 6. Esquema de Clean-up generado para el análisis de sopaipillas por GC-MS.

A continuación (Tabla 5) se muestran las condiciones usadas en el cromatógrafo de gases para la medición de acrilamida.

Tabla 5. Condiciones del GC-MS para la medición de acrilamida.

Parámetro	Condición
Columna	DB-FFAP; 30 m x 250 μ m x 0.25 μ m
Volumen de inyección	2 μ l
Rampa de temperatura horno	60°C por 1 min, rampa de calentamiento 10°C/min hasta 190 luego rampa de calentamiento 50°C/min hasta 240°C
Flujo columna	0,8 ml/min helio, presión 5,8112 psi, 200°C
Temperatura de la fuente	250°C

Para la cuantificación, se obtuvieron las razones de las áreas entre los peaks de las respuestas a m/z 70 (unidades con que se identifica la acrilamida) y m/z 73 (unidades con que se identifica la acrilamida deuterada D3).

8.6 Generación de acrilamida.

Con el fin de entender mejor la generación de acrilamida en sopaipillas y haciendo uso del método previamente descrito, se realizó una medición de acrilamida a diversos tiempos de fritura. Inicialmente se analizaron muestras desde el tiempo de 15 segundos, aumentando de a 15 segundos hasta llegar al tiempo de 180 segundos (tiempo establecido como el final de la fritura), de este ensayo preliminar se llegó a la conclusión que no es sino hasta los 130 segundos de fritura que se genera una corteza en la masa; se volvió a acotar los tiempos del experimento desde los 130 segundos y en esta ocasión se sobrepasó el tiempo de fritura establecido (180 segundos a 250 segundos) con el fin de obtener puntos de análisis que se encontraran ubicados después de este tiempo.

Se generó un diseño aleatorizado por bloques de proceso el cual se muestra a continuación (Tabla 6 - Tabla 8) Este esquema funciona de la siguiente forma: tomando el bloque 1 (Tabla 6) como ejemplo, de la primera corrida se debe sacar aleatoriamente una de las canastillas a los 130 segundos, otra a los 145 segundos, otra a los 190 segundos y la última a los 235 segundos, así hasta completar los tres bloques.

En la Tabla 9 se observa un resumen de la cantidad de sopaipillas por tiempo de fritura, en total se analizaron 60 sopaipillas para este intervalo de tiempo definido.

Tabla 6. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 1.

Bloque 1	Tiempo (s)									Total
	130	145	160	175	190	205	220	235	250	
1	1	1			1			1		4
2			1	1		1			1	4
3	1			1		1		1		4
4		1		1			1		1	4
5			1		1		1		1	4
	2	2	2	3	2	2	2	2	3	20

Tabla 7. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 2.

Bloque 2	Tiempo (s)									Total
	130	145	160	175	190	205	220	235	250	
1		1	1		1			1		4
2			1		1		1		1	4
3	1	1		1		1				4
4	1				1		1		1	4
5		1		1		1		1		4
	2	3	2	2	3	2	2	2	2	20

Tabla 8. Esquema aleatorio de muestreo de sopaipillas fritas, bloque 3.

Bloque 3	Tiempo (s)									Total
	130	145	160	175	190	205	220	235	250	
1			1		1		1		1	4
2	1			1		1		1		4
3		1			1		1		1	4
4		1	1		1	1				4
5	1			1			1	1		4
	2	2	2	2	3	2	3	2	2	20

Tabla 9. Resumen del total de muestras elaboradas por cada tiempo de fritura.

	Tiempo (s)								
	130	145	160	175	190	205	220	235	250
Total de muestras	6	7	6	7	8	6	7	6	7

8.7 Efecto de la asparaginasa en la concentración de acrilamida.

Basado en la bibliografía (Kukurová y cols., 2009, 2013; Anese y cols., 2011), se definió un rango de concentración de 60 a 1000 ppm (mg asparaginasa/kg harina) y un rango de tiempos de reposo de la masa de 0 a 30 minutos. Mediante el software Statgraphics® se corrió un diseño de cribado con cinco variables de respuesta (concentración de acrilamida, concentraciones de asparagina en la masa cruda y frita y concentraciones de ácido aspártico en masa cruda y frita), que aparece en la Tabla 10.

Tabla 10. Condiciones de reposo y concentración de asparaginasa⁷,

Tiempo de reposo (min)	Concentración adicionada de asparaginasa (mg asparaginasa / kg de harina)
0	60
15	530
15	60
0	1000
0	530
30	60
30	530
30	1000
15	1000
0	0

8.8 Desarrollo de color y generación de acrilamida.

Mediante un colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus, se midieron cinco puntos por la cara donde se realizaban las punciones del tenedor (Figura 7). De la pantalla del colorímetro se midieron los parámetros L, a, b para todas las sopaipillas elaboradas; estos valores se promediaron para obtener un punto.

⁷ Esquema generado mediante Statgraphics®.

Esta medición permitió, junto con el análisis de acrilamida, ver una relación entre la generación de color y estos parámetros de color.

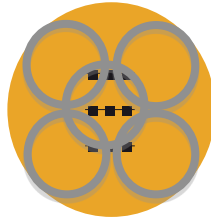


Figura 7. Puntos de medición para parámetros de color L, a, b con colorímetro Hunter Lab MiniScan XE Plus.

Se prepararon entonces un total de 60 sopaipillas; en la Tabla 9 se aprecian las condiciones de tiempo, a las sopaipillas de los tiempos 130, 160, 190, 220, y 250 segundos se le determinó la concentración de acrilamida.

A todas las sopaipillas de cada tiempo de fritura se les tomó una fotografía en un sistema de procesamiento de imágenes de visión por computador como se ve en la Figura 8, en este sistema se usó la iluminación descrita por León y cols (2006). La cámara fotográfica empleada fue Canon, modelo PowerShot G3. La fotografía de la sopaipilla se almacenó con un tamaño de 2272×1704 píxeles en formato CRW usando el espacio de color RGB (color profile Adobe RGB (1998)), con una distancia focal de 11.1875 mm, tiempo de exposición 1/15 segundos y apertura de diafragma f 8.

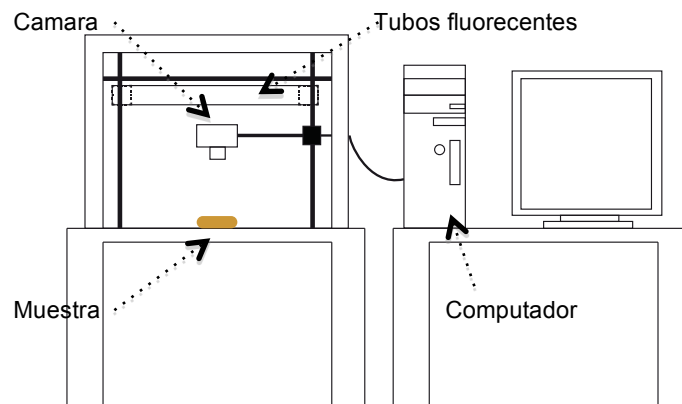


Figura 8. Sistema de procesamiento de imágenes de visión por computador. Cada imagen es convertida a formato PNG usando el software Snap Converter.

El espacio de color de cada imagen es convertido a tonos de gris, espacio de color Hue Saturation Value y espacio de color L*a*b usando el Toolbox de Matlab Balu (Mery, 2011).

A cada imagen se le extrajeron características usando la metodología descrita en (Mery y cols., 2013).

Las características extraídas se almacenaron en una tabla de n filas y m columnas. Cada columna es un vector de n elementos.

Utilizando una técnica de búsqueda hacia adelante, se busca cuál de las columnas correlaciona mejor con la variable física medida. Se busca entonces encontrar j_1 , es decir la columna cuya correlación $\text{corr}(y, z_1)$, con $z_1 = a_1x_{j_1} + b_1$ sea máxima. Luego se busca la segunda columna j_2 de X que combinada linealmente con x_{j_1} correlacione mejor con y, es decir se define una nueva variable $z_2 = a_2x_{j_1} + b_2x_{j_2} + c_2$ tal que $\text{corr}(y, z_2)$, y se busca una tercera característica x_{j_3} de la misma manera (con $z_3 = a_3x_{j_1} + b_3x_{j_2} + c_3x_{j_3} + d_3$). Los parámetros lineales a, b, c y d, se buscan usando mínimos cuadrados.

De esta manera, se consiguió un modelo lineal de tres características visuales que correlacionen bien con la variable física y que en este caso era la concentración de acrilamida.

8.8.1 Validación del modelo generado.

Para realizar la validación del sistema generado se tomaron los puntos de 130, 160, 190, 220 y 250 segundos. Se elaboraron sopaipillas como se describe anteriormente (8.4) y se frieron hasta los tiempos establecidos, se les midió la concentración de acrilamida y se obtuvieron los parámetros de color; luego se comparó el valor de acrilamida obtenido en análisis de GC-MS con el valor predicho por el modelo lineal de tres características visuales.

9 Resultados.

9.1 Método de medición de acrilamida.

Se realizó la cuantificación de los niveles de acrilamida en una masa frita a 170 °C por 3 min (formulación de Ahumada, 2011), los resultados de la medición por triplicado se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Triplicado de medición de acrilamida en masa frita de sopaipilla.

Muestra	Concentración (µg/kg)
1	114,74
2	136,31
3	118,78

También se determinó la exactitud del método desarrollado en términos de porcentaje de recuperación, obteniéndose un 90%.

Se tomó como referencia el método de extracción planteado por Ciesarová y cols., (2006), descrito previamente en la metodología. Fue necesario probar diferentes variaciones del método de “clean-up” con el fin de tener cromatogramas en los que se pudiera realizar la medición de acrilamida. Como resultado, se esperaba obtener un cromatograma similar a las inyecciones de la curva de calibración para acrilamida, referido a la linealidad de la línea base y la definición de los peaks de interés. La Figura 9 corresponde a una inyección de 25 ppb del estándar de acrilamida, la cual es la concentración más baja que se logró medir en el equipo.

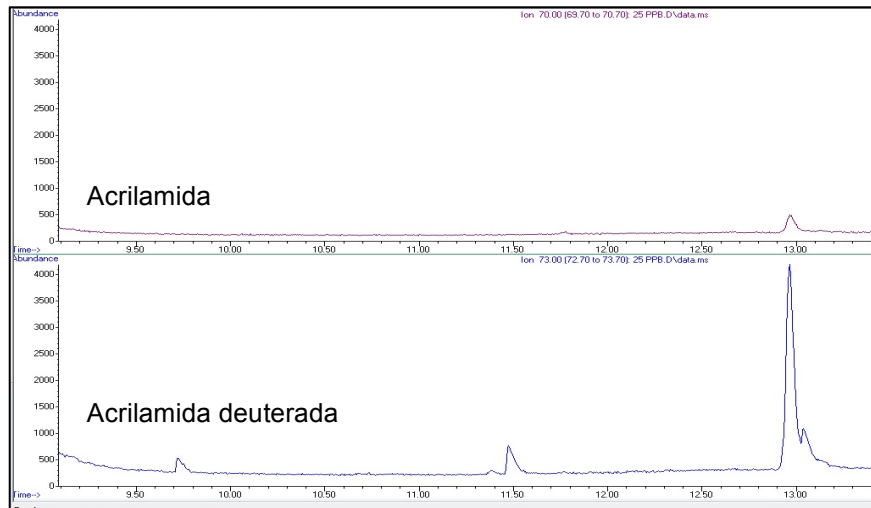


Figura 9. Cromatograma generado al inyectar 25 ppb de estándar de acrilamida

Al aplicar la técnica propuesta por Ciesarová y cols (2006) para el procesamiento de las muestras para análisis de acrilamida por GC-MS, se obtuvo el cromatograma que se muestra en la Figura 10, donde no se puede realizar la medición de acrilamida, ya que la línea base de acrilamida deuterada se eleva ocultando el peak. Tampoco se observa un peak definido de acrilamida, motivo por el cual se decidió probar cambiando la relación de solventes, la columna y se adaptaron algunos procedimientos al material de laboratorio existente.

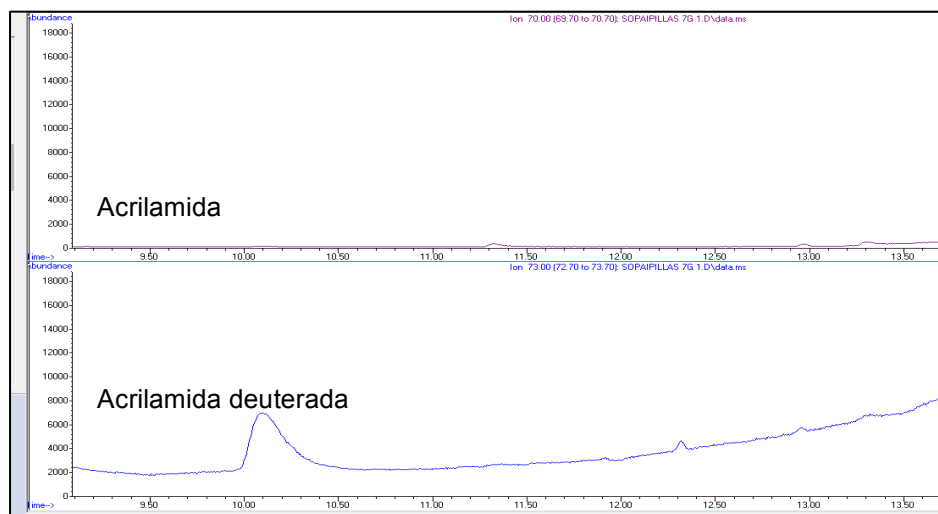


Figura 10. Cromatograma generado al inyectar una muestras utilizando el método planteado por Ciesarová y cols (2006).

Para mejorar las mediciones de acrilamida, se modificaron algunos elementos del procedimiento propuesto. Luego de la extracción por ultrasonido se realizó un centrifugado a -4°C por 10 minutos a 6000 rpm, de este sobrenadante se tomaron 5 ml y se inyectaron en una columna LiCholuth® Rp-18 de 500 mg y se arrastró con 5 ml de metanol; se adicionó hexano en relación 2:1 (hexano:metanol) con el fin de limpiar los restos grasos de la muestra, se agitó por 20 segundos y se centrifugó a -10°C por 10 minutos a 6000 rpm, con el fin de promover la in-miscibilidad de los solventes (metanol-hexano). Luego se tomó la fase inferior y se llevó a sequedad en un rota-evaporador a 40°C con 200 mbar de presión, se reconstituyó con 1 ml de metanol y se limpió filtrándolo en filtros $0,22\mu\text{m}$. Estos cambios mejoraron notablemente, tanto la linealidad como los peaks de interés, lo que se puede ver en el cromatograma de la Figura 11.

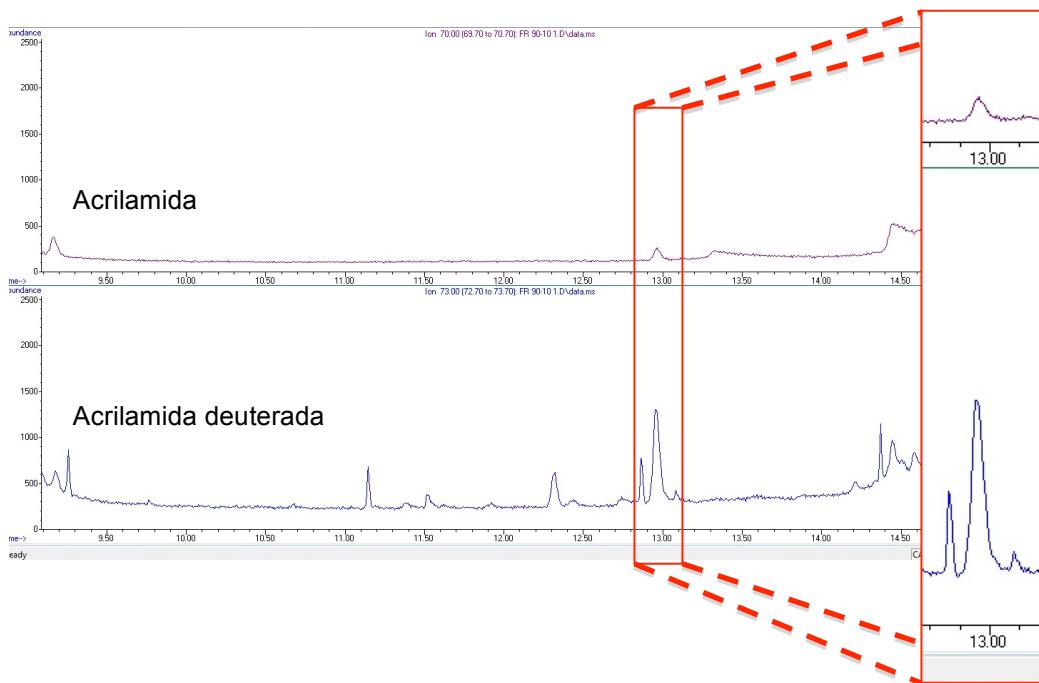


Figura 11. Cromatograma resultante de la medición, aplicando la metodología planteada en esta tesis.

Como se aprecia en el cromatograma de la Figura 11, las líneas base, tanto de la acrilamida como de la acrilamida deuterada, son más lineales y el ruido tiende a disminuir, lo que permite realizar la medición de acrilamida. Es importante destacar que la concentración de acrilamida final depende de la relación de áreas de la acrilamida y la acrilamida deuterada.

9.2 Efecto de la adición de L-asparaginasa en la concentración de aminoácidos.

En la Tabla 12 se presentan los datos de concentraciones de asparagina y ácido aspártico, tanto en la masa cruda como en la masa frita, en esta tabla se puede apreciar como la fritura aumenta los niveles tanto de asparagina como de ácido aspártico; más adelante se analizará este fenómeno con mayor profundidad.

Tabla 12. Concentración de aminoácidos en masa cruda y frita de sopaipilla sin adición de L-asparaginasa (control)

	Masa cruda		Masa Frita	
	Asparagina (µg/gr)	Ácido aspártico (µg/gr)	Asparagina (µg/gr)	Ácido aspártico (µg/gr)
Control	218,37	535,10	380,65	2539,41

En la Figura 12 se puede apreciar que la fritura de la sopaipilla genera un ligero incremento en la concentración de la asparagina libre en la sopaipilla frita. Knol y cols (2010) reportaron que en los primeros minutos de reacción, en un sistema acuoso, la asparagina tiene un comportamiento que muestra bastante variabilidad, coherente con el encontrado en este estudio. Los investigadores explican que esto puede deberse a una regeneración baja de la asparagina desde los productos iniciales de condensación; el calentamiento de la asparagina en ausencia de azúcares puede resultar en una variedad de fragmentos no identificados.

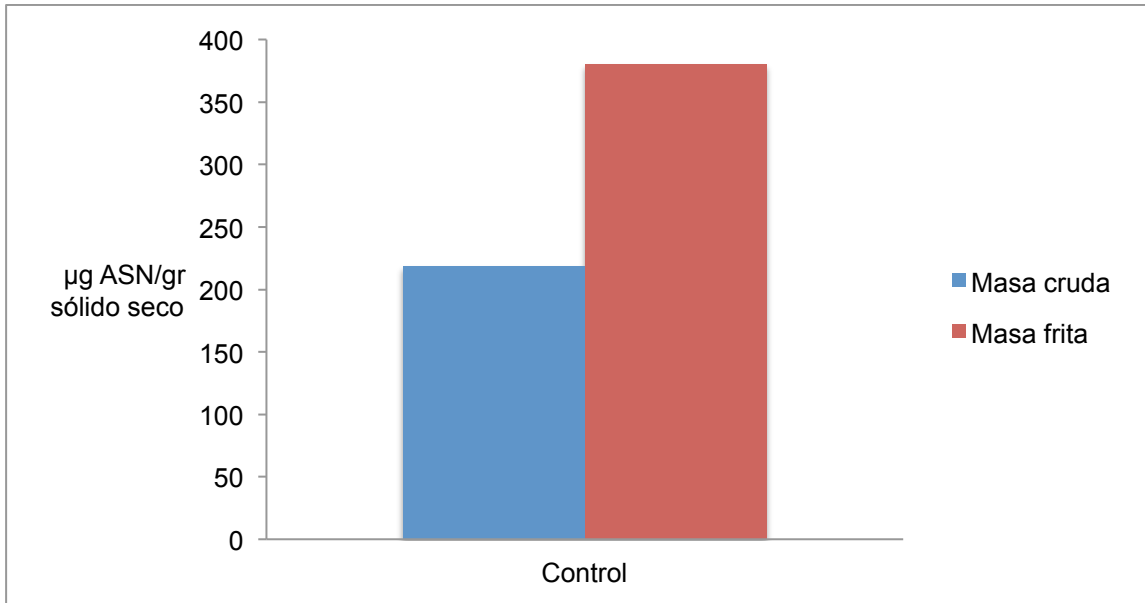


Figura 12. Efecto de la fritura en los niveles de asparagina en sopaipilla.

En la Figura 13 se ve un aumento de ácido aspártico en la fritura; esto se puede deber a una degradación de la asparagina a ácido aspártico (Talley y cols, 1959), también se ha reportado que en sistemas de reacción acuosos equimolares, asparagina – glucosa, calentados entre 120 – 200 °C, se genera ácido aspártico (De Vleeschouwer, 2008).

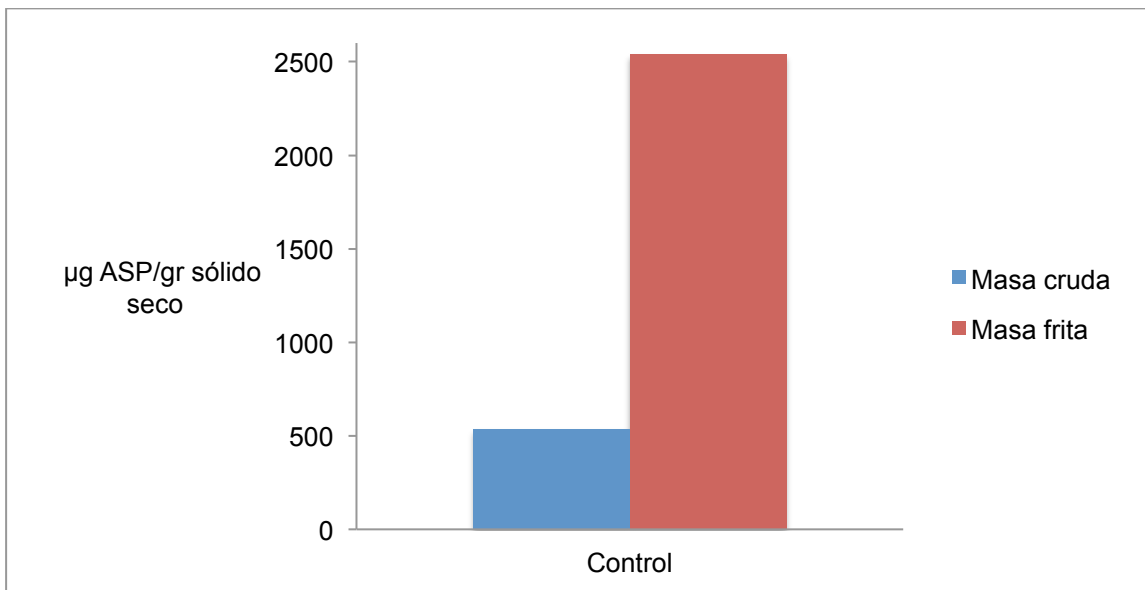


Figura 13. Efecto de la fritura en los niveles de ácido aspártico en sopaipilla.

Las concentraciones de asparagina y ácido aspártico, luego de diversos tratamientos, variando tiempos de reposo y concentración de la enzima L-asparaginasa adicionada, se presentan en las Tabla 13 y Tabla 14.

En la Tabla 13 se observa que gracias a la adición de L-asparaginasa, los niveles de asparagina, en la masa cruda, disminuyen en todas las concentraciones y tiempos de reposo (referido a la muestra control).

Tabla 13. Concentración de aminoácidos en masa cruda de sopaipilla luego de diversos tiempos de reposo y adiciones de asparaginasa.

Asparaginasa adicionada (mg asparaginasa/kg harina)	tiempo (min)	Masa cruda	
		Asparagina ($\mu\text{g}/\text{gr}$)	Ácido aspártico ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
60	0	26,75	1621,82
60	15	53,82	1903,28
60	30	86,13	2603,18
530	0	46,87	1767,70
530	15	94,22	1985,00
530	30	58,32	2003,97
1000	0	62,55	2400,10
1000	15	52,27	1747,33
1000	30	30,10	1350,17
Control		218,37	535,10

En la Figura 14 se observa que la disminución de la asparagina es de casi 8 veces con respecto a la concentración inicial en la masa cruda, es aquí donde se ve claramente la acción de la enzima sobre la asparagina, siendo eficaz en todos los niveles de concentración adicionada. Si bien el tiempo de reposo debería aumentar la disminución de este aminoácido, los datos obtenidos son contradictorios y solo hasta la concentración de 1000 mg asparaginasa/kg harina se logra observar este comportamiento.

En cuanto al ácido aspártico en la masa cruda, éste aumenta en todas las concentraciones y tiempos de reposo (referido a la muestra control). En la Figura 15 se ve que el aumento del ácido aspártico es de casi 3 veces con respecto a la concentración inicial, esto debido a que la enzima hidroliza la

asparagina en ácido aspártico. Si bien estos datos son congruentes con la clasificación de actividad enzimática, al mirar con mayor detenimiento el comportamiento de la asparagina y ácido aspártico en el tiempo de reposo, los datos tienden a ser confusos, esto posiblemente generado por una mala distribución de la enzima en el momento del amasado, debido a las bajas concentraciones adicionadas; una posible solución es aumentar la cantidad de masa para que la cantidad de enzima a adicionar sea más fácil de homogenizar con los ingredientes secos, también se podrían aumentar los tiempos de amasado o, al momento de incorporar los ingredientes secos, realizar un homogenizado mediante un tamizado.

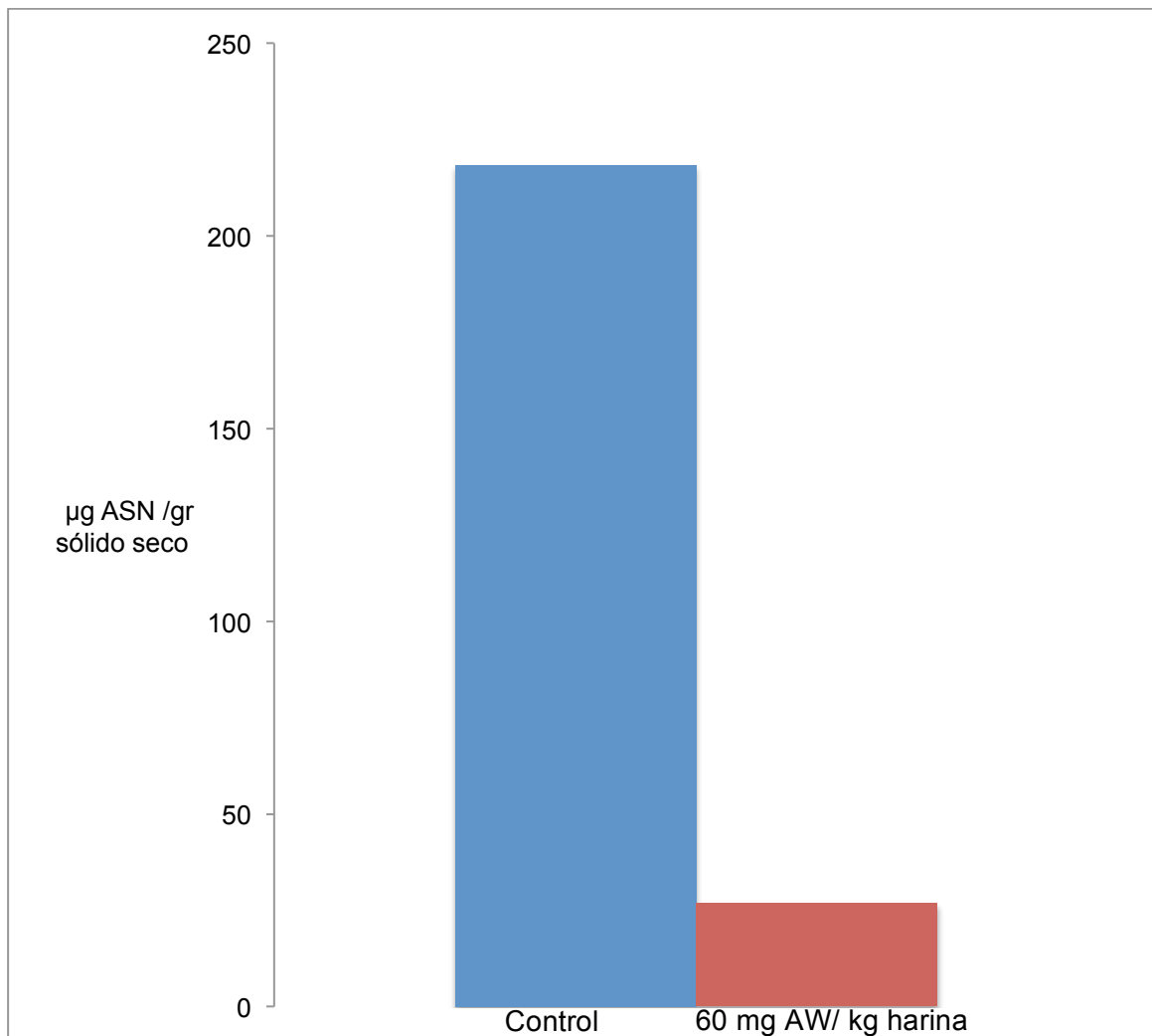


Figura 14. Efecto de la asparaginasa en el contenido de asparagina en la masa cruda sin reposo.

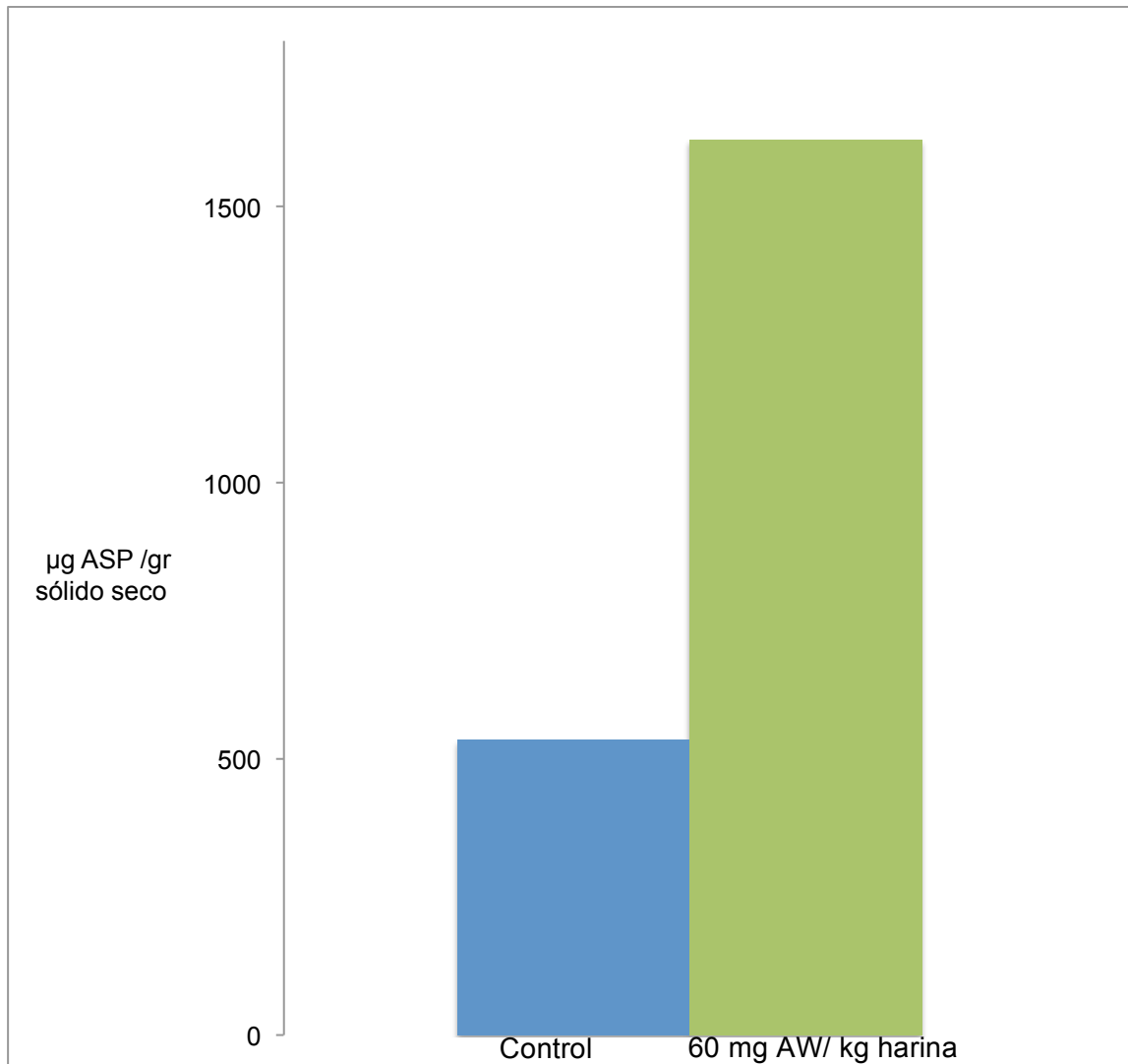


Figura 15. Efecto de la asparaginasa en el contenido de ácido aspártico en la masa cruda.

En la Tabla 14 se observa que gracias a la adición de asparaginasa y luego de la fritura, los niveles de asparagina en la masa frita disminuyen en todas las concentraciones y tiempos de reposo (referido a la muestra control). Es importante destacar que en la mayoría de los tiempos de reposo y concentraciones de asparaginasa, las concentraciones de asparagina en la masa frita son menores a los medidos en la masa cruda, esto debido a que la asparagina se consume en la reacción de Maillard para la formación de acrilamida (Knol y cols., 2010).

Tabla 14. Concentración de aminoácidos en masa frita de sopaipilla.

Asparaginasa adicionada (mg asparaginasa/kg harina)	tiempo (min)	Masa Frita	
		Asparagina ($\mu\text{g}/\text{gr}$)	Ácido aspártico ($\mu\text{g}/\text{gr}$)
60	0	18,55	1309,84
60	15	20,77	1229,83
60	30	35,96	1417,33
530	0	38,18	1472,62
530	15	34,96	1760,62
530	30	54,17	1577,12
1000	0	50,71	1996,14
1000	15	34,92	1697,27
1000	30	39,69	1869,15
Control		380,65	2539,41

En la Figura 16 se ve que la disminución de la asparagina (en la masa frita tratada con 60 mg asparaginasa/kg harina) es de casi 20 veces con respecto a la concentración inicial en la masa frita (control). Esto evidencia la acción de la enzima, ya que en la masa frita control los niveles finales de este aminoácido son mayores a los de la masa tratada.

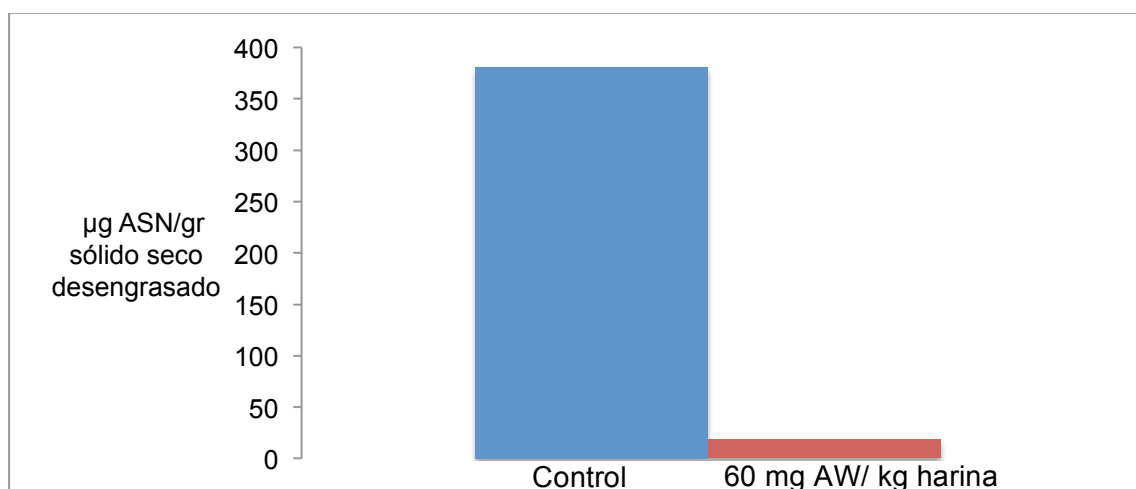


Figura 16. Efecto de la asparaginasa en el contenido de asparagina en la masa frita.

Haciendo un resumen general de todos los datos obtenidos en el tratamiento con L-asparaginasa, éstos no son concluyentes para determinar un tiempo óptimo de reposo, pero sí se puede evidenciar que el uso de la L-asparaginasa es un mecanismo efectivo para disminuir la concentración de uno de los principales precursores de la acrilamida.

En la Figura 17 se puede apreciar la disminución asparagina, primero por efecto de la adición de asparaginasa y luego debido a su reacción con azúcares reductores mediante la reacción de maillard en la fritura; en esta figura se evidencia la efectividad de la enzima en la disminución del precursor, lo que posteriormente se verá reflejado en una disminución de la acrilamida.

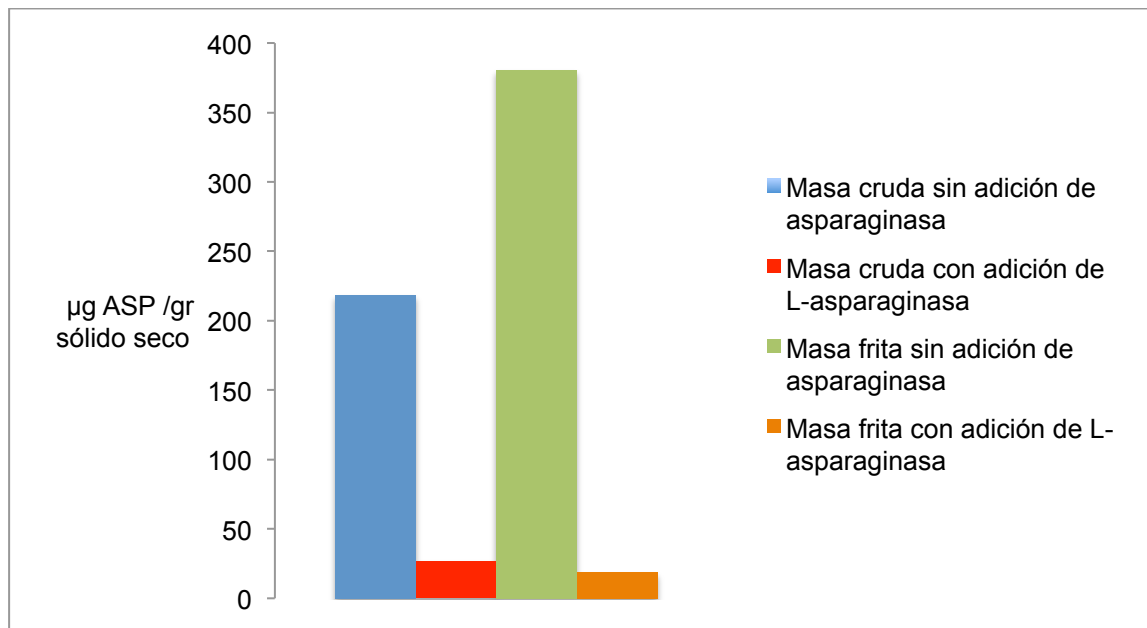


Figura 17. Efecto de la adición de asparaginasa en la masa cruda y masa frita sobre la asparagina.

En cuanto al ácido aspártico en la masa frita, se tienen resultados contradictorios a los descritos por la teoría, lo que deja una incertidumbre en el mecanismo de reacción de la generación de ácido aspártico, ya sea por la hidrólisis de asparagina o como producto de degradación de ésta.

9.3 Efecto de la adición de asparaginasa en la concentración de acrilamida.

Para las muestras tratadas con asparaginasa no se pudo detectar acrilamida, lo que se muestra en la Tabla 15.

Tabla 15. Concentración de acrilamida en muestras tratadas con diferentes niveles de asparaginasa y tiempos de reposo.

Tiempo \ Concentración	0 min	15 min	30 min
60 mg asparaginasa/kg harina	< LC	< LC	< LC
530 mg asparaginasa/kg harina	< LC	< LC	< LC
1000 mg asparaginasa/kg harina	< LC	< LC	< LC

*LC límite de cuantificación.

Esto indica que las muestras tenían una concentración de acrilamida menor a 25 ppb. Es posible que en concentraciones menores a 60 mg de asparaginasa/kg de harina adicionada se puedan medir concentraciones mayores de acrilamida.

Este resultado, junto con los obtenidos en la medición de aminoácidos, muestra claramente que la L-asparaginasa es una herramienta efectiva para la disminución de acrilamida en sopapillas y que la reducción observada de asparagina impacta directamente en la reducción de acrilamida.

9.4 Relación de generación de color y generación de acrilamida.

Para poder hacer un modelo predictivo, se debe partir realizando un modelo de generación de color, con el fin de poder relacionar los parámetros de color con la concentración de acrilamida.

Se acotó el modelo desde 130 segundos hasta 250 segundos y se realizó la medición de acrilamida a intervalos de 30 segundos, estos resultados aparecen en la Figura 18. En la gráfica se aprecia como la acrilamida va aumentando a medida que el tiempo de fritura transcurre, comenzando con un incremento moderado y luego con una fase estable desde los 130 segundos hasta los 190 segundos, desde los 190 segundos en adelante se observa un incremento significativo de la concentración de acrilamida, y finalmente en el rango de 220 segundos hasta los 250 segundos se percibe una disminución de esta tasa de generación de acrilamida. Es importante señalar que los datos de este modelo son coherentes con lo encontrado por Granda y Moreira (2005), donde se ve

que a medida que el tiempo de fritura aumenta, hay un aumento en la concentración de acrilamida.

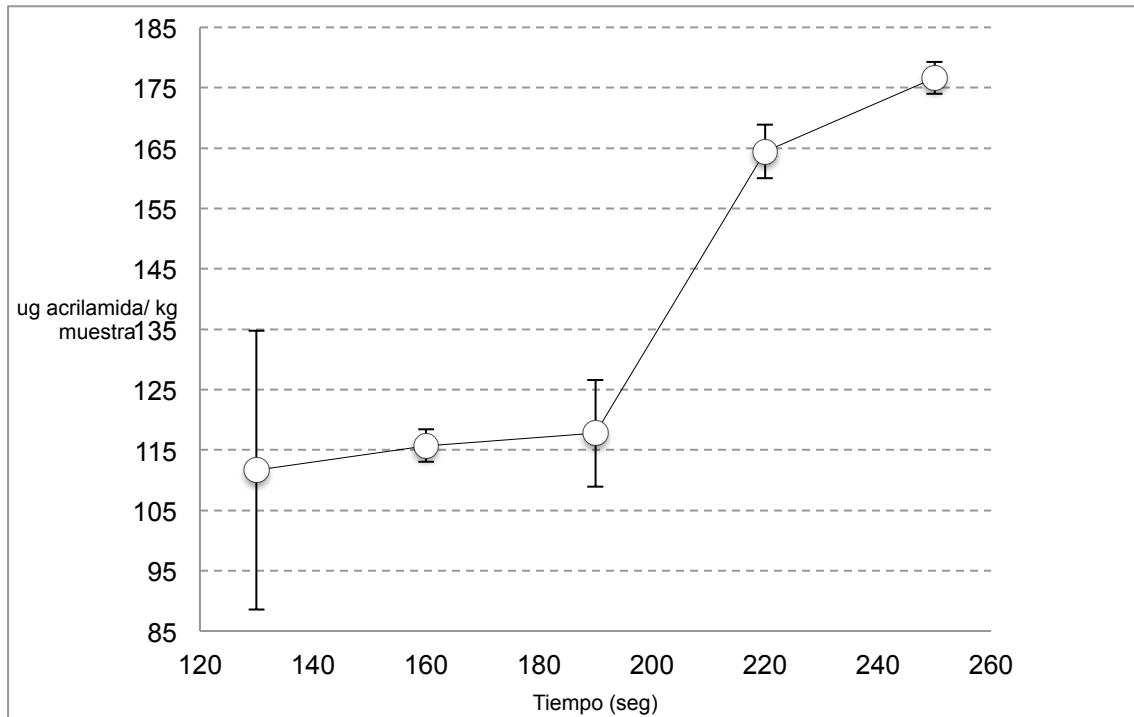


Figura 18. Generación de acrilamida, en diversos tiempos de fritura.

También se puede apreciar en este modelo que la concentración de acrilamida tiende a disminuir o entrar en un estado estable entre los periodos de tiempo de 220 segundos y 250 segundos, este fenómeno es consistente con lo planteado por Granda y Moreira (2005) y Taubert y cols (2004), donde este último autor plantea que las altas temperaturas y tiempos más largos de procesamiento, tienen asociados un decrecimiento en el nivel de acrilamida. Este fenómeno es explicado por algunos autores como Knol y cols (2010), quienes postulan que el proceso de formación de acrilamida y la degradación de esta a melanoidinas, llegan a un equilibrio, lo que genera un comportamiento de aparente estado estable .

Se midieron los parámetros de color L^* , a^* y b^* con el fin de determinar la variación de color a medida que el tiempo de fritura avanzaba (Figura 19, Figura 20 y Figura 21).

Es importante resaltar la linealidad de los datos obtenidos, ya que en experimentos anteriores, donde no se usaba el sistema de rejillas para fritura, la

medición de color se comportaba de forma menos lineal y no mostraba un comportamiento concluyente sobre la generación de color, lo que podía estar asociado al ruido experimental. Al introducir el sistema de rejillas se logró eliminar una gran porción de este ruido experimental, o que éste impactara, al mismo nivel, a todas las muestras por igual.

Se observa que los parámetros L^* y b^* disminuyen a medida que la concentración de acrilamida aumenta, esto evidencia una correlación de la generación de acrilamida con la aparición de color. En la Figura 19 se puede ver como el parámetro L^* , asociado a la luminosidad y que varía entre 0 (negro) y 100 (blanco), disminuye; esta disminución se asocia a la aparición de colores oscuros en la sopaipilla como resultado de la reacción de pardeamiento no enzimático (reacción de Maillard), que está estrechamente relacionada con la generación de acrilamida (Pedreschi y cols, 2007). De similar manera el parámetro b^* (Figura 20), que varía de azul a amarillo, evidencia que la sopaipilla se va oscureciendo a medida que transcurre la fritura, lo que apoya la afirmación anterior.

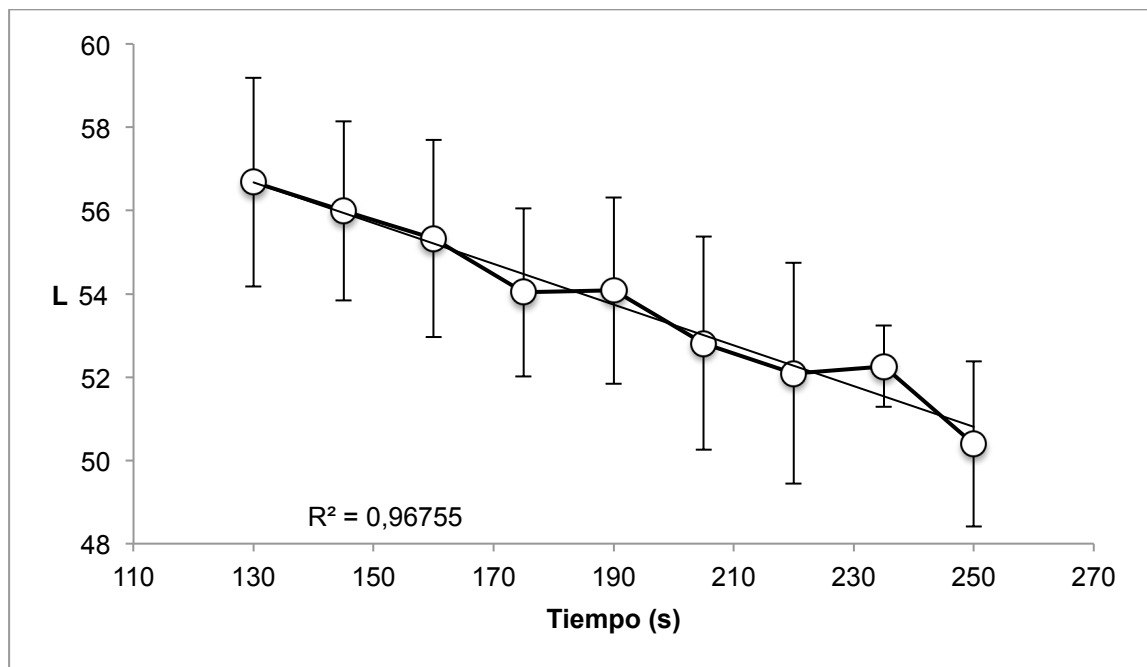


Figura 19. Variación de L^* con el tiempo de fritura

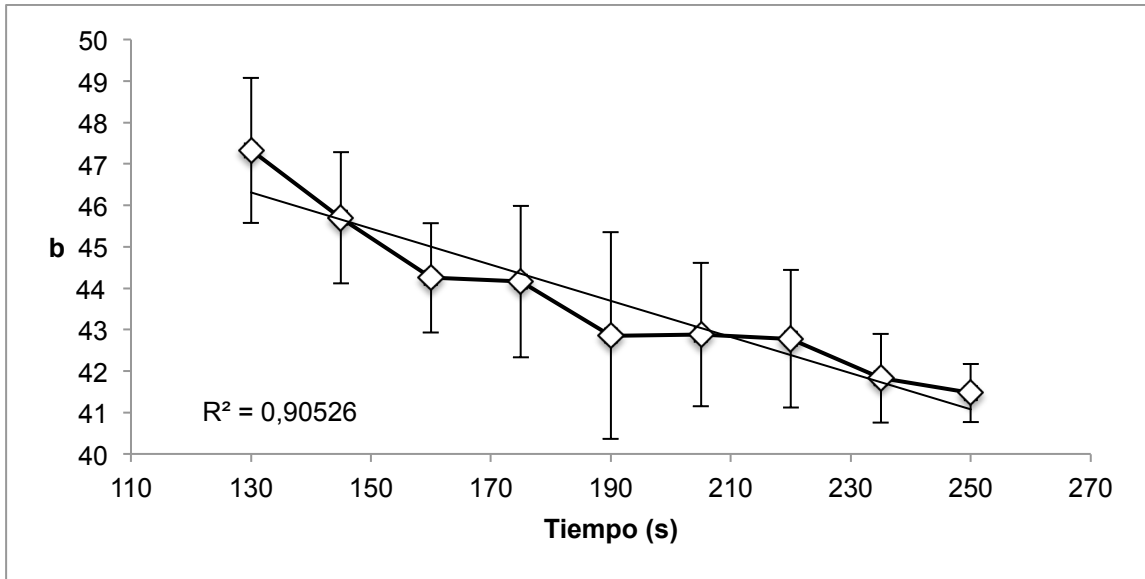


Figura 20. Variación de b* con el tiempo de fritura

En el caso del parámetro cromático a* (Figura 21), se ve un aumento, esto está relacionado a la aparición de coloración roja en la sopaipilla; este parámetro no permite generar un mayor análisis, aparte de corroborar que la medición es correcta (ya que si esta tuviera un comportamiento contrario indicaría la aparición de colores de tonalidad azul).

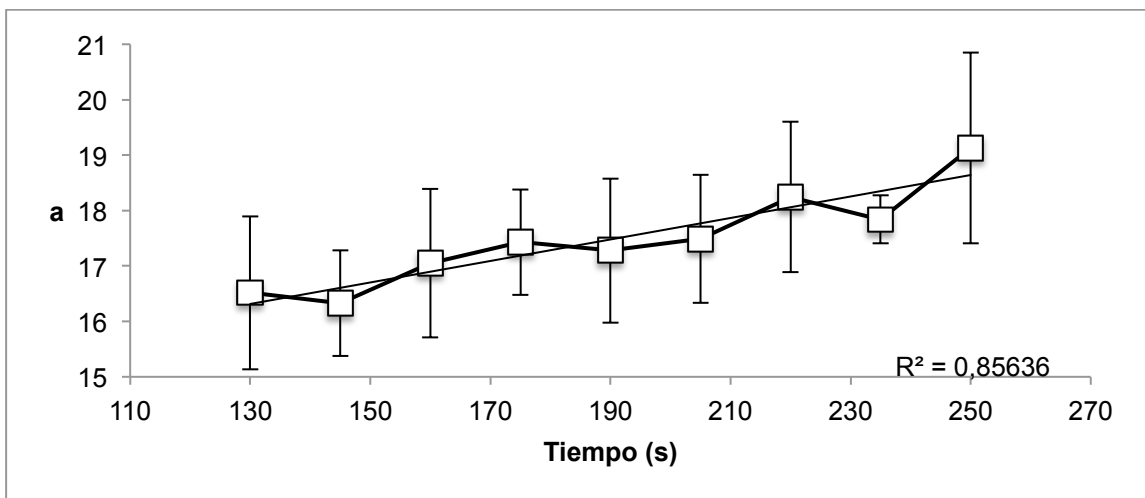
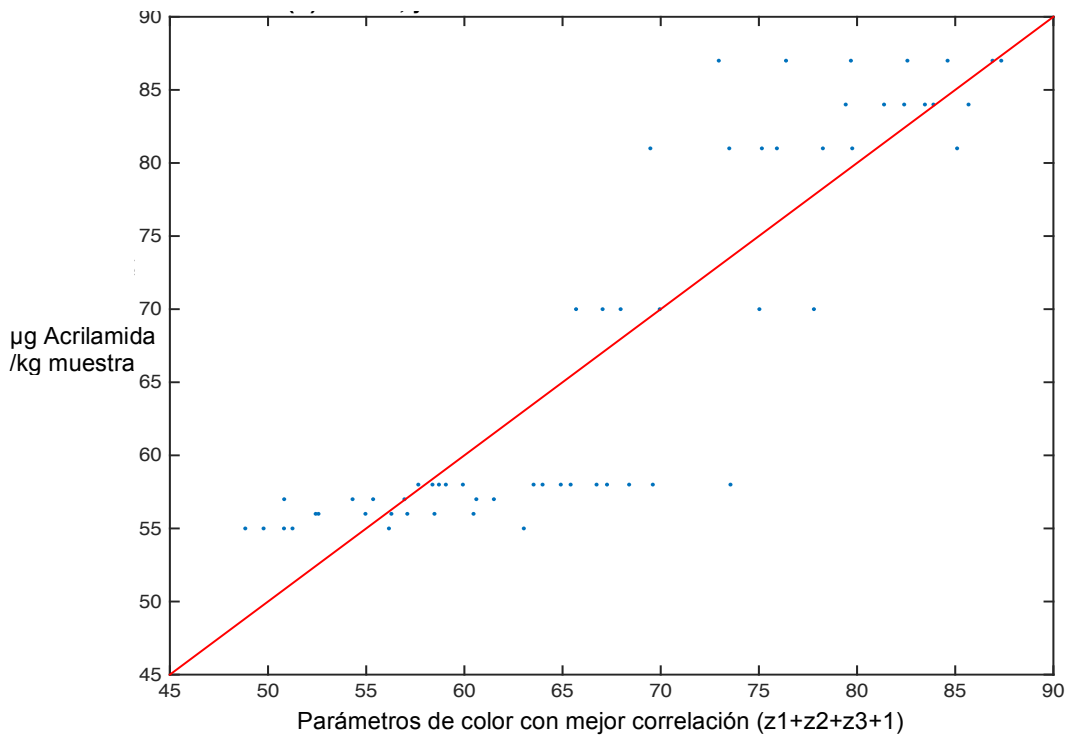


Figura 21. Variación de a* con el tiempo de fritura.

Finalmente, con la metodología planteada en el punto 8.8 se obtuvo una correlación de parámetros de color (H-Intensity Mean, L-Intensity Kurtosis, H-

LBP(1,17)[8,ri]) que presentaban una mayor correlación con la concentración de acrilamida medida en las sopaipillas (Figura 22) el coeficiente de correlación obtenido fue de 0.8912, resultado generado por Toolbox Balu para Matlab (Mery, 2011).

Figura 22. Correlación de concentración de acrilamida con parámetros de color seleccionados específicos para la sopaipilla.



La Ecuación 1 relaciona estos parámetros cromáticos y predice la concentración de acrilamida presente en una muestra.

Ecuación 1. Correlación parámetros cromáticos y concentración de acrilamida

$$y = 8,836815 \cdot z_1 + (-4,186128 \cdot z_2) + 2,626848 \cdot z_3 + 67,389831$$

Donde: z1:H-Intensity Mean, z2:L-Intensity Kurtosis y z3:H-LBP(1,17)[8,ri].

Esta ecuación facilitaría la medición de acrilamida en sopaipillas, pudiendo evitar los análisis de laboratorio.

10 Conclusiones.

- Se desarrolló una técnica exacta y precisa que permitió medir acrilamida en sopaipillas.
- La adición de L-asparaginasa a la masa cruda disminuyó los niveles de asparagina para todas las concentraciones y tiempos de reposo planteados en esta investigación (disminución de acrilamida por debajo de los 25 µg de acrilamida/kg de muestra).
- Usando el Toolbox Balu para Matlab se obtuvo una correlación entre la generación de color y la generación de acrilamida, lo que permitió obtener un modelo matemático que predice la concentración de acrilamida en sopaipillas a partir de parámetros de color específicos.
- La disminución del parámetro de color L* al aumentar el tiempo de fritura, que está relacionado directamente con el oscurecimiento de la muestra, indica que la generación de acrilamida está ligada a la aparición de compuestos coloreados.
- De los resultados obtenidos se puede afirmar que la asparagina es el precursor más relevante para la generación de acrilamida en sopaipillas; es por esto que el uso de L-asparaginasa es un método efectivo para la disminución de acrilamida en ellas.

11 Referencias

AHUMADA Gaarn, Alejandra Andrea. Clasificación de calidad sensorial de sopaipillas mediante visión computacional. Tesis (Ingeniero de alimentos). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de ciencias químicas y farmacéuticas, 2011. 95 h.

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.

AMREIN, T., Schönbacher, B., Escher, F., Amadò, Renato. (2004). "Acrylamide in Gingerbread: Critical Factors for Formation and Possible Ways for Reduction." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(13): 4282-4288.

BAILEY, Altone E. Aceites y grasa industriales. España, Reverté S.A,1984. 743p. [en línea] <http://books.google.cl/books?id=xFjGDCmLuKQC&pg>.

BELAND, F., Mellick, P., Olson, G., Mendoza, M., Marques, M., Doerge, D. (2013). "Carcinogenicity of acrylamide in B6C3F1 mice and F344/N rats from a 2-year drinking water exposure." *Food and Chemical Toxicology* 51(0): 149-159.

BIEDERMANN, M., Biedermann-Brem, S., Noti, A., Grob, K., Egli, P., Mañdli, H. (2002) Two GC-MS methods for the analysis of acrylamide in foods. "Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene., 93, 638-652.

BRENDA, the comprehensive enzyme information system, Ontology explorer, 2015 [en línea] [http://www.brenda-enzymes.org/ontology.php?ontology_id=1&f\[id\]\[value\]=GO:0004067&f\[id\]\[type\]=2&id_go=GO:0004067](http://www.brenda-enzymes.org/ontology.php?ontology_id=1&f[id][value]=GO:0004067&f[id][type]=2&id_go=GO:0004067)

BROSNAN, T. y Sun D.-W. (2004). "Improving quality inspection of food products by computer vision—a review." *Journal of Food Engineering* 61(1): 3 - 16.

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.

CAPUANO, E. y 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).

CIESAROVÁ, Z., Kiss, E., Boegl, P. (2006). "Impact of L-asparaginase on acrylamide content in potato products." *Journal of Food and Nutrition Research* 45(4): 141 - 146.

CODEX STAN 210. CODEX standard for named vegetable oils. 1999.

CODEX STAN 152. Norma del codex para la harina de trigo. 1985.

COHEN, S. y Michaud, D. (1993). "Synthesis of a Fluorescent Derivatizing Reagent, 6-Aminoquinolyl-N-Hydroxysuccinimidyl Carbamate, and Its Application for the Analysis of Hydrolysate Amino Acids via High-Performance Liquid Chromatograph." *Analytical Biochemistry* 211(2): 287.

DE VLEESCHOUWER, K., Plancken, L., Van Loey, A., Hendrickx, M. (2008). "The kinetics of acrylamide formation/elimination in asparagine–glucose systems at different initial reactant concentrations and ratios." *Food Chemistry* 111(3): 719-729.

DIAZ, D. P., Dalla, M., Vazquez, D., Castro, M (2006). *Elementos de Análisis Cualitativo y Cuantitativo en Proteínas del Gluten de Trigo*. Agric. Téc. [consultado : 2013-11-26], pp. 360-369.

DYBING, E. y Sanner, T. (2003). "Risk Assessment of Acrylamide in Foods." *Toxicological Sciences* 75(1): 7-15.

ELMORE, J. S., Koutsidis, G., Dodson, A., Mottram, D., Wedzicha, B. (2005). "Measurement of Acrylamide and Its Precursors in Potato, Wheat, and Rye Model Systems." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53(4): 1286-1293.

FENNELL, T., Sumner, S., Snyder, R., Burgess, J., Spicer, R., Bridson, W., Friedman, M. (2005). "Metabolism and Hemoglobin Adduct Formation of Acrylamide in Humans." *Toxicological Sciences* 85(1): 447-459.

GERTZ, C. y Klostermann, S. (2002). "Analysis of acrylamide and mechanisms of its formation in deep-fried products." *European Journal of Lipid Science and Technology* 104(11): 762-771.

GÖKMEN, V. y Şenyuva H. (2006). "Study of colour and acrylamide formation in coffee, wheat flour and potato chips during heating." *Food Chemistry* 99(2): 238 - 243.

GÖKMEN, V., Morales, F., Ataç, B., Serpen, A., Arribas-Lorenzo, G. (2009). "Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods." *Journal of Food Composition and Analysis* 22(2): 142-147.

GRANDA, C. y Moreira, R. (2005). "kinetics of acrylamide formation during traditional and vacuum frying of potato chips." *Journal of Food Process Engineering* 28(5): 478-493.

HEALTH IMPLICATIONS of acrylamide in food: report of a joint FAO/WHO consultation. EN FAO/WHO, Ed. WHO headquarters.: Ginebra, Suiza, 2002; pp 1-35.

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.

IARC Acrylamide, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans: some industrial chemicals, International Agency for Research on Cancer, Lyon 1994 (60), pp. 389-433.

KNOL, J., Linssen, J., vanBoekel, M. (2010). "Unravelling the kinetics of the formation of acrylamide in the Maillard reaction of fructose and asparagine by multiresponse modelling." *Food Chemistry* 120(4): 10.

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.

KUKUROVÁ, K., Ciesarová, Z., Mogol, B. A., Açar, Ö. Ç., Gökmen, V. (2013). "Raising agents strongly influence acrylamide and HMF formation in cookies and conditions for asparaginase activity in dough." *European Food Research and Technology* 237(1): 1-8.

LEÓN, K., Mery, D., Pedreschi, F., León, J. (2006). "Color measurement in L*a*b* units from RGB digital images." *Food Research International* 39(10): 1084-1091.

LU, H. y Zheng, H. (2012). "Fractal colour: A new approach for evaluation of acrylamide contents in biscuits." *Food Chemistry* 134(4): 2521 - 2525.

MARIOTTI, S., Pedreschi, F., Carrasco, J.A., Granby, K. (2011). "Patented Techniques for Acrylamide Mitigation in High-Temperature Processed Foods." *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture* 3(3): 158 - 171.

MERY, D. (2011): BALU: A toolbox Matlab for computer vision, pattern recognition and image processing. <http://dmery.ing.puc.cl/index.php/balu>.

MERY, D., Pedreschi, F., & Soto, A. (2013). Automated design of a computer vision system for visual food quality evaluation. *Food and Bioprocess Technology*, 6(8), 2093-2108.

MOTTRAM, D., Wedzicha, B., Dodson, A. (2002). "Food chemistry: Acrylamide is formed in the Maillard reaction." *Nature* 419 (6906): 448 - 449.

ODEPA, Superficie cultivada con hortalizas, estimación de superficie cultivadas a nivel nacional - preliminar . [en línea] <<http://www.odepa.cl/superficie-cultivada-con-hortalizas-3/>> [consulta : 21 Julio 2015]

PEDRESCHI, F., Moyano, P., Kaack, K., Granby, K. (2005). "Color changes and acrylamide formation in fried potato slices." *Food Research International* 38(1): 1 - 9.

PEDRESCHI, F., León, J., Domingo, M., Moyano, P., Pedreschi, R., Kaack, K., Granby, K. (2007). "Color development and acrylamide content of pre-dried potato chips." *Journal of Food Engineering* 79(3): 786 - 793.

PEDRESCHI, F., Mariotti, S., Granby, K., Risum, J (2011). "Acrylamide reduction in potato chips by using commercial asparaginase in combination with conventional blanching." *LWT - Food Science and Technology* 44(6): 3.

PEDRESCHI, F., Mariotti, M., Granby, K. (2014) "Current issues in dietary acrylamide: formation, mitigation and risk assessment." *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94(1): 9-20.

REDUCCION DE SODIO EN LA PANADERIA ACHIPAN [en línea] <http://www.fechipan.cl/sal_en_el_pan.html> [consulta: 26 noviembre 2013]

REGLAMENTO SANITARIO DE LOS ALIMENTOS (RSA), Ministerio de Salud. DTO N°. 977/96.

RYDBERG, P., Eriksson, S., Tareke, E., Karlsson, P., Ehrenberg, L., Törnqvist, M. (2003). "Investigations of Factors That Influence the Acrylamide Content of Heated Foodstuffs." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(24): 7012-7018.

SAFETY EVALUATION of certain food additives / prepared by the sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JEFCA) EN FAO/WHO, Ed. WHO headquarters.: Ginebra, Suiza, 2008; series 59; pp 55-64.

STADLER, R. H., Scholz G. (2004). "Acrylamide: An Update on Current Knowledge in Analysis, Levels in Food, Mechanisms of Formation, and Potential Strategies of Control." *Nutrition Reviews* 62(12): 449-467.

SUN, S-y., Fang, Y., Xia, Y-m. (2012). "A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy." *Food Control* 26(2): 220 - 222.

TALLEY, E., Fitzpatrick, T., Porter, W. (1959). "Formation of Fumaramic Acid from Asparagine in Phosphate Buffer." *Journal of the American Chemical Society* 81(1): 174-175.

TAMURA, H., Kitta, K., Shibamoto, T. (1991). "Formation of reactive aldehydes from fatty acids in a iron(2+)/hydrogen peroxide oxidation system." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 39(3): 439-442.

VALENCIA Guzmán, Maureen Andrea. Situación actual y perspectivas del zapallo chileno camote (*Cucurbita maxima* Duch): germoplasma, prácticas agronómicas y análisis económico del cultivo. Tesis (ingeniero agrónomo). Valparaíso, Chile. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Facultad de Agronomía, 2006.149 h.

VARELA, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M., Stephanopoulos, G. (2003). "Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress." *Applied Microbiology and Biotechnology* 60 (5): 547-555.

YAYLAYAN, V., Wnorowski, A., Perez, C. (2003). "Why Asparagine Needs Carbohydrates To Generate Acrylamide." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(6): 1753-1757.

ZYZAK, D. Sanders, R., Stojanovic, M., Tallmadge, D., Eberhart, L., Ewald, D., Gruber, D., Morsch, T., Strothers, M., Rizzi, G., Villagran, M. (2003). "Acrylamide Formation Mechanism in Heated Foods." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51(16): 4782-4787.

12 Anexos.

Anexo 1: Método de análisis de acrilamida de referencia desarrollado por Ciesarová y cols., (2006).

