

La acrilamida en los alimentos y la salud humana. Revisión

Acrylamide in Food and Human Health. Revision

Daniel Lerda¹

¹Universidad católica de Córdoba. Facultad de Ciencias de la Salud. Clínica Universitaria Reina Fabiola. Laboratorio de Genética Molecular
Correspondencia: Daniel Enrique Lerda. Laboratorio de Genética Molecular. Universidad Católica de Córdoba. Clínica Universitaria Reina Fabiola.
Oncativo 1248. X5004FHP.Córdoba. Email: daniellderda@curf.ucc.edu.ar

Resumen

Con posterioridad al anuncio efectuado por investigadores suecos, en Abril del año 2002, sobre la detección de acrilamida (AA) en un amplio grupo de alimentos, se han originado trabajos de investigación en diferentes partes del mundo. Se estudiaron diversas temáticas de gran importancia, entre las que se pueden mencionar la cinética de la formación y degradación de la acrilamida; los mecanismos propuestos para su reducción; los métodos instrumentales empleados para su determinación y los resultados generados tanto en modelos experimentales *in vitro* como *in vivo*.

En este trabajo se revisan los distintos estudios de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO), Organización Mundial de la Salud (OMS), Agencia Internacional para Investigación en Cáncer (IARC), Swedish National Food Administración (SNFA), Asociación Oficial de Químicos Analíticos (AOAC), European Food Safety Authority (EFSA) sobre la formación de la acrilamida en los alimentos, metabolización, neurotoxicidad, carcinogenicidad, toxicidad aguda y reproductiva, exposición alimentaria, métodos de análisis y mitigación.

Palabras claves: acrilamida, mecanismos de formación, metabolización, toxicidad, metodologías de análisis y mitigación.

Abstract

Subsequent to the announcement made by Swedish researchers in April 2002 about the detection of acrylamide (AA) in a wide group of foods, researchs papers have originated in different parts of the world. Various topics of great importance are studied, among which that the kinetics of acrylamide formation and degradation can be specified; the mechanisms proposed for its reduction; the instrumental methods used for its determination and the results generated in both *in vitro* and *in vivo* experimental models.

This work reviews the different studies of the Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC), Swedish National Food Administration (SNFA), Official Association of Analytical Chemists (AOAC), European Food Safety Authority (EFSA) on the formation of acrylamide in food, metabolism, neurotoxicity, carcinogenicity, acute and reproductive toxicity, dietary exposure, analysis methods and mitigation.

Key words: acrylamide, mechanisms of formation, metabolism, toxicity, analysis methodologies, mitigation

Introducción

La acrilamida es un conocido químico industrial y clasificado por la Agencia Internacional para la Investigación sobre Cáncer (IARC) como probable carcinógeno en humanos desde 1994¹. En abril del 2002, investigadores de la Dirección Nacional de Alimentación de Suecia (SNFA) y de la Universidad de Estocolmo anunciaron que la acrilamida se formaba en diversos alimentos asados y fritos elaborados a altas temperaturas². Otros países, como Noruega, Suiza, el Reino Unido y los Estados Unidos de América informaron observaciones similares, referidas a la formación de acrilamida en alimentos ricos en almidón que se elaboran o cocinan a altas temperaturas³⁻⁶. A raíz de estos descubrimientos surgió en la comunidad científica la necesidad de investigar los efectos tóxicos derivados de su consumo crónico, el mecanismo de formación en los alimentos, la evaluación de la exposición de las distintas poblaciones, los métodos de análisis más adecuados para medir niveles de acrilamida y la conveniencia o no de establecer límites permitidos en distintos grupos de alimentos. Para esto último la OMS estableció en 1985 un valor de ingesta diaria tolerable (IDT) de 12 ug/kg de peso corporal/día, esto basado en la neurotoxicidad de ratas expuestas a dosis repetidas⁷ y en 1996 establecieron el límite de acrilamida en agua potable en 0,5 ug/L, que se corresponde con una ingesta de 1 ug/día, considerando un consumo de agua de 2L diarios⁸.

El NOAEL (Nivel de efectos adversos no observados) para neuropatía por acrilamida se fijó en 0,5 mg/kg peso corporal/día y el NOAEL para cambios en la fertilidad es cuatro veces más elevado (2 mg/kg) que para neuropatía periférica y por ello se cree que el control de la neuropatía periférica controlaría los efectos sobre la fertilidad⁹.

De acuerdo a resultados toxicológicos realizados en animales y considerando que pueden ser relevantes para humanos, se sospecha que la exposición a acrilamida en alimentos no deriva en efectos neurotóxicos ni reproductivos¹⁰.

En este artículo de revisión se pretende dar un panorama sobre la acrilamida en cuanto a sus mecanismos de formación, las metodologías analíticas más empleadas, las estrategias para su mitigación y sus futuras consideraciones.

Formación en los alimentos

Factores como el tiempo, la temperatura, el tipo y la concentración de azúcar, la actividad acuosa, la

presencia de sales e incluso el valor del pH influyen directamente sobre la formación de esta sustancia^{11,12}. La acrilamida puede formarse a través de distintos mecanismos¹³.

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 (es una ruta marginal).
3. Mediante la deshidratación/descarboxilación de ciertos ácidos orgánicos comunes incluyendo ácido málico, ácido láctico y ácido cítrico.

La formación de acrilamida a partir de aminoácidos libres, más concretamente de la asparagina, está relacionada con la reacción de Maillard, en la que estos aminoácidos reaccionan con compuestos carbonilos durante el calentamiento¹⁴. Esta se describe como un proceso no enzimático de pardeamiento, que genera compuestos que aumentan el sabor y olor de los alimentos¹⁵. A partir de la asparagina y de los azúcares reductores se forma una base de Schiff, la cual puede reaccionar mediante distintos mecanismos hasta formarse la acrilamida. El paso clave de la reacción es la descarboxilación de la base de Schiff formándose los intermediarios de la reacción de Maillard (iminas) los cuales pueden liberar directamente acrilamida o indirectamente por la acción de su precursor 3-aminopropionamida¹⁶⁻¹⁷. Tras el empleo de un modelo cinético desarrollado para que se dé la formación artificial de acrilamida a partir de asparagina y azúcares reductores, se observó que la acrilamida en realidad no era un producto final de la reacción de Maillard, sino otro producto intermedio que puede estar sujeto por tanto a una reacción de degradación¹⁸. En los dos últimos casos el origen del nitrógeno de la molécula de acrilamida posiblemente sea el amoniaco liberado en los procesos de desaminación. Existen otros productos (2-desoxiglucosa, glioxal, glicerol) que no participan en la reacción de Maillard, a partir de los cuales, y combinados con la asparagina van a producir acrilamida, lo que indica que debe existir algún otro mecanismo de formación¹⁹.

La formación de la acrilamida es un fenómeno de superficie, es decir, se da principalmente en la superficie del alimento, donde se alcanzan con mayor rapidez las temperaturas a partir de la cual se forma esta. El interior de los alimentos no alcanza estas temperaturas porque el tiempo de cocinado no es suficiente para ello²⁰. Los niveles de acrilamida se incrementan con el tiempo, aunque es la temperatura la que ejerce mayores efectos en su formación²¹⁻²³. Este aumento de acrilamida en función del tiempo y de la temperatura se correlaciona linealmente con un aumento del color tostado del alimento y de los

niveles de pirazinas formados en los estadios iniciales de la reacción de Maillard

Rutas de metabolización

La acrilamida, luego de su ingesta se absorbe rápidamente en el intestino y luego se puede encontrar en órganos como el timo, el hígado, el corazón, el cerebro, los riñones e, incluso en la placenta y la leche materna, lo que puede ser transferida a recién nacidos²⁴. La acrilamida puede ser transformada por el citocromo P450 2E1 a glicinamida (GA) por medio de una epoxidación (2,3-epoxipropionamida)²⁵, o puede ser conjugada a glutatión y posteriormente convertida a ácidos mercaptúricos que son excretados por vía renal²⁴⁻²⁶. La acrilamida como la glicidamida son compuestos altamente reactivos que forman aductos con las proteínas como la hemoglobina, la albúmina sérica, ADN y enzimas, siendo la glicidamida mutagénica y considerada un metabolito genotóxico aún más reactivo que la acrilamida. Algunas investigaciones sugieren que su conjugación con glutatión incrementa el estrés oxidativo de las células afectando así la expresión génica, o que puede inhibir el motor mitótico/meiótico afectando el proceso de división celular²⁴.

Neurotoxicidad

La neurotoxicidad de la acrilamida fue establecida en modelos experimentales y humanos, afectando tanto el sistema nervioso periférico como el central, mediante la obstaculización de varias funciones motoras y sensitivas. La exposición a largo plazo de la acrilamida es considerada como una potencial causa de neuropatía periférica en humanos debido al estrés oxidativo que se produce²⁷. La unión de la acrilamida a grupos sulfhidrilos de los residuos de cisteína de las proteínas que tienen un papel importante en el proceso de fusión de la membrana causa degeneración en las terminales nerviosas y la inhibición del transporte axonal, iniciando reacciones de estrés oxidativo y daños presinápticos. Este desbalance comienza con la oxidación de lípidos y posteriormente con la de las proteínas, haciendo que el daño sea acumulativo²⁸

Carcinogenicidad, toxicidad genética y reproductiva

Los estudios a largo plazo en modelos de roedores han demostrado que la AA es cancerígena en diferentes órganos²⁹. Sin embargo, no son consistentes. Se encontró evidencia de un mayor

riesgo de cáncer entre los trabajadores expuesto a la AA. Además, la asociación del mayor riesgo de cáncer humano con consumo dietético de AA sigue siendo una cuestión de discusión^{29,30}. Si bien algunos estudios han encontrado asociaciones significativas entre la exposición oral a la AA y el cáncer, otros no pudieron probar tal relación.

Respecto a la genotoxicidad de la AA, esta ha sido ampliamente estudiada en distintos sistemas, pero no en células vegetales como en el test de *Allium cepa*. Entre los estudios se puede mencionar la inducción de mutación en bacterias, pero su metabolito, la GA, lo hace en ausencia de un sistema metabólico exógeno³¹. La AA induce mutaciones letales y somáticas recesivas ligadas al sexo en *Drosophila*. Induce mutaciones genéticas, aberraciones cromosómicas estructurales, intercambio de cromátidas hermanas y alteraciones mitóticas en células de mamíferos *in vitro* en presencia o ausencia de sistemas metabólicos exógenos. Se indujeron aberraciones cromosómicas y micronúcleos en la médula ósea de ratón y en células premeióticas y posmeióticas en una relación de dosis-respuesta lineal. La AA induce la síntesis de ADN no programada en espermatozoides de rata *in vivo*, pero aparentemente no en hepatocitos de rata. La GA indujo la síntesis de ADN no programada en hepatocitos de rata *in vitro*. Además, la AA induce la transformación en células de mamíferos cultivadas³¹⁻³⁶. Por otra parte, ambos agentes reaccionan directamente con la hemoglobina *in vivo*, pero los aductos de ADN resultan solo de la formación de GA^{31,32}

Con respecto a la función reproductiva, se ha analizado que pequeñas cantidades de acrilamida/glicinamida pueden ser responsables de la aparición de cáncer en los ovarios y el endometrio³⁷ lo que afecta las funciones reproductivas.

Exposición alimentaria

Las reglamentaciones prohíben la introducción de sustancias genotóxicas y carcinogénicas en los alimentos durante su manufactura. Sin embargo, se ha demostrado que algunos carcinógenos se forman en los alimentos como resultado de su tratamiento térmico (benzo(a)pireno y las aminas aromáticas heterocíclicas), siendo esto algo que no puede ser controlado. En esta situación se encontraría la acrilamida.

Al igual que ocurre con otros tóxicos, la exposición total a esta sustancia es variable y dependerá de la exposición alimentaria y de otras fuentes de exposición como por ejemplo el hábito tabáquico³⁸. La exposición alimentaria se ve, a su vez, condicionada por los hábitos alimentarios de

la población, es decir el nivel de consumo (cantidad, frecuencia) y el grado de contaminación de los alimentos ingeridos. La tendencia actual en las conductas alimentarias señala un aumento del consumo de alimentos precocinados y fritos lo que deriva en un incremento de la ingesta de alimentos ricos en carbohidratos (entre ellos las papas fritas) que se caracterizan por presentar niveles más altos de acrilamida que los alimentos proteicos. La mayor o menor contaminación de los distintos grupos de alimentos se va a ver condicionada por factores como el procesamiento o la técnica culinaria aplicada, la temperatura alcanzada (no se ha demostrado formación de acrilamida con $T < 120^{\circ}C$), la duración del procesamiento con calor y el contenido previo de agua en el alimento. Las papas fritas son una de las principales fuentes de este tóxico, así lo demuestra un estudio realizado en Madrid, España⁷, en donde constataron que casi el 75 % de las muestras analizadas sobrepasaban el límite de 1000ug/kg de acrilamida, por debajo del cual se considerarían niveles aceptables.

Según estudios realizados por algunos autores, el café es otra fuente importante de acrilamida. Si bien el rango detectado en cafés en grano es de 45 a 374 ng/g³⁹, según Senyuva y Gökmen (2005)⁴⁰, el nivel medio detectado en cafés en grano procedentes de distintos orígenes (Irlanda, México, Colombia, Guatemala, Etiopía) es de 19 ng/g y ligeramente superior en café turco (46 ng/g). Sin embargo, otros grupos de alimentos con menor concentración de acrilamida pero que se consumen diariamente (pan, pan tostado) y otros alimentos de los que no se conocen en la actualidad los niveles de acrilamida, también pueden contribuir a las ingestas totales, variando en magnitud entre los países o poblaciones de estudio⁹. En la actualidad, sobre la presencia de acrilamida en los alimentos y la dosis tolerable, se puede mencionar el informe de la European Food Safety Authority (EFSA)⁴¹. Los científicos de la EFSA concluyeron que no pueden establecer una ingesta diaria tolerable (TDI) de acrilamida en alimentos. Los expertos de la EFSA estimaron el rango de la dosis en el que la acrilamida presenta más probabilidad de causar una pequeña pero apreciable incidencia de tumores (llamado efecto neoplásico) u otros efectos adversos potenciales (neuroológicos, en el desarrollo pre y postnatal y en la reproducción masculina). El límite mínimo de este rango se denomina Límite mínimo de Confianza para la Dosis de Referencia (BMDL10). Para los tumores, los expertos seleccionaron un BMDL10 de 0,17 mg/kg de peso corporal/día: mg/kg de peso corporal/día = miligramos por kilogramos de peso corporal al día. Para otros efectos, los cambios neurológicos más relevantes que se observaron fueron aquellos con un

BMDL10 de 0,43 mg/kg de peso corporal/día. Comparando el BMDL10 con la exposición de los humanos a la acrilamida a través de la dieta, los científicos pueden indicar un “nivel de peligro sanitario” conocido como margen de exposición (MOE). El enfoque basado en el margen de exposición (MOE) proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo. El uso del MOE puede ayudar a los gestores del riesgo a definir las posibles acciones necesarias para mantener la exposición a dichas sustancias tan baja como sea posible.

El Comité Científico de la EFSA declara que un MOE de 10.000 o mayor para las sustancias genotóxicas y cancerígenas presenta un nivel bajo de peligro para la salud pública. Los MOE para los efectos de la acrilamida relacionados con el cáncer varían entre 425 para consumidores medios adultos y 50 para los consumidores extremos, bebés. Estos rangos indican un peligro potencial para la salud pública.

Para las sustancias no genotóxicas, un MOE de 100 o más normalmente indica que no existe peligro para la salud pública. Los MOE para los efectos neurológicos de la acrilamida varían entre 1075 para un consumidor medio adulto y 126 para bebés con una ingesta elevada. Los expertos de la EFSA concluyeron que, para estos efectos, los niveles actuales de exposición a través de la dieta no presentan un peligro para la salud, aunque para bebés y niños con una alta exposición a través de la dieta, el MOE se acerca a los valores que pueden presentar peligro para estos efectos.

De acuerdo a los científicos de EFSA, los principales alimentos contribuyentes a la exposición a la acrilamida varían según la edad:

Adultos: los productos derivados de las papas fritas (incluyendo las papas fritas y las papas asadas) representan hasta el 49% de la exposición media en adultos, el café un 34% y el pan blando un 23%, son las fuentes de alimentación principales en adultos, seguidos por las galletas, las galletas saladas y el pan crujiente y otros productos derivados de las papas.

Niños (> 1 año) y adolescentes: los productos derivados de las papas fritas (excepto las papas chips y los aperitivos) presentan hasta un 51% de toda la exposición a través de la dieta. El pan blando, los cereales de desayuno, las galletas y otros productos derivados de los cereales o de las papas pueden contribuir hasta con un 25%. Los alimentos procesados para bebés con cereales representaban hasta el 14% de la exposición para los bebés. Los pasteles y los productos de confitería hasta el 15% para niños y adolescentes, y las papas chips y los aperitivos el 11% para los adolescentes.

Bebés (< 1 año): los alimentos para bebés que no son elaborados a base de cereales, los que han sido elaborados a base de cereales (sobre todo biscotes y galletas) y otros productos derivados de las papas contribuyen con un 60%, 30% y 48%, respectivamente.

Aunque algunas categorías de alimentos, como las papas fritas o los aperitivos y los sucedáneos del café, contienen niveles relativamente elevados de acrilamida, su contribución global a la exposición a través de la dieta es limitada si se sigue una dieta normal variada.

Metodología de análisis

Según la European Food Safety Authority (EFSA)⁴² las metodologías de análisis más empleados para la cuantificación de acrilamida entre el 2007 y el 2010 fueron: cromatografía líquida de alta eficiencia con detectores de masa (HPLC/MS) (56 %) cromatografía de gases con detectores de masa (GC/MS) (37 %) y el porcentaje restante se dividió entre cromatografía líquida con detectores ultravioleta (HPLC/UV), electroforesis capilar y bioensayos como test inmunoenzimáticos (ELISA)⁴³. De igual manera, el clean-up de la muestra varía en función de la complejidad de la matriz y de la metodología analítica a emplear. Parámetros como el solvente, la temperatura y el tiempo de extracción, afectan de manera considerable la precisión del método analítico⁴⁴. Los métodos utilizando GC/MS requieren reprivatización del analito, pero los porcentajes de recuperación, las desviaciones estándar y los límites de cuantificación son bastantes aceptables⁴⁵. Este proceso de derivatización puede ir desde una brominación hasta una sililación y las columnas más empleadas son de tipo medianamente polar. La utilización de detectores nitrógeno/fósforo se reporta desde 2011 como promisorio a través del test inmunoenzimático (ELISA)⁴³. Los métodos de cromatografía líquida, como ya se ha mencionado, son los más empleados debido a su simplicidad, sensibilidad y menor consumo de tiempo. En estos, el clean-up de la muestra dependerá del tipo de detector a emplear, donde los cartuchos de SPE más usados son apolares (C18) o de intercambio aniónico. La comparación entre las metodologías de HPLC y GC ha sido estudiada⁴⁶ y se ha concluido que el empleo de detectores ultra violeta no es muy adecuado, pues muestra baja sensibilidad, aunque en el caso de análisis de acrilamida en papas, debido a las altas cantidades de acrilamida, pueden ser considerados como una opción más económica⁴⁷.

Mitigación

Las principales estrategias de mitigación en acrilamida se han enfocado en productos a partir de papas y cereales, pues estos junto con el café son los que exhiben mayores contenidos. En el caso del café, este tipo de estrategias son limitadas, pues en su mayoría afectan la calidad sensorial del producto final²⁴. La adición de aditivos como pirofosfato ácido de sodio, ácido cítrico, ácido láctico y acético han demostrado una reducción en los niveles de acrilamida formados⁴⁸, pero los autores no hacen referencia acerca de la seguridad con el uso de dichas sustancias. Con respecto a las papas, en lo referente al pre y postcosecha son las que tienen mayores posibilidades de reducción de la acrilamida. El remojo de ácidos orgánicos con las rodajas de papas lleva a una reducción del 70 % de la acrilamida, pero lo más importante en la reducción de esta sustancia en las papas es el control de la temperatura y la humedad⁴⁹. En lo que respecta a los cereales, estos no han sido muy estudiados, pero se sabe que en estos la asparagina es el principal precursor en la formación de acrilamida y con el agregado de la enzima asparaginasa sería un método de reducción.

Conclusiones

La acrilamida parece formarse como subproducto de procesos de cocción a altas temperaturas, especialmente en alimentos ricos en carbohidratos como las patatas, los cereales, y también en el café. Uno de los mecanismos sugeridos de formación de acrilamida en los alimentos ricos en carbohidratos que se cocinan a altas temperaturas ha sido la reacción entre el aminoácido asparagina y ciertos azúcares, todos ellos presentes de forma natural en los alimentos. Además, cabe la posibilidad de que otros mecanismos desempeñen algún papel en la formación de acrilamida en los alimentos. Dado que la acrilamida está presente en una amplia gama de alimentos cotidianos, este problema de salud se aplica a todos los consumidores, pero los niños son el grupo de edad más expuesto en función del peso corporal. Los grupos de alimentos más importantes que contribuyen a la exposición a la acrilamida son los productos de papa frita, café, galletas, pan crujiente y pan blando. Después de la ingestión, la acrilamida se absorbe desde el tracto gastrointestinal, se distribuye a todos los órganos y se metaboliza ampliamente. La glicidamida es uno de los principales metabolitos resultantes de este proceso y la causa más probable de mutaciones genéticas y tumores observados en estudios con animales. La certeza de estudios en humanos de que la exposición dietética a la acrilamida causa cáncer es actualmente limitada e inconclusa. Por lo

tanto hay bastante incertidumbre acerca de las repercusiones de la acrilamida en la salud pública y las investigaciones que se describen en esta revisión mencionan que no se puede establecer una ingesta diaria tolerable (TDI) de acrilamida en alimentos y establecieron un rango que lo denominaron Límite Mínimo de Confianza para la Dosis de Referencia (BMDL10) y comparando este con la exposición de los humanos a la acrilamida a través de la dieta, se puede indicar un “nivel de peligro sanitario” conocido como margen de exposición (MOE). Este proporciona una indicación del nivel de peligro sanitario sobre la presencia de una sustancia en los alimentos sin cuantificar el riesgo. Por todo lo expuesto considero importante continuar con los esfuerzos para reducir los niveles de acrilamida en los productos alimenticios y específicamente en la industria de los alimentos. No nos olvidemos que hay otros compuestos químicos producto del proceso tecnológico de los alimentos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos, las aminas heterocíclicas, las nitrosaminas que en su conjunto pueden producir efectos nocivos a largo plazo en la salud humana. Es por esto que los consumidores que comen grandes cantidades de ciertos alimentos fritos, asados u horneados pueden tener un mayor riesgo de cáncer. Sugiero que traten de comer una dieta equilibrada y variada, que incluya abundancia de fruta y vegetales.

Bibliografía

1. IARC. (1994) Acrylamide in IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Vol 60, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp.389-433.
2. Swedish National Food Administration (SNFA). (2002) “Acrylamide is formed during the preparation of food and occurs in many foodstuffs”. Press release from Livsmedelsverket, Swedish National Food Administration, April 24 <http://www.slv.se/engdefault.asp>
3. Food and Drug Administration (2003) Exploratory data on Acrylamide in Foods. February. Update. <http://www.cfsan.fda.gov/dms/acrydat2.html>
4. Food Standards Agency study of acrylamide in food.(2002) Press Release 17 May (www.food.gov.uk)
5. NFCA, (2002) Results of acrylamide in the Norwegian food samples.<http://www.snt.no>
6. Swiss Federal Office of Public Health on acrylamide in foods. (2002) <http://www.bag.admin.ch/>
7. OMS (Organización Mundial de la Salud) (1985) Acrylamide. Environmental Health Criteria 49. Organización Mundial de la Salud, Ginebra.
8. OMS (Organización Mundial de la Salud) (1996) Guidelines for drinking-water quality (2 ed.) Health criteria and other supporting information, 2, Geneva: Organic constituents.
9. OMS (Organización Mundial de la Salud) (2002) Health Implications of acrylamide in food. Report of a joint FAO/WHO Consultation, 25-27 June (Geneva:WHO).
10. Tritscher AM (2004) Human health risk assessment of processing-related compounds in food. *Toxicol Lett* 149: 177-186.
11. Barutcu,I; Sahin, S y Sumnu, G (2009) Acrylamide formation in different batter formulations during microwave frying. *LWT –Food Science and Technology*, 42 (1), 17-22.
12. Zhang, Y; Fang,H y Zhang, Y (2008) Study on formation of acrylamide in asparagines-sugar microwave heating systems using UPLC-MS/MS analytical method. *Food Chemistry*, 108(2), 542-550.
13. YaylayanVA, Stadler RH (2005) Acrylamide formation in food:a mechanisticperspective.*JAOACInt* (http://www.aoac.org/pubs/New_Journal/2005/Jan_Feb_05/acr_for.htm)
14. Senyuva HZ, Gibkmen V (2005) Study of acrylamide in coffee using an improved liquid chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Addit Contam* 22(3):214-220.
15. Stadler RH, Scholz G (2004) Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanism of formation, and potential strategies of control. *Nutr Rev* 62(12): 449-467.
16. Dybing E, Farmer PB, Andersen M, Fennell TR, et al (2005) Human exposure and internal dose assessments of acrylamide in food. *Food Chem Toxicol* 43: 365-410.
17. Blank A (2005) Current status of acrylamide research in food: Measurement, safety assessment, and formation. *Ann NY Acad Sci* 1043: 30-40.

18. Knol J J, van Loon WAM, Linssen J P H, Ruck AL, et al (2005) Toward a kinetic model for acrylamide formation in a glucose- asparagine reaction system. *J. Agric. Food Chem.* 53(15): 6133-6139.
19. Friedman M (2003) Chemistry, biochemistry and safety of acrylamide. *Review. J Agric Food Chem* 51: 4504-4526.
20. Senyuva HZ, Gokmen V (2005) Survey of acrylamide in Turkish foods by an in $\mu\text{g}/\text{kg}$ house validated LC-MS method. *Food Addit Contam* 22(3): 204-209.
21. Amrein TM, Andres L, Schonbachler B, Conde-Petit B, et al (2005) Acrylamide in almond products. *Eur Food Res Tech* 221(1-2):14-18.
22. Brathen E, Knutsen SH (2005) Effect of temperature and time on the formation of acrylamide in starch-based and cereal model systems, flat breads and bread. *Food Chem* 92(4): 693-700.
23. Robert F, Vuataz G, Pollien P, Saucy F, et al (2005) Acrylamide formation from asparagine under low moisture Maillard reaction conditions. 2. Crystalline vs amorphous model systems. *J Agric Food Chem* 53(11):4628-4632
24. 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), 793-810.
25. Olsen, A.; Christensen, J; Outzen, M; Olesen, P. et al (2012). Pre-diagnostic acrylamide exposure and survival after breast cancer among postmenopausal Danish women. *Toxicology*, 296(1-3), 67-72
26. Ehlers, A.; Lenze, D.; Broll, H.; Zagon, J et al (2013) Dose dependent molecular effects of acrylamide and glycidamide in human cancer cell lines and human primary hepatocytes. *Toxicology Letters*, 217 (2), 111-20.
27. Prasad, S. and Muralidhara, N (2014) Neuroprotective effect of geraniol and curcumin in an acrylamide model of neurotoxicity in *Drosophila melanogaster*: relevance to neuropathy. *Journal of Insect Physiology*, 60, 7-16.
28. Erkekoglu, P & Baydar, T. (2014) Acrylamide neurotoxicity. *Nutritional Neuroscience*, 17(2): 49-57
29. J.P. Teixeira, J. Gaspar, S. Silva, J. Torres, (2004) Occupational exposure to styrene: modulation of cytogenetic damage and levels of urinary metabolites of styrene by polymorphisms in genes CYP2E1, EPHX1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1, *Toxicology* 195: 231-242.
30. IARC (1994) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Human: Some Industrial Chemicals, no. 60, International Agency for Research on Cancer, Lyon, pp. 389-433.
31. K.L. Dearfield, G.R. Douglas, U.H. Ehling, M.M. Moore, (1995) Acrylamide—a review of its genotoxicity and assessment of heritable genetic risk, *Mutat. Res.* 330: 71-99.
32. H. Glatt, H. Schneider, Y. Liu, (2005) V79-hCYP2E1-hSULT1A1, a cell line for the sensitive detection of genotoxic effects induced by carbohydrate pyrolysis products and other food-borne chemicals, *Mutat. Res.* 580: 41-52.
33. C. Martins, N.G. Oliveira, M. Pingarilho, C.G. Gamboa et al (2007) Cytogenetic damage induced by acrylamide and glycidamide in mammalian cells: correlation with specific glycidamide-DNA adducts, *Toxicol. Sci.* 95: 383-390.
34. Pingarilho, M; Oliveira, N; Martins, C; Costa Gomes, B. et al (2013) Induction of sister chromatid Exchange by acrylamide and glycidamide in human lymphocytes: Role of polymorphisms in detoxification and DNA-repair genes in the genotoxicity of glycidamide. *Mutat. Res* 752:1- 79
35. Sugimura, T; Kawachi, T; Nagao, M; Yahagi, T; (1977) Mutagenic principles in tryptophan and phenylalanine *Proc. Japan. Acad* 53: 58-61
36. Abramsson-Zetterberg, L (2003) The dose-response relationship at very low doses of acrylamide is linear in the flow cytometerbased mouse micronucleus assay, *Mutat. Res.* 535:215-222
37. Wilson, K; Mucci, L; Rosner, B.; and Willet, W. (2010) A prospective study on dietary acrylamide intake and the risk for breast, endometrial, and ovarian cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 19 (10), 2503-15.

38. Stadler,R., Scholz,G (2004) Acrylamide: an update on current knowledge in analysis, levels in food, mechanism of formation, and potential strategies of control. *Nutr.Rev* 62(12):449-467.
- chromatography mass spectrometry method: Investigation of colour changes and acrylamide formation in coffee during roasting. *Food Addit Contam* 22(3):214-220.
41. Scientific Opinion on acrylamide in food. EFSA (2015) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy. *EFSA Journal* 13(6):4104
42. European Food Safety Authority (EFSA) (2012) Update on acrylamide levels in food from monitoring years 2007 to 2010 <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2938>
43. Oracz,J, Nebesny,E, y Zyzelewicz, D (2011) New trends in quantification of acrylamide in food products. *Talanta*, 86, 23-34.
44. Gökmen,V.; Morales,F.; Atac,B; Serpent,A et.al (2009) Multiple-stage extraction strategy for the determination of acrylamide in foods. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22(2). 142-147.
45. Sun,S, Fang, Y & Xia,Y (2012) A facile detection of acrylamide in starchy food by using a solid extraction-GC strategy. *Food Control*, 26(2), 220-222.
39. Andrzejewski, D., Roach, J. Gay, M., Musser, S (2004) Analysis of coffee for the presence of acrylamide by LC-MS/MS. *J Agric.Food Chem* 52(7):1996-2002
40. Senyuva,H. Gibkmen,V (2005) Study of acrylamide in coffee using an improved liquid
46. Jezussek,M y Schieberle,P (2003) A new LC/MS method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (27), 7866-71.
47. Lineback;D.; Coughlin,J. y Stadler,R (2012) Acrylamide in foods: a review of the science and future considerations. *Annual Review of food Science and technology*, 3, 15-35.
48. Mestdagh,F; Maertens,J; Cucu,T., Delporte,K. et.al (2008) Impact of additives to lower the formation of acrylamide in a potato model system through pH reduction and other mechanisms. *Food Chemistry*, 107 (1), 26-31.
49. De Vleeschouwer,K; Van der Plancken,I; Van Loey,A. and Hendrickx,M (2007) Kinetics of acrylamide formation/elimination reactions as affected by water activity. *Biotechnology Progress*, 23 (3), 722-8.

